Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

ODEMAR CARDOSO SILVA

Desenvolvimento de biossensores potenciométrico e óptico para determinação de H_2S empregando células íntegras de *Acidithiobacillus thiooxidans*

Rio de Janeiro

2018

Odemar Cardoso Silva

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES POTENCIOMÉTRICO E ÓPTICO PARA DETERMINAÇÃO DE H_2S EMPREGANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *ACIDITHIOBACILLUS THIOOXIDANS*

Tese de doutorado apresentada ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como um dos requisitos necessário à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em:

_____

Andrea Medeiros Salgado, D.Sc., EQ/UFRJ

_____

Francisca Pessoa de França, D.Sc., EQ/UFRJ

_____

Débora Monteiro de Oliveira, D.Sc., CETEM

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc., EQ/UFRJ

_____

Emerson Schwingel Ribeiro, D.Sc., IQ/UFRJ

_____

Luis Gonzaga Santos Sobral, D.Sc., CETEM

_____

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc., EQ/UFRJ, D.Sc., EQ/UFRJ

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES POTENCIOMÉTRICO E ÓPTICO PARA DETERMINAÇÃO DE H_2S EMPREGANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *ACIDITHIOBACILLUS THIOOXIDANS*

ODEMAR CARDOSO SILVA

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Profª. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Profª. Francisca Pessoa de França, D.Sc.

EQ/UFRJ

Rio de Janeiro

2018

Ficha Catalográfica

Cardoso Silva, Odemar
Cs586d
Desenvolvimento de biossensores potenciométrico e óptico para determinação de H_2S empregando células íntegras de Acidithiobacillus thiooxidans / Odemar Cardoso Silva. – Rio de Janeiro, 2018. 239 f.

Orientadora: Andréa Medeiros Salgado.
Coorientadora: Francisca Pessôa de França.
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.
1. Biossensores. 2. Potenciometria. 3. Espectrofotometria. 4. Acidithiobacillus thiooxidans. 5. Sulfeto de hidrogênio. I. Medeiros Salgado, Andréa, oriente. II. Pessôa de França, Francisca, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus Pais, por pavimentarem a estrada da minha vida, ao meu Amordevida Paula Rosas Jaques por ser o meu caminho neste longo percurso e ao meu Filho Tiago Silva por ser sempre minha Luz, minha direção e sentido de vida.

Agradecimentos

Aos meus Pais, Onilton Leonder da Silva e Maria Helena Cardoso Silva, por investirem suas vidas em amar, educar, acreditar, incentivar e investir seus esforços em mim e em minhas irmãs. Meu amor e minha gratidão eterna a vocês.

À minhas orientadoras Andréa Medeiros Salgado e Francisca Pessôa de França, por todo apoio, ideias, ensinamentos e especialmente à Professora Andréa, por ser infalível sempre que precisei de sua ajuda e orientação.

Aos meus grandes Amigos e grandes pesquisadores Luis Sobral e Débora Monteiro por toda a disponibilidade e apoio, por abrirem seus laboratórios para que eu pudesse desenvolver meu trabalho, por todas as ideias e discussões e por toda ajuda sem limites, não porque era para mim, mas porque se envolvem efetivamente no que é o melhor para a educação e a pesquisa no Brasil. Sem vocês não seria possível finalizar esta tese.

Às minhas professoras Andréa Medeiros Salgado, Francisca Pessôa de França, Eliana Alhadeff, Érika Chrisman por todos os ensinamentos. E em especial à professora Mônica Antunes, que ultrapassou os ensinamentos e mostrou compreensão, apoio e empatia em um dos momentos mais difíceis que atravessei durante este percurso.

Às grandes Amigas que fiz no laboratório E-122, Ana, Gabi, Érica e Paula por todo apoio, discussões, ideias e pela amizade que tornaram o caminho real e percorrível. E em especial à Gisele Costa que me ensinou e mostrou os primeiros passos no mundo da microbiologia e por todo apoio, carinho e amizade que ultrapassaram os limites do tempo e das paredes do nosso laboratório.

Aos meus grandes amigos e companheiros de docência Guilherme Inocêncio e Leonardo Lignani por serem sempre presentes, por me permitirem explorar a biologia em seu laboratório, por todo o comprometimento e por todas as ideias mirabolantes sem as quais não seria possível desenvolver este trabalho.

À minha Amiga e companheira de CEFET Suyane Alvarenga. Sem sua ajuda literalmente não haveria tese, pois o sulfeto de sódio utilizado em toda a tese foi conseguido através de seus esforços. Muito além da ajuda, seu apoio foi essencial.

À todos os meus Amigos da coordenação de química do CEFET-RJ e à direção do CEFET, em especial à professora Lúcia Uchoa, que por sua empatia e solidariedade permitiram que eu tivesse tempo para abraçar este desafio. Espero em breve poder retribuir toda a confiança depositada com muito trabalho e dedicação ao CEFET.

À instituição UFRJ abrilhantada por incontáveis servidores que a tornam uma Universidade de excelência, muito bem representados pelo servidor Júlio César da secretaria acadêmica. Obrigado à todos.

SILVA, Odemar Cardoso. **Desenvolvimento de biossensores potenciométrico e óptico para determinação de H_2S empregando células íntegras de *Acidithiobacillus thiooxidans***. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A geração de sulfeto de hidrogênio é inerente aos processos de extração e refino de petróleo, sendo encontrado naturalmente no óleo bruto e formado durante o processo de recuperação secundária de poços, craqueamento térmico e dessulfurização de combustíveis. Em função de seu caráter altamente tóxico e corrosivo, sua formação constitui um sério problema para a saúde humana, para o meio ambiente e para a indústria, devendo ter sua concentração monitorada e controlada. Este trabalho relata o desenvolvimento de dois biossensores, óptico e eletroquímico, para a quantificação de H_2S em meio aquoso, avaliando a aplicação do biossensor para sua determinação em água produzida. O princípio de detecção foi baseado no comportamento metabólico de *A. thiooxidans* FG-01 que, em condições de baixa oxigenação e em meio ácido, oxidam rapidamente o sulfeto de hidrogênio a enxofre elementar detectado por espectrofotometria em 620 nm, permitindo a construção do biossensor óptico. Em condições que favorecem a oxidação completa de H_2S há formação de ácido sulfúrico. A geração de íons H^+ pode ser detectada por um transdutor potenciométrico, empregando eletrodo sensível a íons H^+, permitindo o desenvolvimento do biossensor eletroquímico. As respostas dos biossensores foram caracterizadas e suas performances foram otimizadas a partir do estudo de parâmetros de sistema como meio de análise, concentração celular, condição de estarvação celular, influência do tempo de cultivo, disponibilidade de oxigênio e pH. Os melhores resultados para o biossensor óptico foram alcançados em pH 1 e empregando células com 6 dias de crescimento, a partir da mistura de 1,7 mL de solução de H_2S e 1,7 mL de suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$. O tempo de resposta foi de 10min para concentrações de H_2S até 50 $mg.L^{-1}$, havendo linearidade entre a concentração de H_2S e o aumento de absorbância na faixa de 15 a 100 $mg.L^{-1}$. Foram alcançadas boas repetitividade e reprodutibilidade das respostas do biossensor, com um desvio padrão relativo de 4,46 % e 2,61 %, respectivamente. A resposta potenciométrica em condições otimizadas foram obtidas a partir da mistura, em reator fechado, de 25 mL de solução de H_2S e 30 mL de suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$ em pH 3,5 por 200 min de reação para concentrações de

H_2S até 50 mg.L^{-1}. O biossensor potenciométrico apresentou linearidade para concentrações de H_2S entre 5 e 50 mg.L^{-1} e alta seletividade, não sendo a resposta influenciada pela presença de espécies iônicas em alta concentração, características de água produzida. A análise de amostra real de água produzida exerceu forte influência na resposta dos biossensores, possivelmente pela presença de diversos compostos orgânicos tóxicos. Contudo, o micro-organismo demonstrou capacidade de adaptação ao meio de análise, indicando que melhores resultados podem ser obtidos a partir de uma prévia adaptação aos seus diversos constituintes.

Palavras-chave: Biossensor óptico. Biossensor eletroquímico. Sulfeto de hidrogênio. *A. thiooxidans*. Espectrofotometria. Potenciometria.

SILVA, Odemar Cardoso. **Desenvolvimento de biossensores potenciométrico e óptico para determinação de H_2S empregando células íntegras de *Acidithiobacillus thiooxidans***. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The generation of hydrogen sulfide is inherent in oil extraction and refining processes, being naturally found in the crude oil and formed during the secondary well recovery, thermal cracking and fuel desulphurisation process. Due to its highly toxic and corrosive character, its formation constitutes a serious problem for human health, for the environment and for the industry, so its concentration must be monitored and controlled. This work reports the development of two biosensors, optical and electrochemical, for quantifying H_2S in aqueous medium, evaluating the application of the biosensor for its determination in produced water. The detection principle was based on the metabolic behavior of *A. thiooxidans* FG-01. Under low oxygenation and acidic conditions, these bacteria quickly oxidize hydrogen sulfide to elemental sulfur detected at 620 nm, allowing the construction of the optical biosensor. Under conditions that favor the complete oxidation of H_2S there is formation of sulfuric acid and the generation of H^+ ions can be detected by a potentiometric transducer, using electrode sensitive to H^+ ions, allowing the development of the electrochemical biosensor. The biosensor responses were characterized and their performances were optimized from the study of system parameters such as analysis medium, cell concentration, cell stabilization condition, influence of culture age, oxygen availability and pH. The best results for the optical biosensor were achieved at pH 1 and using cells with 6 days of growth, from the mixture of 1.7 mL of H_2S solution and 1.7 mL of cell dispersion at 2.2 $g.L^{-1}$. The response time was of 10min for concentrations of H_2S up to 50 $mg.L^{-1}$, with linearity between H_2S concentration and increase of absorbance in the range of 15 to 100 $mg.L^{-1}$. Good repeatability and reproducibility of biosensor's responses were achieved, with a relative standard deviation of 4.46 % and 2.61 %, respectively. The potentiometric response under optimized conditions was obtained from the mixture, in a closed reactor, of 25 mL of H_2S solution and 30 mL of cell dispersion at 2.2 $g.L^{-1}$ and at pH 3.5 for 200 min for H_2S concentrations up to 50 $mg.L^{-1}$. The potentiometric biosensor presented linearity for concentrations of H_2S between 5 and 50 $mg.L^{-1}$ and high selectivity, not being the response influenced by the presence of ionic species in high concentrations, characteristics of produced water.

The real sample analysis of produced water strongly influenced the response of biosensors, possibly due to the presence of several toxic organic compounds. However, the microorganism showed ability to adapt to the analysis medium, indicating that better results can be achieved by prior adaptation to its various constituents.

Keywords: Optic biosensor. Electrochemical biosensor. Hydrogen sulfide. *A. thiooxidans*. Spectrophotometry. Potentiometry.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA	Espectrômetro de absorção atômica
AAO	Óxido de alumínio anódico
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina
BRS	Bactéria redutora de sulfato
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
CENPES	Centro de Pesquisa da Petrobras
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CG	Cromatografia gasosa
CMI	Corrosão microbiologicamente induzida
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
DIC	Detector de ionização em chama
DO	Densidade óptica
EIS	Eletrodo íon-seletivo
EM	Espectrômetro de massas
FHWA	Administração Federal Americana de Estradas
FIA	Análise por injeção em fluxo
FNUAP	Fundo de População das Nações Unidas
FPD	Detector fotométrico de chama
HDS	Hidrodessulfurização
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPR	Peroxidase de raíz forte
IEC	Coluna de troca iônica
K_{LA}	Coeficiente volumétrico de transferência de massa
LD	limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NACE	Associação Nacional de Engenharia de Corrosão
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OSHA	Administração da Saúde e Segurança Ocupacional
OUR	Taxa de utilização de oxigênio
PIB	Produto Interno Bruto
PROCONVE	Programa de Controle de Emissões Veiculares
SOB	Bactéria oxidante de enxofre
SPR	Ressonância de Plasma de Superfície
SUR	Taxa de utilização de enxofre
SVA	Sulfetos volatilizáveis por acidificação
TOG	Teor de óleos e graxas
URE	Unidade de Recuperação de Enxofre

Lista de Ilustrações

Página

Figura 1 - Corrosão por pite provocada por bactérias. Adaptado de VIDELA e HERRERA (2004). 34

Figura 2 - Esquema de reações da contra-titulação com $Na_2S_2O_3$. Adaptado de Oliveira Filho et al. (2004). 37

Figura 3 - Reação de obtenção do azul de metileno (LODGE, 1989). 38

Figura 4 - Representação esquemática do sistema extrator para SVA. (1) entrada do gás de purga no sistema; (2) seringa para injeção de HCl(aq) no septo posicionado na linha de gás; (3) balão de extração, posicionado sobre um agitador magnético; (4) conexão entre o balão de extração e o frasco lavador, por onde fluirá o H_2S recém gerado; (5) frasco lavador contendo tampão básico antioxidante, responsável por reter os sulfetos; (6) saída do sistema para o ambiente (FAGNANI et al, 2012). 39

Figura 5 - Esquema de construção do sensor por espectroscopia de interferência reflectométrica para H_2S. Adaptado de Kumeria et al. (2011). 41

Figura 6 - Resposta de interferência de franjas Fabry-Perot para H_2S. (a,b) Espectro de interferência antes e depois de exposição ao sulfeto de hidrogênio. (c) Gráfico de dependência da modificação no comprimento de onda em função da concentração de analito. Adaptado de Kumeria et al. (2011). 41

Figura 7 - Esquema de funcionamento de um detector por condutividade térmica (SHIMADZU, 2012). 43

Figura 8 - Esquema de funcionamento de um detector de quimioluminescência. Adaptado de Shimadzu (2012). 45

Figura 9 - Esquema de aparelhagem de detector fotométrico de chama. Adaptado de Shimadzu (2012). 46

Figura 10 - Esquema do sistema FIA de determinação de sulfeto por espectroscopia de absorção atômica. Adaptado de Petersson et al. (1986). 47

Figura 11 - Curvas típicas de titulação potenciométrica de enxofre mercaptílico e gás sulfídrico (PETROBRAS-N2458, 1992). 51

Figura 12 - Reações metabólicas de bactérias quimioautotróficas obrigatórias e facultativas. Adaptado de Waksman e Starkey (1923). 53

Figura 13 - Ciclo do enxofre: transformações mediadas por micro-organismos. Adaptado de Burns (1967). 54

Figura 14 - Sucessão microbiológica de acidófilos em concreto em função do pH ao longo do tempo. Adaptado de Islander et al. (1991). 56

Figura 15 - Remoção de H_2S por *A. thiooxidans* AZ11. Símbolos: círculos fechados, entrada do biofiltro; círculos abertos, saída do biofiltro (LEE et al, 2006). 60

Figura 16 - (a) padrão de crescimento de *A. thiooxidans*, (b) taxa de oxidação de enxofre por *A. thiooxidans*, (c) influência da concentração de sulfato na taxa de oxidação de enxofre para *A. thiooxidans*. Legenda:(a) círculos abertos, *A. thiooxidans* MET, círculos fechados, *A. thiooxidans* AZ11, triângulos reversos, *A. thiooxidans* TAS. Adaptado de Lee et al. (2006). 61

Figura 17 - Microscopia eletrônica de *Thiobacillus thiooxidans* (9000x) (GOLOVACHEVA, 1985). 64

Figura 18 - Variações da acidez e da concentração de íons $SO_4^{=}$ decorrentes da ação de *A. thiooxidans* sobre enxofre elementar. Adaptado de Kempner (1996). 65

Figura 19 - Esquema do sistema para controle do consumo de H_2S e O_2. Adaptado de Jensen et al. (2011). 66

Figura 20 - Evolução da taxa de utilização de oxigênio e de sulfeto de hidrogênio por *A. thiooxidans* em função do tempo. Adaptado de Jensen et al. (2011). 67

Figura 21 - Produção máxima de biomassa e ácido sulfúrico em função da concentração de enxofre. Adaptado de Liu et al. (2004). 74

Figura 22 - Princípio de detecção de um biossensor. Adaptado de Strehlitz et al. (2008). 76

Figura 23 - Diagrama esquemático do sistema biossensor para H_2S. (1) biorreator; (2) tampa de teflon; (3) termômetro; (4) sensor para oxigênio dissolvido; (5) esferas imobilizadas; (6) agitador magético; (7) entrada de gás; (8) bomba de ar; (9) tanque de H_2S; (10) medidor de fluxo; (11) computador (MIRZAEI et al, 2014). 86

Figura 24 - Curva de correlação linear entre concentração de H_2S e de oxigênio dissolvido. Adaptado de Mirzaei et al. (2014). 87

Figura 25 - Reator utilizado nos experimentos em sistema fechado com tampa porosa. 103

Figura 26 - Esquema de construção do sistema de determinação de H_2S em meio ATCC 125 não aerado utilizando o reator de vidro em configuração 1. 104

Figura 27 - Esquema de construção do sistema de determinação de H_2S em meio ATCC 125 aerado utilizando o reator de vidro em configuração 2. 105

Figura 28 - Esquema de montagem do reator de vidro em configuração 3 contendo 30mL de suspensão celular (DO=2,0) e 25 mL de solução de H_2S. 106

Figura 29 - Esquema experimental de consumo de H_2S por potenciometria e titulação iodométrica 109

Figura 30 - Fotografia obtida em microscópio óptico de bactérias *A. thiooxidans* e partículas de enxofre em câmara de Neubauer (Aumento de 1000x). 117

Figura 31 - Avaliação dos meios de crescimento para *A. thiooxidans*. 119

Figura 32 - Curvas de crescimento de *A. thiooxidans* FG-01 em função da agitação condição de agitação dos sistemas de crescimento. legenda: “sem agitação”, repouso por 3 dias antes da agitação; “com agitação”, agitação imediata após inoculação. 121

Figura 33 - Variação do pH ao longo do tempo para cultivos de *A. thiooxidans* FG-01em função da condição de agitação. Legenda: “sem agitação”, repouso por 3 dias antes da agitação; “com agitação”, agitação imediata após inoculação. 121

Figura 34 - Variação da absorbância em 620 nm para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração de inóculo. 123

Figura 35 - Variação do pH para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração de inóculo. 123

Figura 36 - Variação da absorbância em 620 nm para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração inicial de enxofre. 125

Figura 37 - Variação do pH para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração inicial de enxofre. 125

Figura 38 - Gráfico de interação entre os parâmetros Temperatura e concentração de enxofre. 131

Figura 39 - Influência dos parâmetros temperatura e concentração de enxofre no crescimento de *Acidithiobacillus thiooxidans* FG-01. 132

Figura 40 - Correlação entre absorbância e peso seco para *A. thiooxidans* FG-01. 134

Figura 41 - Resposta potenciométrica do sistema de determinação de H_2S na configuração 1. A linha pontilhada representa a linha de tendência linear. 139

Figura 42 - Reator para determinação de H_2S com sistema de aeração com vazão controlada. 140

Figura 43 - Variação de potencial de eletrodo em função do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* utilizando frasco reator fechado com tampa porosa. 142

Figura 44 - Resposta potenciométrica utilizando reator fechado com tampa porosa para análise de solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ utilizando células de *A. thiooxidans* submetidas a estarvação de 24 h. 144

Figura 45 - Resposta potenciométrica em função da variação de pH para análise de soluções de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ em sistema fechado com tampa porosa. 148

Figura 46 - Curva analítica do eletrodo sensível a íons hidrogênio nas condições experimentais de determinação de solução de H_2S 30 $mg.L^{-1}$ empregando o reator na configuração 3. 150

Figura 47 - Variação de potencial de eletrodo e de pH para análise de soluções de H_2S 30 $mg.L^{-1}$ utilizando reator fechado com tampa de teflon em configuração 3. As curvas azuis representam os resultados para um primeiro experimento e as vermelhas para sua réplica. 151

Figura 48 - Resposta potenciométrica em função da variação da concentração de H_2S utilizando reator fechado com tampa de teflon em configuração 3. 152

Figura 49 - Resposta potenciométrica para solução de H_2S de concentração 70 $mg.L^{-1}$ utilizando reator fechado com tampa de teflon em configuração 3. 153

Figura 50 - Variação na taxa de reação para soluções de H_2S entre 5 e 70 $mg.L^{-1}$ empregando o reator fechado com tampa de teflon em configuração 3. 154

Figura 51 - Resposta potenciométrica para soluções de H_2S de concentração 50 $mg.L^{-1}$ em pH 3,5 e em pH 5,0 utilizando o reator em configuração 3. 156

Figura 52 - Variação na concentração hidrogeniônica em função do pH inicial para sistema de análise contendo 50 $mg.L^{-1}$ de H_2S empregando o reator em configuração 3. 158

Figura 53 - Brancos experimentais para o sistema de detecção de H_2S em configuração 3. 159

Figura 54 - Curva de calibração para o biossensor potenciométrico considerando concentrações de H_2S até 70 $mg.L^{-1}$. A linha azul representa o ajuste da linha de tendência linear. 161

Figura 55 - Comparação da resposta potenciométrica obtida para o branco reacional e para 1 $mg.L^{-1}$ de H_2S empregando o reator em configuração 3. 162

Figura 56 - Curva de calibração para o biossensor potenciométrico considerando concentrações de H_2S entre 5 e 50 $mg.L^{-1}$. A linha azul representa o ajuste da linha de tendência linear. 162

Figura 57 - Resposta potenciométrica para solução de H_2S de concentração 37$mg.L^{-1}$ empregando o reator em configuração 3. 163

Figura 58 - Comparação da resposta potenciométrica obtida na presença de na ausência de potenciais espécies químicas interferentes. 165

Figura 59 - Evolução da absorbância em 620 nm e do perfil de pH para o sistema de consumo de H_2S por *A. thiooxidans* em sistema fechado com tampa porosa. 169

Figura 60 - Representação dos sistemas para avaliação da resposta do biossensor à presença ou ausência de H_2S e suspensão celular. 172

Figura 61 - Resposta do biossensor para misturas de suspensão celular e soluções de H_2S em concentrações 25 $mg.L^{-1}$ (linha azul) e 70 $mg.L^{-1}$ (linha vermelha). 173

Figura 62 - Ensaios de controle para determinação da origem da resposta do biossensor. As barras de erro representam os desvios padrão (n=2). 175

Figura 63 - Espectro de absorção UV-Vis de soluções contendo as espécies químicas H_2S, $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} e NaCl. 176

Figura 64 - Resposta do biossensor para soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} utilizando cultivos de *A. thiooxidans* com diferentes tempos de crescimento. (a) 4 dias; (b) 6 dias; (c) 7 dias e (d) 9 dias. 178

Figura 65 - Curva de crescimento para *A. thiooxidans* e influência do tempo de cultivo na resposta do biossensor para soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} e dispersões celulares de DO_{620} igual a 2,0 e pH 2. As barras de erro representam os desvios padrão correspondentes. 180

Figura 66 - Influência da redução do valor de pH de 3,05 para 1,85 na resposta espectrofotométrica de suspensão celular submetida a estarvação. Suspensão celular 2,2 g.L^{-1} e solução de H_2S 50 mg.L^{-1}. 182

Figura 67 - Influência da variação de pH no perfil de aumento de absorbância em 620nm para análise de soluções de H_2S 30 mg.L^{-1} a partir de dispersões celulares de concentração 2,2 g/L. As curvas de cada gráfico são repetições em mesmas condições. Gráficos: a, pH = 0,5; b, pH = 1,0; c: pH = 2,0; d, pH = 3,0; e, pH = 4,0. 184

Figura 68 - Análise gráfica dos resultados obtidos para repetitividade de respostas do biossensor óptico. Gráfico a: distância entre os valores de absorbância de cada análise (azul) e a média amostral (vermelho); Gráfico B: valor de Z-score para cada análise. 189

Figura 69 - Avaliação da reprodutibilidade do biossensor óptico. As barras azuis representam os valores médios de resposta obtidos em cada dia de análise. As barras verticais são o desvio padrão das respostas em cada dia. A linha horizontal representa a média de resposta entre os diferentes dias de análise. 193

Figura 70 - Resposta do biossensor óptico para concentrações de H_2S até 10 mg.L^{-1}. As barras verticais representam o desvios padrão para medidas na ausência de H_2S (n=10) e para soluções de H_2S de concentração 5 mg.L^{-1} e 10 mg.L^{-1} realizadas em duplicata. 194

Figura 71 - Resposta do biossensor óptico para concentrações de H_2S 5 mg.L^{-1} e 10 mg.L^{-1} com taxa de aquisição de sinal igual a 5 s. As barras verticais representam os desvios padrão para triplicatas de cada concentração. 195

Figura 72 - Respostas do biossensor óptico para diferentes concentrações de H_2S obtidas a partir de dispersões celulares em pH 1 e concentração 0,22 g.L^{-1}. Gráficos: a, 15 mg.L^{-1}; b, 25 mg.L^{-1}; c, 30 mg.L^{-1}, d, 50 mg.L^{-1}; e, 70 mg.L^{-1}; f, 100 mg.L^{-1}. Cores diferentes representam nos gráficos medidas obtidas em dias diferentes. 196

Figura 73 - Resposta do biossensor para diferentes concentrações de H_2S agrupados em função do tempo de resposta. As barras verticais representam o desvio padrão para cada medida. 199

Figura 74 - Efeito do aumento de concentração no valor máximo de absorbância para soluções de H_2S entre 15 e 100 mg.L^{-1}. 200

Figura 75 - Curva de calibração entre a resposta espectrofotométrica e a concentração de sulfeto de hidrogênio. A linha azul representa a linha de 202

tendência para uma relação linear com interseção não definida. As barras verticais representam os desvios padrão para cada concentração.

Figura 76 - Resposta em 620nm para mistura de soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} e interferentes iônicos na ausência de células. Linha azul, solução 1000 µmol.L^{-1} de íons da Tabela 30; linha vermelha, meio ATCC 125. 207

Figura 77 - Resposta do biossensor óptico para análise de solução de sulfeto de hidrogênio 30 mg.L^{-1} contendo íons em concentração característica de água produzida. As barras verticais representam os desvios padrão (n=5). 209

Figura 78 - Resposta do biossensor óptico para análise de solução de água produzida adicionada de 30 mg.L^{-1} de H_2S. As barras verticais representam os desvios padrão (n=3). 211

Figura 79 - Resposta do biossensor potenciométrico para soluções de água de produção contendo H_2S em concentração 30 mg.L^{-1} e 50 mg.L^{-1}. 213

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1 - Relação entre a taxa de consumo de oxigênio (OUR) e a taxa de consumo de enxofre (SUR) por *A. thiooxidans* (JENSEN et al, 2011). 68

Tabela 2 - Meio de cultura para *Acidithiobacillus thiooxidans* (WAKSMAN; JOFFE, 1922). 70

Tabela 3 - Meio de cultura para *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™. 71

Tabela 4 - Diferentes composições de meios de crescimento para *A. thiooxidans*. 72

Tabela 5 - Meio de cultivo para *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™ 96

Tabela 6 - Meio de cultivo para *Acidithiobacillus thiooxidans* 9K estritamente mineral (SILVERMAN; LUNDGREEN, 1959). 97

Tabela 7 - Meio de cultivo para *Acidithiobacillus thiooxidans* OMG (LIU et al, 2003). 97

Tabela 8 - Níveis do fatorial completo 2^3 para condições de crescimento de *A. thiooxidans*. 99

Tabela 9 - Parâmetros dos experimentos de fatorial completo 2^3. 100

Tabela 10 - Condições experimentais aplicadas aos reatores em sistema fechado para consumo de H_2S por *A. thiooxidans* (DO_{620}=2,0). 102

Tabela 11 - Composição da água produzida coletada de Terminal da Petrobras em São Sebastião, São Paulo. Adaptado de Andrade (2009). 108

Tabela 12 - Discriminação das condições experimentais para determinação da resposta espectrofotométrica à ausência de células e de H_2S. 112

Tabela 13 - Avaliação da filtração como método de remoção de enxofre de cultivos de *A. thiooxidans* através da absorbância em 620 nm de dispersões celulares obtidas ao final de diferentes etapas de filtração. 115

Tabela 14 - Resultados de absorbância para os experimentos do planejamento fatorial 2^3. 118

Tabela 15 - Resultado de ANOVA para o fatorial completo 2^3 considerando todos os fatores principais e suas interações. 128

Tabela 16 - Absorbância das dispersões utilizadas para determinação da curva de peso seco celular. 129

Tabela 17 - Condições experimentais aplicadas aos reatores em sistema fechado com tampa de borracha para consumo de H_2S por *A. thiooxidans*. 133

Tabela 18 - Variação de potencial para sistema fechado com tampa porosa em função do tempo de estarvação celular para solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ e suspensão celular 2,2 $g.L^{-1}$ em pH 2,5. 136

Tabela 19 - Resposta potenciométrica após 3 h de reação para concentrações de H_2S entre 30 e 50 mg.L^{-1} empregando o reator fechado com tampa porosa em pH 2. 143

Tabela 20 - Resposta potenciométrica em função da variação de pH para análise de soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} em sistema fechado com tampa porosa. 145

Tabela 21 - Respostas potenciométrica e iodométrica ao consumo de H_2S por *A. thiooxidans* em sistema fechado. 146

Tabela 22 - Resultados de absorbância para 13 medições sucessivas utilizando o biossensor óptico com dispersões celulares em pH 1 e de concentração 2,2 g.L^{-1}. 160

Tabela 23 - Análise de possível *outlier* através do Teste Tau Modificado de Thompson. 166

Tabela 24 - Resposta do biossensor óptico para soluções de H_2S de concentração 30 mg.L^{-1} em pH 1 e concentração celular 2,2 g.L^{-1} obtidos em diferentes dias. 188

Tabela 25 - Análise da existência de *outliers* para as medidas de reprodutibilidade. 190

Tabela 26 - Respostas do biossensor para concentração de H_2S 30 mg.L^{-1} em diferentes tempos de reação para cultivos diferentes utilizados em dois dias de análise. 192

Tabela 27 - Caracterização da resposta do biossensor óptico para concentrações de H_2S entre 15 e 100 mg.L^{-1}. 193

Tabela 28 - Resposta do biossensor na presença de diversas espécies iônicas. As medidas correspondem à razão entre o valor de absorbância no estado estacionário na presença de interferentes e para soluções contendo apenas suspensão celular e sulfeto de hidrogênio. 197

Tabela 29 - Aumento de absorbância em função do tempo de reação para análise de solução de H_2S contendo íons característicos de água de produção. 201

Tabela 30 - Comparação entre os parâmetros de performance dos biossensores óptico e potenciométrico. 205

Tabela 31 - Aumento de absorbância em função do tempo de reação para análise de solução de H_2S contendo íons característicos de água de produção. 210

Lista de Quadros

	Página
Quadro 1 - Relação entre dose e efeito para H_2S sobre a saúde humana (ANTUNES, 2006).	30
Quadro 2 - Exemplos de bactérias oxidantes de enxofre. Adaptado de Vidyalakshmi et al. (2009).	53
Quadro 3 - Faixa de pH ótimo de crescimento para bactérias dos gêneros *Thiobacillus* e *Acidithiobacillus* (ISLANDER et al, 1991).	57
Quadro 4 - Espécies químicas analisadas por biossensores potenciométricos (MELO, 2009).	81
Quadro 5 - Eficiência e pH ótimo de operação de biofiltros para remoção de H_2S empregando bactérias *A. thiooxidans*.	186

Sumário

1. INTRODUÇÃO 23

2. OBJETIVOS 25

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL 25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

3.1 SULFETO DE HIDROGÊNIO – ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO 27
3.2 ASPECTOS DA CORROSÃO POR H_2S 31
3.3 PETRÓLEO, ÁGUA PRODUZIDA E H_2S 34
3.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE H_2S 36
3.4.1 CONTRA-TITULAÇÃO COM SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 37
3.4.2 MEDIÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA COM AZUL DE METILENO 38
3.4.3 DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE SULFETOS VOLATILIZÁVEIS POR ACIDIFICAÇÃO (SVA) 38
3.4.4 SENSOR BIODEGRADÁVEL INDICADOR DE H_2S 40
3.4.5 MICRO-SENSOR INTERFEROMÉTRICO NANOPOROSO 40
3.4.6 DETERMINAÇÃO DE H_2S POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ASSOCIADA A DETECTOR POR CONDUTIVIDADE TÉRMICA (DTC) OU IONIZAÇÃO EM CHAMA (DIC) 42
3.4.7 DETERMINAÇÃO DE H_2S POR DETECTOR DE QUIMILUMINESCÊNCIA 44
3.4.8 DETERMINAÇÃO DE H_2S POR DETECTOR FOTOMÉTRICO DE CHAMA 45
3.4.9 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE H_2S 46
3.4.10 DETERMINAÇÃO DE H_2S POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (AA) 47
3.4.11 DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE H_2S COM ELETRODO ÍON-SELETIVO 48
3.4.12 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE H_2S 49
3.4.13 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE H_2S 50
3.5 BACTÉRIAS OXIDANTES DE ENXOFRE (SOB) 51
3.6 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DE SOB 58
3.7 *ACIDITHIOBACILLUS THIOOXIDANS* 63
3.8 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO PARA *A. THIOOXIDANS* 70
3.9 BIOSSENSORES ÓPTICOS 75
3.10 BIOSSENSORES POTENCIOMÉTRICOS 79
3.11 BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE H_2S 82

4. MATERIAIS E MÉTODOS 91

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES 91
4.1.1 EQUIPAMENTOS 91
4.1.2 REAGENTES 92
4.1.3 MICRO-ORGANISMO 94
4.2 REMOÇÃO DE ENXOFRE DISPERSO EM CULTIVOS DE *A. THIOOXIDANS* 95
4.3 DEFINIÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO 95
4.3.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO 96

4.3.2 Estudo da influência da condição de agitação 98
4.3.3 Estudo da influência da concentração de enxofre no crescimento 98
4.3.4 Estudo da influência da concentração de inóculo no crescimento bacteriano 99
4.3.5 Otimização das condições de cultivo variando o pH inicial, a concentração de enxofre e a temperatura 99
4.4 Curva de crescimento e determinação da concentração celular 100
4.4.1 Determinação do peso seco celular 101
4.5 Ensaios com o Biossensor Potenciométrico 101
4.5.1 Experimentos em sistema fechado com tampa de borracha 102
4.5.2 Experimentos em sistema fechado com tampa porosa 103
4.5.3 Experimentos utilizando o reator fechado com tampa de teflon 104
4.6 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação entre a resposta potenciométrica e a titulação iodométrica 108
4.7 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação da resposta potenciométrica e por espectrofotometria 110
4.8 Ensaios com o Biossensor Óptico 110
4.8.1 Preparo das dispersões celulares para aplicação no biossensor óptico 110
4.8.2 Caracterização da resposta espectrofotométrica 111
4.8.3 Influência do tempo de cultivo celular na resposta espectrofotométrica 112
4.8.4 Influência da variação de pH na resposta espectrofotométrica 113
4.8.5 Repetitividade e reprodutibilidade da resposta espectrofotomética 113
4.8.6 Influência da concentração de H_2S na resposta espectrofotométrica 114
4.8.7 Influência de possíveis espécies químicas interferentes 114
4.9 Ensaios com amostra real – Água produzida 115

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 117

5.1 Estudo da remoção de enxofre do meio crescido 117
5.2 Determinação do meio de cultura 119
5.3 Influência da condição de agitação 120
5.4 Influência da concentração de inóculo 122
5.5 Influência da concentração de enxofre no meio de crescimento 124
5.6 Determinação das melhores condições de cultivo 127
5.7 Curva de peso seco celular 133
5.8 Desenvolvimento do biossensor potenciométrico 135
5.8.1 Experimentos em sistema fechado com tampa de borracha 136
5.8.2 Experimentos com o reator na configuração 1 138
5.8.3 Experimentos com o reator na configuração 2 140
5.8.4 Experimentos em sistema fechado com tampa porosa 141
5.8.5 Experimentos com o reator na configuração 3 148
5.9 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação entre resposta potenciométrica e titulação iodométrica 166
5.10 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação entre resposta potenciométrica e por espectrofotometria 168
5.11 Desenvolvimento do biossensor óptico 171
5.11.1 Resposta do biossensor para diferentes concentrações de sulfeto de hidrogênio, à ausência de células e à ausência de H_2S 172

5.11.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS H_2S, $SO_4^=$, $S_2O_3^=$ E NACL _ 176
5.11.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO CELULAR NA RESPOSTA ESPECTROFOTOMÉTRICA _____ 177
5.11.4 INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DE PH NA RESPOSTA ESPECTROFOTOMÉTRICA _____ 181
5.11.5 REPETITIVIDADE DA RESPOSTA ESPECTROFOTOMÉTRICA _____ 188
5.11.6 REPRODUTIBILIDADE DA RESPOSTA ESPECTROFOTOMÉTRICA _____ 191
5.11.7 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE H_2S NA RESPOSTA ESPECTROFOTOMÉTRICA 194
5.11.8 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO BIOSSENSOR ÓPTICO _____ 200
5.11.9 INFLUÊNCIA DE POSSÍVEIS ESPÉCIES QUÍMICAS INTERFERENTES _____ 204
5.12 ENSAIOS COM AMOSTRA REAL – ÁGUA PRODUZIDA _____ 208

6. CONCLUSÕES _____ 215

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ 217

1. Introdução

Segundo dados do Fundo de População das Nações Unidas (Fnuap) a população mundial alcançou 7 bilhões de pessoas em 2010, havendo uma estimativa para um aumento de mais 2 bilhões de pessoas até 2050 (UNFPA, 2016). Este rápido crescimento populacional impulsiona a indústria no sentido de suprir uma demanda crescente por bens, produtos, tecnologia e combustíveis. Como consequência direta observamos a estagnação de reservas minerais e outras fontes naturais de matérias-primas. Outra importante consequência é a geração de lixo e resíduo industrial em ampla escala e diversidade, sendo produzidas e lançados no ambiente nos últimos anos mais de 100.000 novos compostos de toxicidades desconhecidas, com sérias consequências ambientais e para saúde humana (GINKEL et al, 2010).

As autoridades governamentais têm criado leis severas de restrição quanto ao uso, descarte e produção de substâncias e resíduos, como metais pesados, substâncias orgânicas potencialmente carcinogênicas, gases de emissão veicular e industrial. O reuso e reciclagem são estimulados, transformando resíduos em substâncias inócuas ou de menor toxicidade, sendo preferencialmente reaproveitadas no processo produtivo, em sistema fechado ou encadeado (CONAMA, 2002).

Buscando atender a esta nova filosofia produtiva e às leis mais restritivas de lançamento de resíduos, tornam-se importante o monitoramento e as análises qualitativa e quantitativa de substâncias participantes dos processos químicos industriais.

Dentre as diversas substâncias tóxicas envolvidas nos processos industriais, e merecedoras de um rígido controle, ganha especial destaque o sulfeto de hidrogênio (H_2S), em função de sua alta toxicidade e dos sérios riscos à saúde a que estão expostas as pessoas que trabalham em ambientes ligados à geração ou estocagem deste gás. O Órgão de Segurança e Saúde Pública dos Estados Unidos – OSHA (Occupational Safety and Health Administration) registrou, no período de 1984 a 1994, 1480 menções sobre contaminações diretas e indiretas com H_2S, ocorrendo 80 mortes, sendo 18 destas relacionadas à produção e refino de gás natural e petróleo (MAINIER; ROCHA, 2003).

Além de sua alta toxicidade, o H_2S é um gás altamente corrosivo, participando de processos químicos e bioquímicos de corrosão. Esses podem ocorrer por ataque químico direto do gás sobre o ferro, pelo ataque de íons produzidos na ionização total ou parcial do H_2S em meio aquoso, ou pela corrosão microbiologicamente induzida (CMI), a partir de produtos do metabolismo de fungos e bactérias, quando ocorre a formação de um biofilme aderido à superfície do metal. Este último é um caso bastante comum na indústria do petróleo, quando as condições anaeróbias e a disponibilidade de nutrientes favorecem a ação de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que em seu metabolismo reduzem sulfato a sulfeto, com consequente corrosão do substrato metálico (BARTON; HAMILTON, 2007).

Diversos métodos tradicionais de análise são conhecidos e aplicados na determinação de H_2S, como medida espectrofotométrica por reação com azul de metileno (LODGE, 1989; SILVA et al, 2011), cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC) associada a detector por condutividade térmica (DÍAZ et al, 2011) e a detector por ionização em chama (ADÁNEZ et al, 1998). O uso destes métodos é limitado pela disponibilidade e alto investimento em equipamento e mão de obra especializada, que restringem sua aplicação (REDONDO et al, 2008). Neste contexto, há um crescente estímulo ao desenvolvimento de biossensores como nova tecnologia analítica, por potencialmente apresentar seletividade, sensibilidade, portabilidade, robustez, repetitividade e reprodutibilidade, e, especialmente, pela possibilidade de reduzir os custos analíticos (ORTIZ et al, 2007).

O conhecimento dos riscos laborais e dos problemas econômicos associados à alta toxicidade do sulfeto de hidrogênio e ao seu caráter corrosivo motivaram o desenvolvimento, ao longo deste trabalho, de um biossensor seletivo e específico, capaz de reconhecer e quantificar o H_2S presente em meio aquoso. Os biossensores constituem uma importante ferramenta analítica alternativa aos métodos tradicionais, utilizada com êxito na determinação de diversas substâncias de interesse, como glicose, ureia, fenol, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio (TAK; GUPTA; TOMAR, 2015; RABTI; ARGOUBI; RAOUAFI, 2016; HUA et al, 2016; DEB et al, 2016). Entretanto, trabalhos publicados envolvendo a determinação de H_2S através de biossensores são raros, e até 2013 não foi encontrado na literatura trabalho evolvendo

a determinação de H_2S através de biossensores microbianos. Estes ainda são escassos e nenhum envolve o elemento biorreceptor ou as características de construção propostas neste trabalho, o que o caracteriza como um projeto de caráter inovador.

A etapa inicial de construção do biossensor envolveu a determinação, a partir de pesquisa bibliográfica aprofundada, do elemento de reconhecimento biológico e do método de transdução adequados à detecção de H_2S. Como elemento biorreceptor foram escolhidos os micro-organismos da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans*, em função de sua alta taxa de oxidação de compostos reduzidos de enxofre, de seu caráter quimiolitotrófico, de sua alta atividade em meio de alta acidez, e da geração de íons H^+ e enxofre elementar como principais metabólitos durante a oxidação de H_2S.

O elemento transdutor deve converter um sinal químico, neste caso a geração de íons H^+ e enxofre elementar, em sinais mensuráveis e proporcionais à concentração de analito. Assim, foram utilizados neste trabalho dois transdutores, um potenciométrico, com eletrodo sensível a íons hidrogênio e outro óptico, a partir de medidas espectrofotométricas. Definidos os elementos de construção dos biossensores, a metodologia aplicada neste trabalho envolveu a definição das condições ótimas de crescimento e utilização do micro-organismo nos biossensores para determinação de H_2S em diferentes concentrações em meio aquoso.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

Desenvolver biossensores microbianos para determinação da concentração de H_2S em meio aquoso, utilizando transdutores potenciométrico e óptico, empregando bactérias da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans,* estirpe FG-01, como elemento de reconhecimento biológico.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo principal deste trabalho foram definidas etapas a serem alcançadas a partir da revisão bibliográfica aprofundada sobre o tema. Foram realizados experimentos preliminares para caracterização do micro-organismo, suas condições ideais de crescimento e metabolismo, até os experimentos que concretizaram sua aplicação no biossensor. Estas etapas foram divididas em objetivos específicos, relatados a seguir.

- ✓ Definição do micro-organismo e estudo de suas características metabólicas. Escolha do método de transdução empregado no biossensor, baseado nos metabólitos responsáveis pelas respostas dos biossensores, do meio de aplicação investigado e dos parâmetros de caracterização e construção dos biossensores.

- ✓ Determinação da curva de crescimento e identificação das condições ótimas de cultivo do micro-organismo.

- ✓ Definição do projeto e acompanhamento da construção do biorreator utilizado no biossensor potenciométrico.

- ✓ Escolha do método tradicional de dosagem de H_2S visando validar os resultados dos biossensores.

- ✓ Otimização das condições de sistema para aplicação dos biossensores, verificando a influência de fatores como tempo de cultivo, pH e concentração celular nas respostas dos biossensores.

- ✓ Identificação de parâmetros de desempenho como tempo de resposta, curva de calibração, faixa de linearidade, seletividade, repetitividade e reprodutibilidade.

- ✓ Verificação das respostas dos biossensores empregando amostras reais de água produzida contendo sulfeto de hidrogênio.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Sulfeto de hidrogênio – Origem e Caracterização

O sulfeto de hidrogênio (H_2S), também denominado gás ácido ou gás sulfídrico, é um gás incolor, inflamável, de cheiro desagradável característico, extremamente tóxico e corrosivo (MAINIER et al, 2007). Em concentrações próximas a 100 $mg.L^{-1}$ esta substância produz um efeito narcótico sobre as células sensitivas de odor, não permitindo sua detecção por pessoas expostas a este gás, que podem sofrer inconsciência e danos cerebrais permanentes. Concentrações próximas a 600 $mg.L^{-1}$ em volume podem levar uma pessoa à morte em menos de 15 minutos (REDONDO et al, 2008, DURSUN, 2006). Anualmente são liberados no mundo cerca de 100 milhões de toneladas de H_2S, devendo por estes motivos ter sua quantidade liberada para o ambiente controlada de forma rigorosa, preferencialmente *in situ* (WANG et al, 2002).

As fontes de H_2S são diversas, podendo ser originado através de processos naturais ou industriais. É formado na natureza entre os gases vulcânicos e como um produto de processos bacterianos originários da decomposição de plantas ou de proteína animal (MAINIER et al, 2003).

Embora o sulfeto de hidrogênio seja gerado em processos naturais, os principais problemas ambientais e de biossegurança estão relacionados às suas diversas fontes antropogênicas. O H_2S é produzido na indústria do papel, coque e asfalto. Também é usado como reagente e como intermediário na preparação de outros compostos reduzidos contendo enxofre, e é subproduto do processo de dessulfurização de óleo e gás, tratamento de resíduos e curtimento do couro (COLLINS; LEWIS, 2000). Entretanto, a produção de H_2S é geralmente associada às minas de carvão, depósitos salinos, tratamento de esgoto e de alguns efluentes industriais e aos campos de petróleo, gás natural, refinarias e petroquímicas (SANDRES; MAINIER, 2009).

A geração de H_2S associada à indústria do petróleo e gás natural tem recebido especial atenção nos últimos anos, especialmente em função do grande volume e das altas concentrações de H_2S envolvidos nestes processos, que podem alcançar

concentrações de 500 a 20.000 ppm durante a produção de biogás em digestores anaeróbios e podendo alcançar até 100.000 ppm tanto no gás natural quanto no petróleo bruto, dependendo da formação geológica (REDONDO et al, 2008).

Outras importantes fontes de H_2S associadas à indústria petroquímica são a formação microbiológica por bactérias redutoras de sulfato (BRS) e o processo de remoção de enxofre elementar durante a hidrodessulfurização (HDS) de petróleo, diesel e gás natural.

A necessidade de injeção de água do mar para prospecção em poços de petróleo maduros promove altas concentrações de sulfato, que associada às condições anaeróbias de extração criam um ambiente favorável ao desenvolvimento das BRSs. Essas bactérias reduzem em seu metabolismo íons sulfato a sulfeto, que hidrolisam gerando H_2S, considerado uma das principais causas de corrosão em linhas e equipamentos, que além do custo financeiro da corrosão podem acarretar acidentes com consequências desastrosas (TRACKER et al, 2010, ALMEIDA et al, 2009).

O óleo pesado possui um teor de enxofre que varia entre 0,03 e 7,89 % (m/m), dependendo do local de sua exploração, e seus destilados apresentam uma significativa quantidade de compostos organosulfurados, como cicloalquiltiois, alquil e aril tioéteres e compostos heterocíclicos como tiofeno e seus derivados. Este último grupo inclui policíclicos aromáticos saturados (PASH), como benzotiofeno, dibenzotiofeno e seus derivados alquilados. A remoção destes compostos desperta especial interesse, pois além de serem altamente tóxicos, são recalcitrantes aos processos tradicionais de redução do teor de enxofre em combustíveis fósseis (MERCUZA et al, 2007).

O processo utilizado atualmente para remoção de compostos sulfurados dos derivados de petróleo é a hidrodesulfurização (HDS). Neste processo os compostos de enxofre são hidrogenados com gás hidrogênio, na presença de um catalisador de óxido de cobalto e molibdênio (CoMo), provocando a formação de sulfeto de hidrogênio. O H_2S gerado é posteriormente reduzido a enxofre elementar por um processo de reforma com vapor em reatores de dessulfurização. Entretanto, este processo acarreta a formação de grande quantidade de sulfeto de hidrogênio, que

deve ser armazenado e atravessa diversas partes do sistema para recuperação do hidrogênio (FERREIRA et al, 2002).

A geração de H_2S por processo de HDS torna-se especialmente importante após as novas regulamentações de teores de enxofre em óleo diesel. A fase P7 do PROCONVE (Programa de Controle de Emissões Veiculares) além de trazer redução nos limites de emissão de óxidos de nitrogênio e materiais particulados, estabeleceu que a partir de 2012 os veículos a diesel fossem abastecidos com o S50, com 50 $mg.L^{-1}$ de enxofre. A fase P7 ainda estabeleceu que a partir de 2013, o S50 fosse substituído pelo S10, com apenas 10 $mg.L^{-1}$ de enxofre, sendo o diesel contendo 1800 $mg.L^{-1}$ de enxofre proibido de ser comercializado a partir de 2014 conforme resolução da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível) nº 65 de 9 de dezembro de 2011 e Resolução do CONAMA 403 de 11 de novembro de 2008 (SANT'ANNA, 2011).

Portanto, houve uma séria redução nos teores de enxofre em combustíveis fósseis, e estes novos limites envolvem sérias adequações das refinarias, visto que no petróleo, gás natural e coquerias o H_2S é transformado em enxofre elementar de alta pureza nas Unidades de Recuperação de Enxofre (URE) principalmente através do processo Claus, cuja principal reação é representada a seguir (KULAIF, 2009).

$$2\ H_2S_{(g)} + SO_{2(g)} \rightarrow 3\ S_{(s)} + H_2O_{(g)} \qquad \text{Equação 1}$$

Os efeitos do H_2S sobre a saúde são diversos em função do grau de exposição, como relatado no Quadro 1, sendo este gás detectado pelo olfato apenas em baixas concentrações. Esta característica aumenta o risco de acidentes em ambientes laborais ligados ao refino de petróleo e tratamento de esgoto. Durante um acidente envolvendo vazamento de H_2S, cinco, de oito funcionários que instalavam tubulações de esgoto, morreram intoxicados, com edema pulmonar e hemorragia na mucosa gástrica (GREGORAKOS et al, 1995). Em outro acidente, dois funcionários morreram por intoxicação após um vazamento de gás natural contaminado com H_2S na plataforma P-37 da Petrobras (BALBI, 2001). Diversos outros acidentes envolvendo plantas de remoção de H_2S em gás natural, vazamentos em refinarias de petróleo,

fábricas de produtos químicos e gasodutos são relatados em várias partes do mundo com consequentes intoxicações e mortes (SANDRES; MAINIER, 2009).

Quadro 1 - Relação entre dose e efeito para H_2S sobre a saúde humana (ANTUNES, 2006).

Concentração de H_2S (ppm)	**Efeito na saúde humana**
0,1	Odor detectável.
3	Odor ofensivo.
10	Dor de cabeça, náusea, garganta e olhos irritados.
50	Danos nos olhos.
100	Perda de olfato, conjuntivite, dificuldades respiratórias.
300	Edema pulmonar.
500	Forte estimulação nervosa.
500-700	Perda de consciência e possibilidade de morte em 30-60 minutos.
700-1000	Perda de consciência rápida.
1000-2000	Colapso respiratório imediato, paralisia, morte em alguns minutos.

Em resumo, o desenvolvimento de tecnologias de remoção ou redução do teor de H_2S em misturas líquidas e gasosas tem sido estimulado por uma série de fatores, como:

- A alta toxicidade e corrosividade do sulfeto de hidrogênio;
- O grande volume de gás sulfídrico gerado em diversos processos naturais e industriais;
- A possibilidade de exposição a graves acidentes envolvendo vazamento de H_2S;

- Os altos custos de manutenção e prevenção decorrentes do processo de corrosão de equipamentos e linhas de transmissão de petróleo e gás natural;

- A necessidade de adequação da indústria petroquímica às novas legislações ambientais que reduzem o teor de H_2S em combustíveis.

Em decorrência destes fatores há a necessidade de controle da concentração de H_2S em ambientes naturais e industriais, estimulado o desenvolvimento de tecnologias de quantificação de H_2S através de métodos não apenas alternativos aos métodos tradicionais, mas que sejam comercialmente competitivos.

3.2 Aspectos da Corrosão por H_2S

Uma pesquisa realizada pelo U.S. Federal Highway Administration (FHWA) em 2002 estimou que os custos anuais diretos associados à corrosão metálica nos setores industriais, de infraestrutura e transporte nos Estados Unidos é da ordem de 276 bilhões de dólares, o que corresponde a aproximadamente 3,1 % de seu produto interno bruto. E que o custo associado à corrosão das linhas e dutos de transporte de líquidos e gases corresponde a 31 % do custo total associado à infraestrutura, ou aproximadamente 7 bilhões de dólares (KOCH et al, 2002).

Com relação ao Brasil, apesar de não existirem estudos completos sobre os prejuízos causados pela corrosão, é possível fazer uma estimativa utilizando um estudo global feito pela National Association of Corrosion Engineers (NACE) em 2016, onde o custo da corrosão para um país industrializado é de aproximadamente 3,4 % de seu PIB. Assim, estima-se que no Brasil os prejuízos decorrentes da corrosão ultrapassem 30 bilhões de dólares anuais (RIEDER et al, 2009; NACE, 2016).

O sulfeto de hidrogênio é um gás de importante caráter corrosivo. Participa de processos químicos e bioquímicos de corrosão, seja por ataque químico direto do gás sobre o ferro, seja pela formação de íons H_3O^+, HS^- e S^{2-} produzidos na ionização total ou parcial do H_2S em meio aquoso, que provocam ataque eletroquímico sobre o metal, ou pela corrosão microbiologicamente induzida (CMI), a partir de produtos do

metabolismo de bactérias, quando ocorre a formação de um biofilme aderido à superfície do metal (BARTON; HAMILTON, 2007).

A corrosão química pode ocorrer por ataque direto do H_2S anidro devido a sua adsorção na superfície do metal ou liga, formando uma película de sulfeto metálico e liberando gás hidrogênio. A corrosão eletroquímica associada a soluções aquosas contendo H_2S ocorre quando o metal ou liga está em contado direto com um eletrólito, e os íons H_3O^+ gerados por sua dissociação atacam o metal ou liga metálica, com formação de gás hidrogênio e consequente oxidação do metal. Quando o metal tem adsorvida uma película passivadora, por exemplo de um óxido deste metal, este tipo de ataque tende a formar corrosão por pite, característica do H_2S, que é um tipo de corrosão que expõe o material a sério risco de vazamento, pois pode apresentar grande profundidade em relação a seu diâmetro (VIDELA, 1996).

A corrosão pode reduzir drasticamente a integridade mecânica dos materiais por ataque químico. Em relação ao H_2S, por exemplo, sua presença pode reduzir a resistência à fadiga dos materiais que compõem *risers* de exploração *offshore* (fora da costa) em um fator de aproximadamente 10. Na presença de ranhuras, que agem como pontos de iniciação, a resistência à fadiga pode ser reduzida de um fator que chega a 100 (TRACKER et al, 2010).

Após longo período de exploração os poços brasileiros de extração de petróleo são considerados maduros, havendo a necessidade de injeção de grande quantidade de água de produção visando maximizar a extração do petróleo (OLIVEIRA FILHO et al, 2004). Após tratamento esta água é injetada nos poços ou descartada via emissário no mar ou efluentes. Esta água apresenta uma alta concentração de sulfato, em torno de 400 $mg.L^{-1}$. Esse ânion, em ambiente anaeróbio, e em presença de matéria orgânica, favorece o surgimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (SILVA et al, 2005).

As bactérias redutoras de sulfato são microrganismos anaeróbios estritos, embora existam espécies aerotolerantes, capazes de produzir esporos que as permitem sobreviver em ambientes inóspitos, podendo sobreviver e se multiplicar no interior do biofilme, protegidas por organismos aeróbios que tendem a ocupar suas

regiões externas, onde o oxigênio é mais abundante (CASTRO et al, 2000; BEECH; SUNNER, 2004).

Estas bactérias realizam a redução do íon sulfato, na qual este íon atua como agente oxidante para metabolização da matéria orgânica. As BRS podem utilizar os produtos finais de outras fermentações, tais como lactato, malato e etanol como doadores de H^+, oxidando estes compostos à acetato e CO_2 e reduzindo íons sulfato à sulfeto conforme as Equações 2 e 3 (ALMEIDA, 2005).

$$2\ C_3H_6O_3 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ C_2H_4O_2 + CO_2 + 8\ H^+ \qquad \text{Equação 2}$$

$$SO_4^{2-} + 8\ H^+ \rightarrow S^{2-} + 4\ H_2O \qquad \text{Equação 3}$$

A energia gerada é empregada na redução do sulfato a sulfeto. Nesse processo apenas uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, sendo a maior parte excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a sulfeto de hidrogênio livre (POSTGATE, 1984).

A biocorrosão constitui um problema para diversos segmentos industriais, tais como a indústria de petróleo, gás, energia e construção civil, atuando sobre os materiais de sistemas de resfriamento, tanques e dutos, cascos de embarcações, redes de distribuição de água e pontes, entre outros materiais, causando danos estruturais e interferindo na qualidade de produtos (VIVEROS et al, 2006).

A presença de BRS aderida ao biofilme formado na superfície do metal provoca caracteristicamente a corrosão por pite, representada no esquema da Figura 1. Embora este tipo de corrosão não envolva uma perda significativa de massa do metal, são usualmente profundas, provocando um sério dano estrutural às tubulações (VIDELA; HERRERA, 2004).

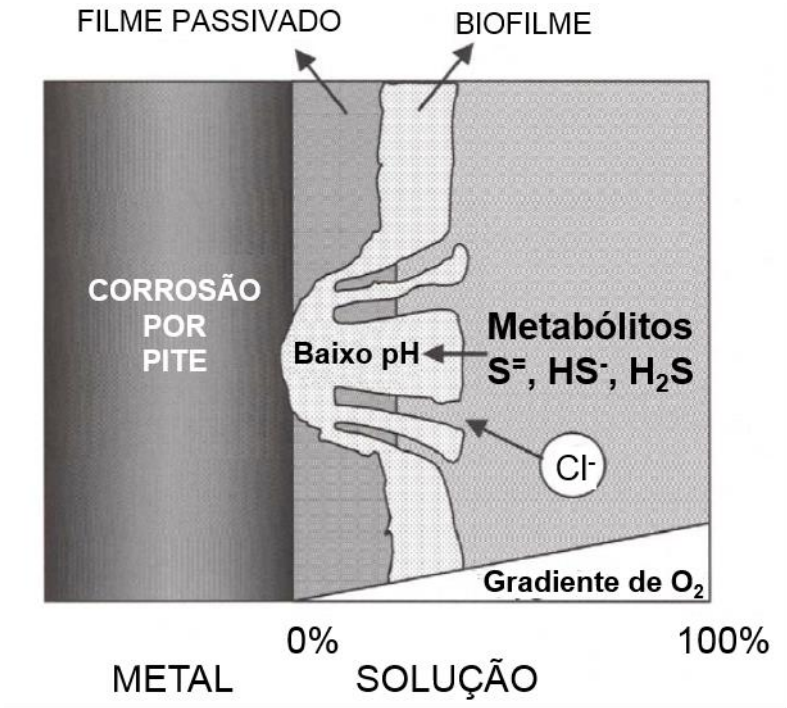


Figura 1 - Corrosão por pite provocada por bactérias. Adaptado de VIDELA e HERRERA (2004).

Assim, por conta de sua alta corrosividade, a agressividade do sulfeto de hidrogênio é também avaliada nos contatos com materiais e equipamentos, podendo resultar em deteriorações ou fraturas com consequências catastróficas (MAINIER et al, 2007).

3.3 Petróleo, água produzida e H_2S

O petróleo é majoritariamente encontrado em bacias sedimentares, formadas por camadas ou lençóis porosos de areia, arenitos ou calcários, onde o petróleo permanece alojado ocupando os poros rochosos. Sua composição é complexa e variável entre campos e poços de exploração, dependendo do tipo de hidrocarboneto predominante e da formação geológica (SZKLO, 2005). Embora essencialmente constituído por hidrocarbonetos, a análise elementar de óleo cru típico indica a presença de 0,6 a 8,0 % em massa de enxofre (THOMAS, 2001), presente como sulfeto de hidrogênio ou como organossulfurados, como tiofenos, mercaptanas, sulfatos alquílicos, sulfóxidos, sulfetos e dissulfetos (RIAZI, 2005). Outros elementos

como nitrogênio e oxigênio podem estar presentes formando ácidos orgânicos, compostos heterocíclicos e policíclicos aromáticos, fenóis e voláteis (NEFF et al, 2011).

A produção de petróleo no Brasil alcançou 2,19 milhões de barris por dia em 2011, representando um aumento de 60 % em relação a 2001. Os maiores produtores são os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, detendo aproximadamente 74 e 15 % da produção total nacional, respectivamente (MOTTA et al, 2013). A exploração da Bacia de Campos, que se estende pelos dois estados maiores produtores, iniciou em 1976. Dos 55 campos existentes hoje, 36 são considerados maduros, ou seja, já atingiram o pico de produção. Para aumentar o fator de recuperação destas áreas e equilibrar a pressão dos reservatórios a Petrobras realiza a injeção de água do mar nestes campos maduros (VASCONCELOS; LIGÓRIO, 2009).

Durante o processo de recuperação secundária a água de injeção introduzida nos reservatórios é misturada à água de formação, represada há milhões de anos em reservas geológicas de rochas sedimentares. Ao retornar à superfície, esta água produzida junto ao petróleo é denominada água de produção, água de processo ou água produzida (NEFF et al, 2011; VEIL et al, 2004).

A água produzida responde pelo maior volume de efluentes líquidos das atividades de produção do petróleo (AMINI et al, 2012). Sua geração aumenta conforme avança a exploração de um campo de petróleo, podendo alcançar mais de 90 % do volume total extraído do poço quando o campo se encontra em seu estágio final de produção econômica (ANDRADE, 2009). Segundo o Banco de Dados de Exploração e Produção (BDEP) da ANP, considerando a produção *onshore* e *offshore* no Brasil, em junho de 2015 a geração média de água produzida foi de pouco mais de 3,7 milhões de barris por dia (Vieira, 2016). O grande volume gerado e sua complexa composição configuram um desafio para a indústria petrolífera. São necessários tratamentos específicos, relacionados a aspectos operacionais e ambientais no gerenciamento adequado da água produzida, incluindo técnicas de separação, análises laboratoriais, tratamento, descarte, reuso ou reinjeção (VIEIRA, 2011).

A composição da água produzida é complexa e variada. Seus constituintes inorgânicos são semelhantes aos encontrados na água do mar, mas com salinidade

até seis vezes maior. Contém partículas de óleo em suspensão, metais pesados e aditivos como inibidores de corrosão e incrustação, micro-organismos, gases dissolvidos, desemulsificantes, biocidas e sequestrantes de H_2S (FIGUEREDO, 2014).

No caso de plataformas marítimas no Brasil, o descarte de água de produção deve atender à Resolução CONAMA nº 393 (Brasil, 2007). O principal parâmetro monitorado é o teor de óleos e graxas (TOG). Este é formado por uma mistura de diversos compostos incluindo parafinas, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), naftalenos, fenantrenos, dibenzotiofenos, fenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA).

O H_2S pode estar presente naturalmente na água produzida ou ser formado pela atividade de bactérias redutoras de sulfato (BRS), favorecida pela alta concentração de sulfato em ambiente anaeróbio, uma vez que o oxigênio não é encontrado naturalmente na água produzida. Segundo Segui (2009) a corrosão e o acúmulo de H_2S são os principais problemas envolvidos com a água produzida na indústria do petróleo, uma vez que essa água é reinjetada nos poços com o objetivo de aumentar a recuperação de óleo. A concentração de sulfeto solúvel na água de produção é variável, sendo encontrados de 6 a 8 $mg.L^{-1}$ em amostras provenientes da Bacia Sedimentar de Potiguar (FERREIRA, 2016) a cerca de 88 $mg.L^{-1}$ em amostras fornecidas pela Petrobras (SEGUI, 2009). As altas concentrações são características de campos que sofrem o fenômeno de *souring* biogênico ou acidificação biogênica dos reservatórios, que tem sido comum em campos da Petrobras (SOUZA, 2012).

3.4 Métodos de quantificação de H_2S

São relatados na literatura trabalhos envolvendo os mais diversos métodos de detecção de H_2S, como espectrofotométrico (GUENTHER et al, 2001), cromatográfico (HOWARD; YEH, 1998), polarográfico (CANTERFOLD, 1975) e potenciométrico (HASSAN et al, 2002). Esses métodos variam em função da precisão, necessidade de mão de obra especializada, custo e disponibilidade de equipamentos e tempo de análise. Alguns desses métodos são descritos a seguir.

3.4.1 Contra-titulação com solução de tiossulfato de sódio

Este é um método analítico quantitativo de bancada baseado na titulação de uma solução de iodo de concentração determinada. Inicialmente o H_2S é transformado em sulfeto de sódio a partir da reação 1, representada na Figura 2. O sulfeto de sódio formado é acidificado com solução de HCl 20 %, desprendendo H_2S segundo a reação 2, que é recolhido por destilação em 25,00 mL de solução de iodo 0,1 N, reagindo com o iodo segundo a reação 3. O excesso da solução de iodo, isto é, o iodo não consumido pelo H_2S é então contra-titulado com solução 0,1 N de $Na_2S_2O_3$ segundo a reação 4, empregando-se como indicador solução de amido a 1 % (OLIVEIRA FILHO et al, 2004).

Conhecendo-se o volume e a concentração da solução de iodo inicial determina-se a quantidade de H_2S. A quantidade de iodo consumida na contra-titulação determina o excesso de iodo da reação 3. A diferença entre estas quantidades é a quantidade de matéria de iodo consumido na reação 3, que pode ser estequiometricamente relacionado à quantidade de H_2S presente na amostra analisada. Uma vantagem desta análise é a ausência de um padrão interno, podendo ser utilizada para validação de outros métodos de análise.

Reação 1: $2\ NaOH + H_2S \longrightarrow Na_2S + 2\ H_2O$

Reação 2: $2\ Na_2S + 2\ HCl \longrightarrow 2\ NaCl + H_2S$

Reação 3: $H_2S + I_2 \longrightarrow 2\ HI + S$

Reação 4: $2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NaI$

Figura 2– Esquema de reações da contra-titulação com $Na_2S_2O_3$. Adaptado de Oliveira Filho et al. (2004).

3.4.2 Medição espectrofotométrica com azul de metileno

É um método útil para dosagem de H_2S em baixas concentrações e em misturas gasosas, na faixa de 7 a 70 $mg.m^{-3}$. O método consiste na passagem de determinado volume de mistura gasosa em solução de hidróxido de cádmio. O sulfeto presente é precipitado na forma de sulfeto de cádmio, evitando a oxidação pelo ar, e em frasco protegido de luz e na presença de arabinogalactana, buscando minimizar a fotodecomposição (LODGE, 1989).

A solução é fortemente acidificada, convertendo o sulfeto de cádmio em H_2S, que na presença de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina e cloreto férrico produz azul de metileno conforme a reação representada pela Figura 3.

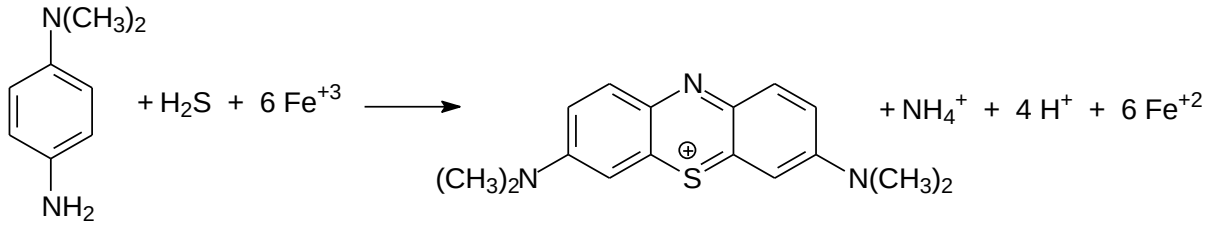


Figura 3 – Reação de obtenção do azul de metileno (LODGE, 1989).

O teor de H_2S é obtido por medição espectrofotométrica do azul de metileno formado, pela leitura da absorbância em 470 nm, relacionada a uma curva de calibração (LODGE, 1989).

3.4.3 Determinação potenciométrica de sulfetos volatilizáveis por acidificação (SVA)

Este método pode ser aplicado em amostras gasosas ou líquidas e é baseado no tratamento de sulfetos metálicos lábeis, como sulfeto ferroso, com ácido clorídrico e consequente formação de sulfeto de hidrogênio. O H_2S formado ao ser borbulhado em solução de pH elevado libera íons sulfeto que podem ser dosados potenciometricamente a partir de um eletrodo seletivo para íons $S^{=}$. Os potenciais obtidos são comparados com uma curva de calibração que relaciona a diferença de

potencial observada ao logaritmo da concentração de soluções padrão de concentração de sulfeto conhecida adicionados à amostra desconhecida.

A Figura 4 apresenta um esquema de construção do sistema de reação para obtenção de íons sulfeto livres em uma amostra gasosa (FAGNANI et al, 2012).

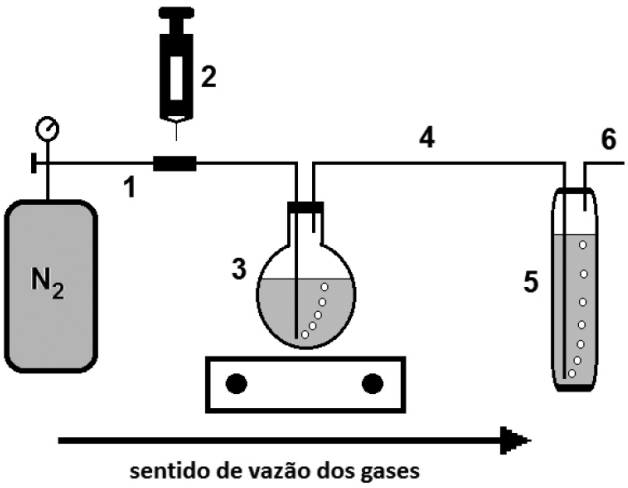


Figura 4 – Representação esquemática do sistema extrator para SVA. (1) entrada do gás de purga no sistema; (2) seringa para injeção de HCl(aq) no septo posicionado na linha de gás; (3) balão de extração, posicionado sobre um agitador magnético; (4) conexão entre o balão de extração e o frasco lavador, por onde fluirá o H_2S recém gerado; (5) frasco lavador contendo tampão básico antioxidante, responsável por reter os sulfetos; (6) saída do sistema para o ambiente (FAGNANI et al, 2012).

O cálculo da concentração de sulfeto (Equação 4), e consequentemente de H_2S, é obtido considerando-se um comportamento Nernstiniano e baseado na equação de Nernst modificada.

$$Cx = \frac{f \cdot Cs}{(1 + f) \cdot 10^{|\Delta E/s|} - 1} \qquad \text{Equação 4}$$

Sendo: Cx = concentração do analito na amostra ($mg.L^{-1}$); Cs = concentração do padrão ($mg.L^{-1}$); $|\Delta E|/s$ = módulo da diferença de potencial na amostra antes e depois da adição (mV); S = inclinação ou resposta do eletrodo (mV); f = razão do volume da adição de padrão para o volume da amostra.

3.4.4 Sensor biodegradável indicador de H_2S

Kato Junior et al. (2010) desenvolveram um sensor qualitativo indicador da presença de H_2S a partir da identificação colorimétrica visual de um cartão recoberto com indicador colorimétrico sensível a H_2S.

Neste trabalho uma solução filmogênica de quitosana foi misturada, em solução contendo ácido acético, à solução contendo o indicador colorimétrico. Folhas de papel cartão foram recobertas com esta solução e secas em estufa a 150 ºC por 90 segundos. O gás H_2S foi gerado em uma cúpula de 8 L a partir da reação química entre uma massa conhecida de sulfeto ferroso e excesso de solução de HCl 1 $mol.L^{-1}$. Resultado positivo para H_2S é obtido pela formação de uma mancha colorida sobre o filme contendo indicador. Neste caso, o sensor indica qualitativamente a presença de H_2S em concentração superior a um limite que não foi especificado no artigo (KATO JUNIOR et al, 2010).

3.4.5 Micro-sensor interferométrico nanoporoso

Kumeria et al. (2011) desenvolveram um sensor para detecção de compostos sulfurados voláteis, capaz de detectar H_2S em concentrações até 2 % (v/v). O trabalho descreveu a elaboração de um sensor baseado em espectroscopia de interferência reflectométrica. Um óxido de alumínio anódico (AAO) nanoporoso foi compactado e coberto com uma camada fina de ouro suportado em um microchip. Neste foi ligada uma pequena fibra ótica que mediu diferenças no índice de refração da luz. O esquema de construção deste micro-sensor é representado na Figura 5.

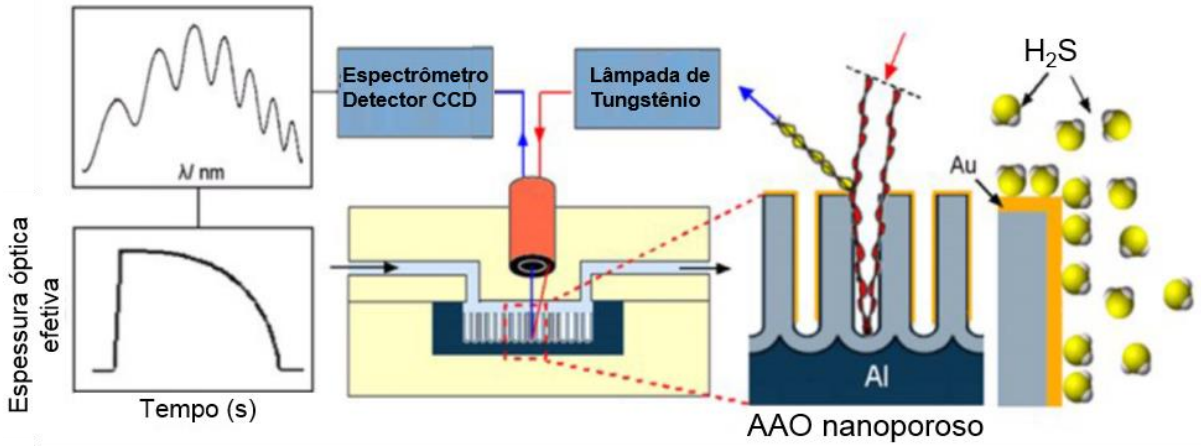


Figura 5 – Esquema de construção do sensor por espectroscopia de interferência reflectométrica para H_2S. Adaptado de Kumeria et al. (2011).

Neste método de detecção a luz branca sofre reflexão na parte inferior e superior dos nanoporos, gerando um padrão de interferência. Compostos que apresentam grupos sulfidrila (-SH) como o H_2S e as mercaptanas apresentam afinidade pelo ouro. A ligação de espécies moleculares como H_2S na superfície dos poros induz modificações no padrão de interferência de Fabry-Perot, provocando alterações no índice de refração da luz e em seu comprimento de onda. Estas modificações no comprimento de onda foram identificadas, quantificadas e associadas à concentração de H_2S. Resultados obtidos para este micro-sensor são apresentados na Figura 6.

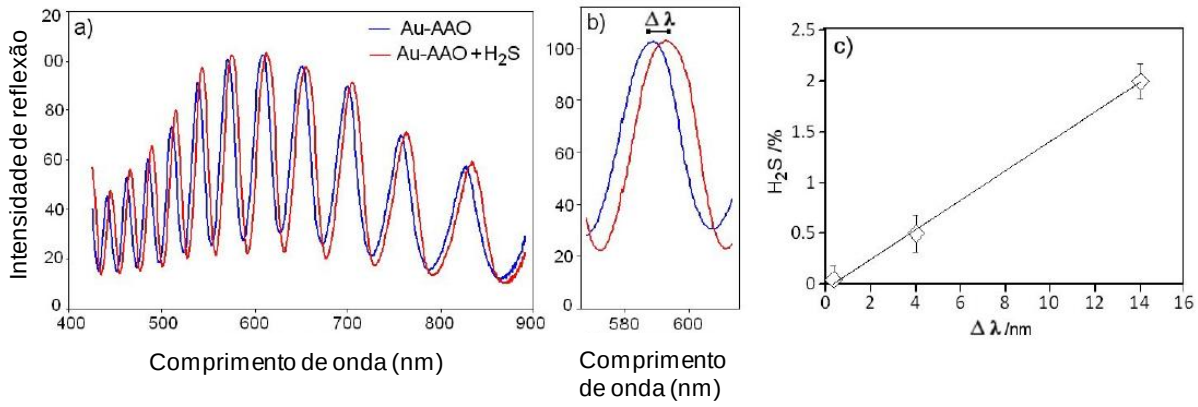


Figura 6 – Resposta de interferência de franjas Fabry-Perot para H_2S. (a,b) Espectro de interferência antes e depois de exposição ao sulfeto de hidrogênio. (c) Gráfico de dependência da modificação no comprimento de onda em função da concentração de analito. Adaptado de Kumeria et al. (2011).

Como pode ser observado na Figura 6a a presença de H_2S desloca o padrão de franjas de Fabry-Perot, provocando uma variação no comprimento de onda (Figura 6b), que pode ser associado de forma linear à concentração de analito, como representado na Figura 6c.

3.4.6 Determinação de H_2S por cromatografia gasosa (CG) associada a detector por condutividade térmica (DTC) ou ionização em chama (DIC)

A cromatografia gasosa é um método de separação de misturas baseado na diferença de afinidade entre os diferentes componentes da fase móvel e uma fase estacionária de característica específica para cada diferente grupo de analitos. Estas podem variar em polaridade, presença de grupos iônicos ou que realizem ligações de hidrogênio. Um gás de arraste inerte, como Hélio, Nitrogênio, Hidrogênio ou Argônio carreia a mistura através da coluna capilar ou empacotada, havendo a separação dos componentes que atravessam o sistema em diferentes tempos de eluição.

A cromatografia gasosa é um método de separação de componentes em uma mistura, devendo ser associado a um método de detecção e quantificação do analito, sendo normalmente associada a um detector de condutividade térmica (DCT), ionização em chama (DIC) ou a um espectrômetro de massas (EM).

Na cromatografia gasosa associada ao detector por condutividade térmica (CG-DTC) os diferentes gases eluídos apresentam diferentes condutividades térmicas. Quando a condutividade térmica é menor, a quantidade de calor transferido reduz e provoca um aumento de temperatura, que é detectado por um filamento metálico em contato com o sistema, conforme representado na Figura 7.

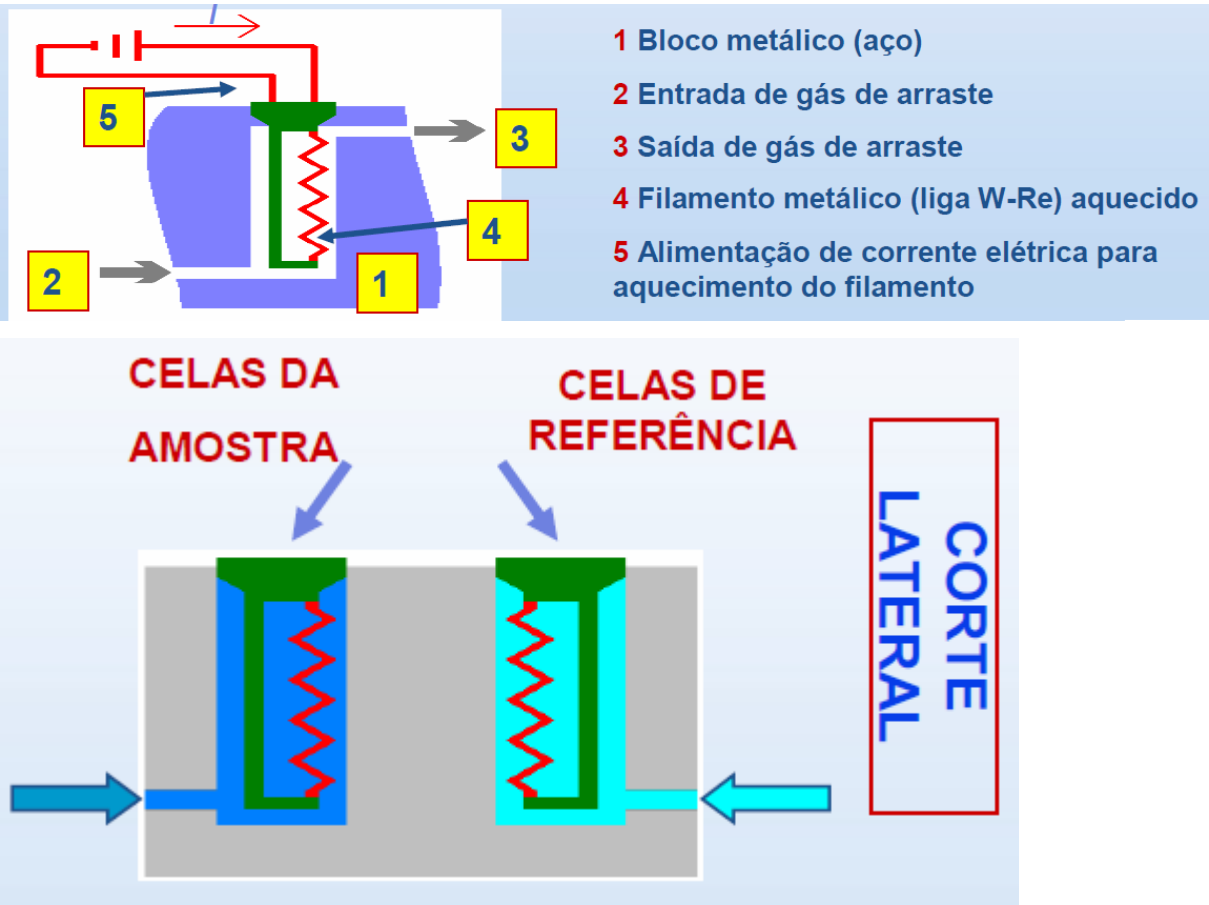


Figura 7 – Esquema de funcionamento de um detector por condutividade térmica (SHIMADZU, 2012).

Este aumento de temperatura provoca um aumento na resistência elétrica do condutor metálico, que é comparada à resistência observada em outro compartimento, contendo igual filamento metálico em contato apenas com o gás de carreamento. A diferença de resistência entre os dois fios metálicos, provocada pelas diferentes condutividades térmicas dos gases, é convertida em diferença de potencial (mV) que é proporcional à concentração de analito.

Díaz et al. (2011) utilizaram este método de detecção de H_2S (CG-DCT), para quantificação de sulfeto de hidrogênio residual após processo de biodessulfurização de gás natural contendo cerca de 14.000 ppm de H_2S. O processo empregou bactérias dos gêneros *Thiobacillus sp.* e *Thiomicrospira sp*., alcançando 98,8 % de eficiência.

No sistema de detecção por ionização em chama (CG-DIC) é acoplado na saída da coluna cromatográfica um detector baseado na condução de corrente elétrica

promovida por íons produzidos pela combustão do analito. Este sistema é alimentado com gás hidrogênio e ar, que são queimados por uma chama intensa que produz espécies radicalares de hidrogênio e oxigênio. Estas espécies não são condutoras. Entretanto, na presença do analito, como compostos orgânicos, a chama provoca a formação de íons que permitem a condução de corrente elétrica quando é aplicada uma tensão elétrica entre a ponta em chamas e o coletor de gases. O resultado da análise é uma diferença de potencial, medida em milivolts (mV), que se relaciona à concentração de analito a partir de uma curva de calibração previamente construída.

Adánez et al. (1998) desenvolveram um sistema de remoção de H_2S a partir da reação de produtos de calcinação de diferentes minerais. A calcinação a temperaturas da ordem 1000ºC produz óxidos básicos, como óxido de cálcio obtido a partir do carbonato de cálcio, capaz de reagir com H_2S formando CaS. O teor de H_2S na mistura inicial e residual foi determinado a partir de um cromatógrafo gasoso Varian 3400-CXCG equipado com um detector de ionização em chama (DIC), observando-se uma eficiência de 70 % neste processo (ADÁNEZ et al, 1998).

3.4.7 Determinação de H_2S por detector de quimiluminescência

A detecção por quimiluminescência é um dos métodos mais utilizados na determinação de compostos sulfurados no gás natural. A quimiluminescência de enxofre é um método de detecção no qual a amostra é reduzida na presença de ar e hidrogênio sob vácuo, a fim de gerar monóxido de enxofre. Este monóxido é então transportado para uma câmara de reação aonde irá reagir com ozônio, a fim de gerar dióxido de enxofre e luz. Esta luz gerada é medida por um tubo fotomultiplicador, e o sinal é linearmente proporcional à quantidade de enxofre presente na amostra. Um esquema de construção deste sensor para H_2S é representado na Figura 8 a seguir.

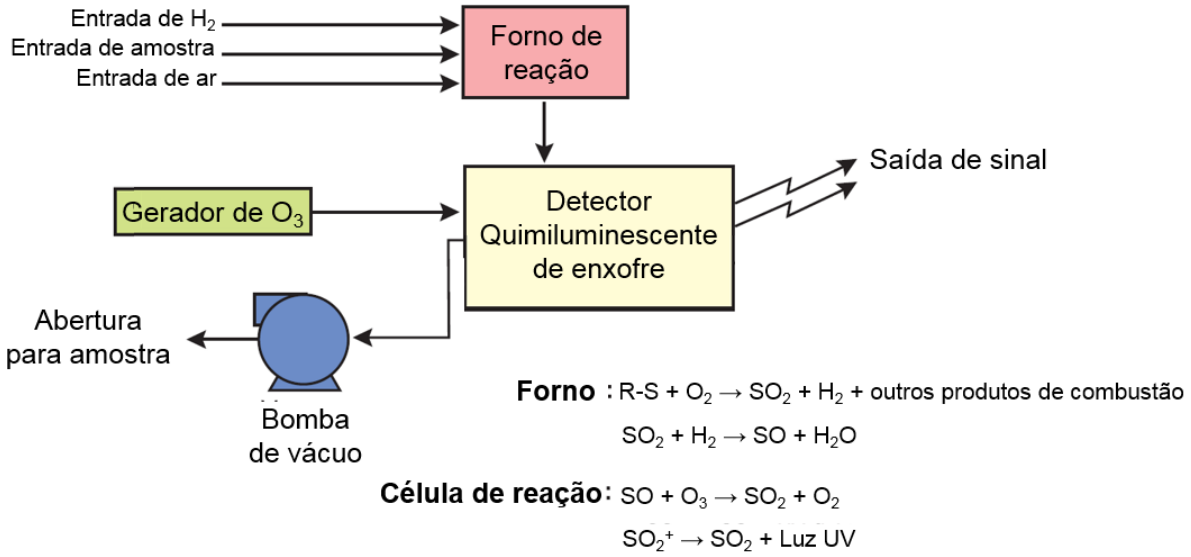


Figura 8 – Esquema de funcionamento de um detector de quimiluminescência. Adaptado de Shimadzu (2012).

Um detector do tipo quimiluminescência incorporado a um cromatógrafo é capaz de determinar a totalidade de compostos que contenham enxofre. A instalação de uma coluna cromatográfica acoplada a este tipo de detector permite a medição dos compostos sulfurados individualmente, como por exemplo, H_2S, mercaptanas e sulfetos orgânicos. Como o método de detecção é equimolar para o enxofre na resposta para todos os sulfurados, um detector do tipo quimiluminescente pode ser projetado como um cromatógrafo ou como um analisador de enxofre total, que é o somatório de todos os compostos sulfurados, incluindo os dissulfetos (SHIMADZU, 2012).

3.4.8 Determinação de H_2S por detector fotométrico de chama

O princípio de funcionamento deste detector é baseado na emissão de luz de comprimento característico observada na formação de espécies excitadas, sulfuradas e fosforadas, quando queimados em chama rica em hidrogênio. Como pode ser observado na Figura 9 a luz emitida é conduzida por um filtro óptico através de lentes especiais que captam a radiação com comprimento de onda em 394 nm, característico de compostos sulfurados. Esta radiação é conduzida por fotomultiplicadores até um

receptor de luz, com um sinal de resposta proporcional à concentração do composto sulfurado.

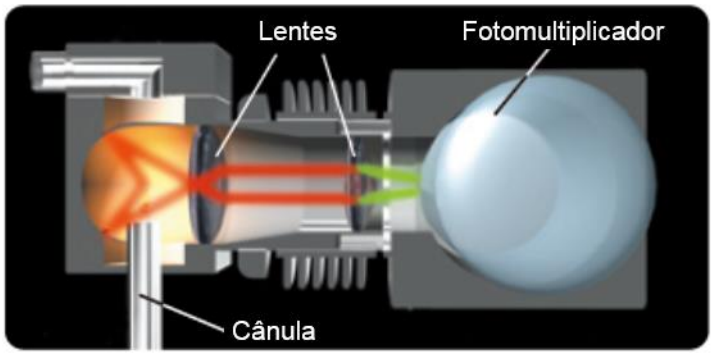


Figura 9 - Esquema de aparelhagem de detector fotométrico de chama. Adaptado de Shimadzu (2012).

O detector fotométrico de chama (FPD) é seletivo para enxofre e é o mais largamente usado na análise cromatográfica de compostos reduzidos de enxofre. Esse detector apresenta além de alta seletividade, outras vantagens como sensibilidade, fácil operação e ampla faixa linear. No entanto, possui desvantagens, como o fator de resposta, que depende da estrutura molecular do composto analisado, e a possibilidade de ocorrência de problemas de *quenching*, quando hidrocarbonetos, água e CO_2 são eluídos juntos com os compostos de enxofre (CRUZ et al, 2008).

3.4.9 Determinação amperométrica de H_2S

A utilização de sistema de Análise por Injeção em Fluxo para determinação de sulfeto de hidrogênio (H_2S), utilizando um sistema de detecção amperométrico, é reportada por Ertek et al. (2012). Neste trabalho os autores construíram uma célula eletroquímica na qual a corrente obtida na oxidação de sulfeto na superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia (hexacianoferrato de ferro III)(PB/GCE) como mediador redox, é proporcional à concentração de sulfeto. A análise consistiu em carregar o *loop* com 100 µL de amostra, uma taxa de fluxo de 1,4 $mL.min^{-1}$ e a aplicação de um potencial de +150 mV contra um eletrodo de Ag/AgCl/KCl saturado por um tubo de comprimento igual a 10 cm e utilizando como

carreador um tampão de pH 8. O valor encontrado para a corrente com a menor taxa de fluxo foi cerca de 60 % maior que aquela observada para a taxa de fluxo escolhida como condição para o sistema, de 1,4 mL/min. Entretanto, embora os maiores picos de corrente sejam observados para as menores taxas de fluxo, uma mais alta taxa de fluxo reflete em uma maior frequência de amostragem. Portanto, a taxa de fluxo ideal é a que permite a identificação inequívoca da concentração com a maior taxa de amostragem possível (ERTEK et al, 2012).

3.4.10 Determinação de H_2S por espectrometria de absorção atômica (AA)

Outro método para determinação de sulfeto aplicando a metodologia de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) foi desenvolvido por Peterson et al. (1986) utilizando como princípio a baixa solubilidade de sulfetos metálicos, como o sulfeto de cádmio. Neste trabalho, um sistema FIA foi constituído de uma válvula rotatória de 8 portas, provido de dois *loops* externos para medida dos volumes de injeção da amostra e da solução de nitrato de cádmio, que atuou como agente de precipitação. O sistema de detecção consistiu de um espectrômetro de absorção atômica Varian modelo AA-1275, sendo capturados os sinais característicos de cádmio em 228 nm. A Figura 10 a seguir apresenta o esquema de funcionamento deste sensor.

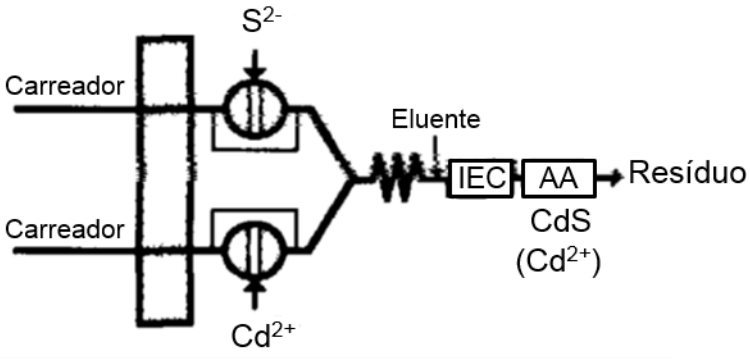


Figura 10 – Esquema do sistema FIA de determinação de sulfeto por espectroscopia de absorção atômica. Adaptado de Peterson et al. (1986).

O sistema foi constituído de duas bombas conectadas a um timer que alimentam o sistema contendo tampão acetato com solução de amostra contendo sulfeto e solução de $Cd(NO_3)_2$. Foi produzido um precipitado coloidal de CdS, que é transportado através de uma coluna de troca iônica. O excesso de cádmio foi retido na coluna de troca iônica (IEC), enquanto o sulfeto de cádmio coloidal atravessa e é conduzido ao espectrômetro de absorção atômica (AA) que analisa o comprimento de onda característico dos íons cádmio. Este sistema de análise apresentou um limite de detecção de 10 µg/L e uma taxa de amostragem de 100 análises por hora.

3.4.11 Determinação potenciométrica de H_2S com eletrodo íon-seletivo

O processo de biodessulfurização do gás natural, pela remoção de H_2S por bactérias oxidantes de enxofre (SOB), foi estudado por Montebello et al. (2010), que aplicaram um monitoramento *on-line* com a utilização do sistema FIA (Análise por Injeção em Fluxo) para avaliação da performance de um biofiltro.

Na configuração FIA o sulfeto foi conduzido ao sistema de detecção através de um canal único acoplado a uma bomba peristáltica que injetou a amostra junto com uma solução tampão de pH 14 contendo ácido ascórbico como antioxidante (SAOB). Todo H_2S foi convertido em íons $S^=$, evitando sua oxidação à outras espécies sulfuradas parcialmente oxidadas.

O biorreator desenvolvido neste trabalho foi alimentado com H_2S em concentrações de 2.000 a 8.000 ppm. Após contato por tempo determinado com as SOB a suspensão em análise atravessou filtros tangenciais e em linha para remoção de células e materiais particulados na saída do reator. Foi então encaminhado para o sensor íon-seletivo para $S^=$ e o Fiagrama obtido registrou picos de potencial cujas alturas se relacionam à concentração de sulfeto através de uma curva de calibração.

3.4.12 Determinação amperométrica de H_2S

Segundo Kroll et al. (1994) os métodos eletroquímicos de análise são os mais indicados para desenvolver sensores portáteis e que possam ser usados em monitoramento ambiental. O funcionamento destes sensores, de forma genérica, é baseado nas reações de oxidação que o sulfeto de hidrogênio pode participar na forma gasosa ou aquosa. Estas reações ocorrem a um potencial constante, em contato com um eletrodo de platina, e utilizando um eletrodo de trabalho com o par redox apropriado. Este pode ser constituído por um metal em contato com seu sal como no caso do par (Ag/AgCl), ou com seu óxido, por exemplo o par (Hg/HgO) (YU et al, 2002).

Diversos substratos alternativos podem ser usados para construção do eletrodo, como grafite pirolítico, nanotubos de carbono, carbono vítreo, pasta de carbono recoberta com solução de ouro coloidal e Nafion (KROLL et al, 1994). As possíveis semi-reações de oxidação que o sulfeto de hidrogênio pode experimentar em um eletrodo sensível são relatadas a seguir (POURBAIX, 1963).

$H_2S \rightleftharpoons S + 2\,H^+ + 2e^-$	E^o=0,171 V	Equação 5
$H_2S + 2\,H_2O \rightleftharpoons SO_2 + 6\,H^+ + 6e^-$	E^o=0,311 V	Equação 6
$H_2S + 4\,H_2O \rightleftharpoons SO_4^{2-} + 10\,H^+ + 8e^-$	E^o=0,365 V	Equação 7

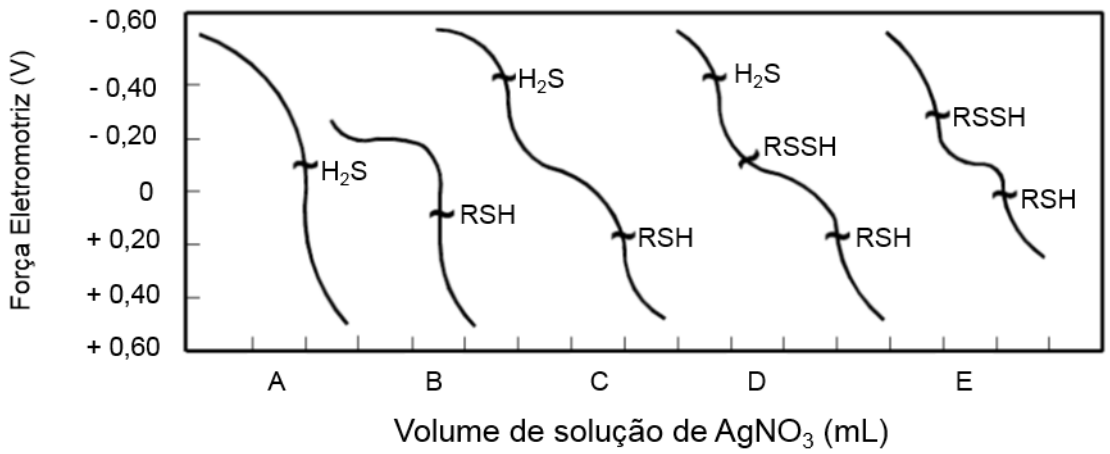
Utilizando medidas de voltametria cíclica, a partir de um potenciostato e eletrodo de grafite pirolítico, Lawrence et al. (2007) obtiveram ondas de aumento da intensidade de corrente característica de oxidação de sulfeto na superfície do eletrodo. A intensidade de corrente a um potencial constante de 0,22 V mostrou linearidade para concentrações de sulfeto de até 25 $\mu mol.L^{-1}$.

3.4.13 Titulação potenciométrica de H_2S

A potenciometria é uma técnica volumétrica baseada na medida da variação de potencial (d.d.p. ou f.e.m.) observada entre um eletrodo seletivo aos íons analisados e um eletrodo de referência, de potencial constante. Esta diferença de potencial se relaciona à concentração do analito, sendo determinada a partir de adições consecutivas de volumes conhecidos de um titulante especialmente escolhido para cada tipo de analito em função das reações que este participa, como neutralização, precipitação, complexação ou oxirredução. Próximo ao ponto de equivalência são observadas variações bruscas na concentração do titulado. Estas se refletem em variações bruscas na diferença de potencial observada. Dessa forma, o ponto final da titulação é indicado por inflexões obtidas nas curvas de titulação, sendo o ponto final alcançado quando a variação da força eletromotriz (f.e.m.) por incremento de titulante for máxima (VOGEL, 2002).

A PETROBRAS desenvolveu uma metodologia para a determinação de sulfeto e mercaptans por potenciometria (N-2458) aplicada a águas naturais e industriais contendo gás sulfídrico e enxofre mercaptídico a partir de 1 $mg.L^{-1}$. Nesta técnica a amostra é alcalinizada com hidróxido de sódio, maximizando a formação da espécie $S^{=}$ e titulada potenciometricamente com solução de nitrato de prata, utilizando-se eletrodos de prata-sulfeto de prata e de referência de vidro.

A determinação da concentração e a identificação dos componentes presentes no sistema é realizada pela observação da curva padrão de titulação obtida, em comparação a curvas típicas de titulação potenciométrica relatadas na norma, representadas na Figura 11.



A – Amostra contendo gás sulfídrico.
B – Amostra contendo enxofre mercaptídico.
C – Amostra contendo gás sulfídrico e enxofre mercaptídico.
D – Amostra contendo gás sulfídrico, enxofre mercaptídico e enxofre livre.
E – Amostra contendo enxofre mercaptídico e enxofre livre.

Figura 11 – Curvas típicas de titulação potenciométrica de enxofre mercaptílico e gás sulfídrico (PETROBRAS-N2458, 1992).

3.5 Bactérias oxidantes de enxofre (SOB)

As bactérias oxidantes de enxofre (SOB) correspondem a um grupo bastante heterogêneo de bactérias que compreende diversos gêneros de procariontes. Estes apresentam a habilidade de obter energia a partir da oxidação de compostos reduzidos de enxofre ou parcialmente oxidados. Apresentam diversas formas e tipos de mobilidade e morfologia, crescem em uma ampla faixa de pH, variando de 0,5 a 10,5 e obtém energia a partir de modos de metabolismo diversos, envolvendo bactérias fotoquimiossintetizantes ou fotoautotróficas, quimioautotróficas obrigatórias ou facultativas e bactérias heterotróficas ou quimioorganotróficas (WAKSMAN; STARKEY, 1922).

As bactérias fotossintetizantes são organismos unicelulares procariontes que possuem bacterioclorofilas. São capazes de obter compostos orgânicos complexos por processo semelhante à fotossíntese eucariota, que são utilizados em seu metabolismo como matéria-prima para formação dos componentes celulares ou são

degradadas para obtenção de energia. Assim, são capazes de reduzir o CO_2 atmosférico, na presença de luz, e oxidar sulfeto de hidrogênio a enxofre elementar ou espécies mais oxidadas de enxofre, tendo como produto final de oxidação o ácido sulfúrico (COELHO, 2002).

Outros importantes grupos de bactérias oxidantes de compostos sulfurados são as bactérias quimiolitotróficas e as quimioorganotróficas ou heterotróficas. O último grupo tem um importante papel na natureza como espécies decompositoras. Estas bactérias reciclam resíduos orgânicos do ambiente, como as bactérias saprofágicas, que obtém energia, por exemplo, pela decomposição de compostos orgânicos como carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos, álcoois e até mesmo substratos de difícil degradação, como celulose, lignina, quitina e petróleo. Os principais produtos são nitratos e sulfatos, que podem ser absorvidos pelas plantas como nutrientes (VIDYALAKSHMI et al, 2009).

As bactérias quimiolitotróficas, por sua vez, são bactérias autotróficas que utilizam a energia proveniente da oxidação de compostos inorgânicos, como enxofre elementar ou H_2S, para a síntese de compostos orgânicos. Utilizam gás carbônico como fonte de carbono. Estas bactérias são incolores ou despigmentadas e apresentam formas variáveis de respiração e metabolismo. Realizam respiração aeróbica ou anaeróbica e possuem metabolismo quimioautotrófico obrigatório ou facultativo. Por exemplo, os gêneros *Thiothrix* e *Beggiatoa* são aeróbias e quimiolitotróficas facultativas, podendo obter energia a partir da oxidação de compostos orgânicos dependendo da disponibilidade de nutrientes (VOGLER, 1942).

Os gêneros *Acidithiobacillus* e *Thiobacillus* são constituídos de bactérias incolores aeróbicas e quimiolitotróficas obrigatórias. Obtém energia para crescimento a partir da oxidação de compostos inorgânicos de enxofre reduzidos ou parcialmente oxidados, como enxofre elementar, sulfeto de hidrogênio, tiossulfato ou politionatos, especialmente os tetrationatos. Alguns exemplos de reações metabólicas realizadas por espécies dos gêneros citados são apresentados na Figura 12 (WAKSMAN; STARKEY, 1923).

$$2\,CO_2 + H_2S + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,[CH_2O] + H_2SO_4$$

$$2\,S + 3\,O_2 + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,H_2SO_4$$

$$2\,H_2S + O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + 2\,S$$

$$Na_2S_2O_3 + 2\,O_2 + H_2O \longrightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4$$

$$Na_2S_4O_6 + 7\,O_2 + 6\,H_2O \longrightarrow 2\,Na_2SO_4 + 6\,H_2SO_4$$

Figura 12 – Reações metabólicas de bactérias quimioautotróficas obrigatórias e facultativas. Adaptado de Waksman e Starkey (1923).

O Quadro 2, construído a partir de artigo publicado por VIDYALAKSHMI et al. (2009), exemplifica bactérias oxidantes de enxofre agrupadas em função dos diferentes tipos metabólicos.

Quadro 2 – Exemplos de bactérias oxidantes de enxofre. Adaptado de Vidyalakshmi et al. (2009).

Quimiolitotróficos obrigatórios	**Heterotróficos**	**Fotoautotróficos (gêneros)**
Thiobacillus thioparus	*T. acidophilus*	*Allochromatium*
Thiobacillus neapolitanus	*T. aquaesulis*	*Chlorobium*
Thiobacillus denitrificans	*T. intermedius*	*Rhodobacter*
Acidithiobacillus thiooxidans	*P. denitrificans*	*Rhodopseudomonas*
Acidithiobacillus ferrooxidans	*P. versutus*	*Rhodovulum*

Embora existam diferenças marcantes entre os gêneros de bactérias apresentadas, todas desempenham um importante papel no ciclo do enxofre e em outros interligados a este, como os ciclos do nitrogênio e carbono, seja como espécies oxidantes ou redutoras de enxofre. As principais transformações que ocorrem no ciclo do enxofre, mediadas por micro-organismos, são apresentadas na Figura 13.

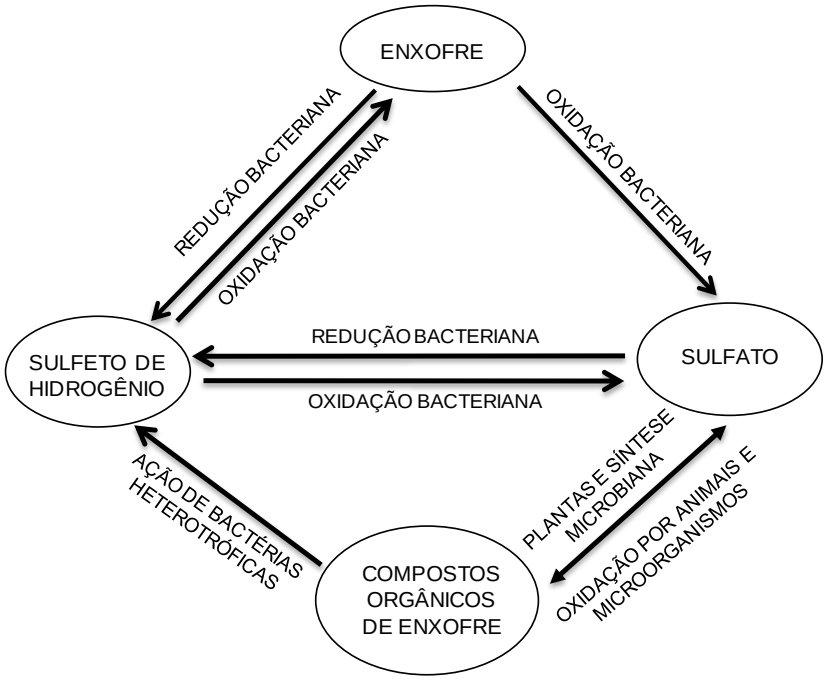


Figura 13 – Ciclo do enxofre: transformações mediadas por micro-organismos. Adaptado de Burns (1967).

A maior parte do enxofre absorvido por raízes de plantas deve estar disponível na forma de sulfato. A biomassa microbiana é a principal responsável pela oxidação de sulfeto de hidrogênio a sulfato, constituindo uma das reações majoritárias no ciclo global do enxofre. Outras importantes reações estão envolvidas neste processo de fixação de enxofre, que envolvem etapas de mineralização, imobilização, oxidação e redução de espécies sulfuradas (MAHENDRA, 1988).

Os gêneros *Thiobacillus* e *Acidithiobacillus* foram apontados por Waksman como os grupos mais característicos de micro-organismos presentes no solo, responsáveis pelas transformações oxidativas de compostos de enxofre (WAKSMAN, 1932). Deste gênero destacam-se as espécies *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Thiobacillus thioparus*, sendo este último onipresente em solos alcalinos e neutros (STARKEY, 1989).

A atividade de *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Thiobacillus thioparus* em solos apontam para a oxidação de sulfeto de hidrogênio a enxofre elementar. O estágio final

de oxidação de enxofre a ácido sulfúrico é decorrente da atividade de *A. thiooxidans*. Esta transformação é importante não apenas pela formação de sulfato, forma em que o enxofre pode ser absorvido pelas raízes das plantas, mas também pela acidificação do solo que contribui para a solubilização de fosfatos e micronutrientes, como ferro, zinco e manganês (TIWARI, 1997).

Estudando a corrosão microbiológica de concreto em linhas de transmissão de esgoto, Islander et al. (1991) observaram que há uma importante relação entre a sucessão ecológica de micro-organismos e a acidez provocada pelo metabolismo bacteriano em ambientes expostos ao sulfeto de hidrogênio. O H_2S gerado anaerobicamente pela decomposição de matéria orgânica presente no esgoto escapa para a atmosfera, aderindo às paredes úmidas de concreto das tubulações, e servindo de fonte inorgânica de energia a partir de sua oxidação. A oxidação microbiológica de H_2S leva à formação de enxofre elementar e compostos sulfurados intermediários, parcialmente oxidados (ISLANDER et al, 1991).

A obtenção de ácido sulfúrico como produto final de oxidação do H_2S confere uma notória acidez ao concreto, inicialmente alcalino. O baixo pH alcançado é hostil e inibitório para a maioria dos competidores, prevalecendo as espécies do gênero *Acidithiobacillus*. A Figura 14, publicada neste mesmo trabalho de Islander et al. (1991) representa a hipótese de sucessão ecológica de micro-organismos em concreto novo, exposto ao H_2S, em função do pH ao longo do tempo.

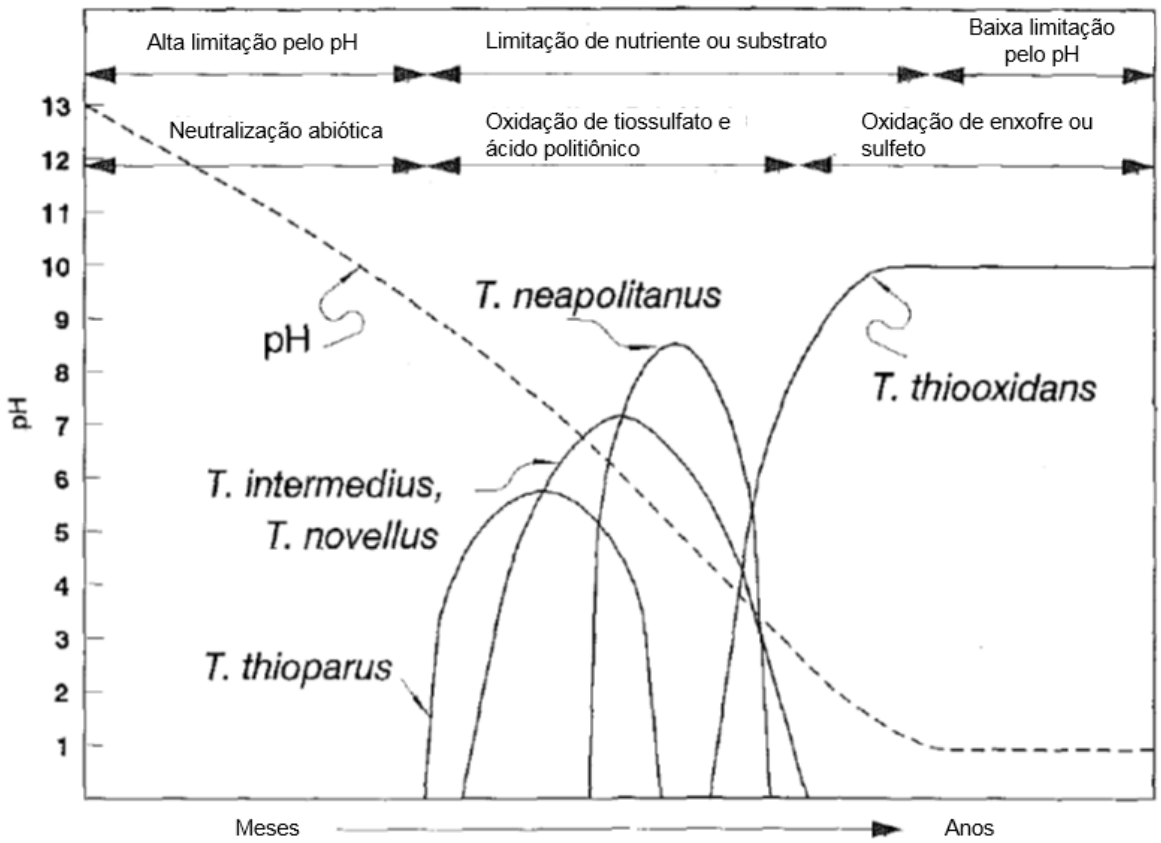


Figura 14 – Sucessão microbiológica de acidófilos em concreto em função do pH ao longo do tempo. Adaptado de Islander et al. (1991).

O caráter ácido do H_2S reduz abioticamente o pH até próximo de 9, quando inicia a oxidação de tiossulfato por *T. thioparus*. O tetrationato produzido leva a diversas reações de oxidação com produção de ácidos politiônicos que continuam a reduzir o pH. Em pH neutro ou levemente ácido *T. intermedius* e *T. novellus* se beneficiam de seu modo de nutrição heterotrófico facultativo desenvolvendo-se pelo consumo de resíduos gerados pela atividade microbiana, enquanto reduzem o pH do ambiente pela produção de ácidos.

A espécie *Thiobacillus neapolitanus* se estabelece em pH aproximadamente 6. A oxidação de enxofre elementar produzido biologicamente e de forma abiótica aumenta gradativamente a acidez até que é alcançado pH próximo de 3. Nestas condições a espécie *A. thiooxidans* cresce vigorosamente até que não encontra mais

competidores. Em concretos altamente corroídos, a acidez pode chegar a pH abaixo de 1, tornando o ambiente inibitório até mesmo para o *A. thiooxidans*.

A análise da Figura 14 permite concluir que a faixa de pH é fator determinante para o crescimento de diferentes espécies dos gêneros *Thiobacillus* e *Acidithiobacillus*, a partir da qual é possível inferir uma relação entre a espécie bacteriana e o pH ótimo de crescimento (Quadro 3).

Quadro 3 – Faixa de pH ótimo de crescimento para bactérias dos gêneros *Thiobacillus* e *Acidithiobacillus* (ISLANDER et al, 1991).

Micro-organismo	**Faixa de pH ótimo de crescimento**
Thiobacillus thioparus	6,6 a 7,2
Thiobacillus intermedius	5,5 a 6,0
Thiobacillus novellus	5,5 a 6,0
Thiobacillus neapolitanus	4 a 5
Acidithiobacillus thiooxidans	2 a 3

É possível generalizar, observando o Quadro 3, que as diversas aplicações tecnológicas que empregam micro-organismos, como a indústria alimentícia, de couro, reciclagem e de sensores biológicos são altamente dependentes do pH do ambiente. Outros fatores importantes são a força iônica do meio, temperatura, disponibilidade de nutrientes e de oxigênio. Assim, o gênero *Acidithiobacillus* ganha destaque em aplicações tecnológicas envolvendo bactérias oxidantes de enxofre, especialmente a espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* quando em ambientes de considerável acidez.

3.6 Aplicações tecnológicas de SOB

Os diversos processos tecnológicos associados ao H_2S tem como principal objetivo sua remoção, transformando-o sempre que possível em um produto de valor comercial compensatório ou que possa ser reutilizado no processo.

Os métodos de remoção de sulfeto de hidrogênio podem ser classificados em três categorias (CHAIPRAPAT et al, 2011):

(1) métodos físicos como absorção e adsorção com meios líquidos ou sólidos;

(2) métodos químicos com adsorção química e absorção química com oxidantes; soluções alcalinas e agentes de quelação metálicos;

(3) métodos biológicos como biofiltração.

Dos três métodos citados, os métodos bioquímicos são considerados com menor custo efetivo, uma vez que os custos com reagentes químicos e solventes podem ser reduzidos, os sistemas apresentam alta eficiência, podem funcionar com baixo consumo de energia e geram pouco resíduo para ser disposto (CHARNNOK et al, 2012).

A biofiltração é um processo que utiliza micro-organismos imobilizados na forma de um biofilme formado sobre um substrato constituído de um filtro poroso. À medida que os vapores passam através do filtro, o contaminante é transferido ao biofilme, sendo então metabolizado (YANG; ALLEN, 1994).

As bactérias oxidantes de enxofre (SOB) têm sido empregadas em sistemas de biofiltração e biorremoção de H_2S, principalmente o gênero *Thiobacillus*, responsável pela oxidação de H_2S em uma ampla faixa de pH, sendo eficiente em meios aeróbicos cuja acidez varia da neutralidade a pH 2 (CHAIPRAPAT et al, 2011).

Uma das aplicações de SOB em processos de biofiltração é relatada em trabalho de Charnnok et al. (2012). Neste trabalho o biogás é obtido como rejeito da indústria de látex. O rejeito orgânico é hidrolisado bioquimicamente em digestores anaeróbicos produzindo biogás com aproximadamente 77 % de CH_4, que pode substituir os combustíveis convencionais. Entretanto, a alta concentração de sulfato nesse rejeito provoca a formação de biogás contendo H_2S em concentrações entre 13.000 e 26.000 ppm, devendo ser removido do biogás para permitir sua utilização. A comunidade microbiana foi caracterizada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), mostrando que o gênero *Acidithiobacillus* foi o grupo de bactérias predominante no biofiltro, uma vez que podem tolerar meios com pH variando entre 4 e 0,5. Os resultados deste trabalho também mostraram uma capacidade de eliminação de H_2S de 150,3 $gH_2S/m^3.h$. O sistema apresentou uma taxa de remoção de até 94,7 % de H_2S no biogás que continha aproximadamente 6.400 ppm de H_2S. Estes resultados mostraram-se bastante dependentes do tempo de retenção do biogás e da porcentagem de O_2 no líquido recirculante (CHARNNOK et al, 2012).

Diversos micro-organismos têm sido aplicados com sucesso em processos de biofiltração, como *Pseudomonas putida* CH11, uma bactéria heterotrófica isolada de resíduos de pecuária e aplicada no tratamento de gases com eficiência de remoção de mais de 96 % em concentrações de H_2S de 10 a 150 ppm (CHUNG et al, 1996a). CHUNG et al. (1996b) relataram que a bactéria quimioautotrófica *Thiobacillus thioparus* CH11 apresentou mais de 98,5 % de eficiência na biofiltração de gases contendo 20 a 60ppm de H_2S. Em outro trabalho da mesma equipe de pesquisadores, *T. novellus* CH3 atingiu mais de 99,5 % de eficiência na remoção de H_2S em concentração de 160 ppm (CHUNG et al, 1997).

Lee et al. (2006) relatam que, de forma geral, há uma redução na eficiência de remoção em altas concentrações de H_2S, devido ao aumento na concentração de sulfato, que provoca uma redução do pH a valores inibitórios para diversos micro-organismos. Neste sentido, desenvolveram um estudo para identificar bactérias capazes de tolerar altas concentrações de sulfato e condições de baixo pH. Lee et al. (2006) observaram o comportamento de três diferentes grupos de *Acidithiobacillus*: *A. thiooxidans* AZ11 (KCTC8929P), *A. thiooxidans* MET (KCTC8928P) e *A. thiooxidans* TAS (KCTC8930P).

A concentração de H_2S foi ajustada para injeção no biofiltro em 200 ppm, sendo aumentada em intervalos de 200 ppm até alcançar 2.200 ppm. A concentração de saída de H_2S do biofiltro medida por cromatografia gasosa, enquanto a concentração de sulfato foi medida por cromatografia de troca iônica.

Neste experimento, com aumento sucessivo da quantidade de H_2S injetada, mesmo para as mais altas concentrações, foram detectados menos de 0,1 ppm na saída do biofiltro. Estes resultados são ilustrados na Figura 15.

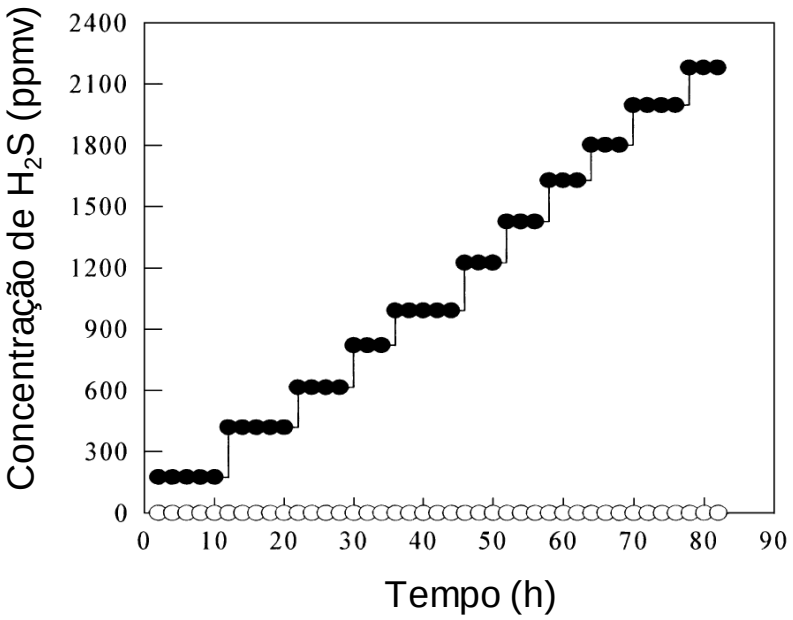


Figura 15 – Remoção de H_2S por *A. thiooxidans* AZ11. Símbolos: círculos fechados, entrada do biofiltro; círculos abertos, saída do biofiltro (LEE et al, 2006).

A observação dos gráficos da Figura 16 permite outras importantes análises sobre as cepas de *Acidithiobacillus* testadas. Os dados apresentados, obtidos a partir do crescimento microbiano na presença de 50 $g.L^{-1}$ de enxofre elementar, mostraram uma alta capacidade de oxidação de enxofre, fortemente dependente da concentração de sulfato e do pH do meio. O gráfico (a) mostra que *A. thiooxidans* AZ11 apresenta um pico de máximo em pH próximo de 1,5 para oxidação de enxofre, enquanto os demais micro-organismos mostraram uma clara redução na taxa de oxidação com a redução de pH de 2,7 a 0,6. No gráfico (b) é possível perceber que concentrações de

sulfato, um dos principais subprodutos formados na oxidação de enxofre, acima de 10 g.L^{-1} provocam uma forte redução na taxa de oxidação de enxofre, embora em concentrações de sulfato próximas a 50 g.L^{-1} *A. thiooxidans* AZ11 tenha mostrado uma eficiência na oxidação de enxofre aproximadamente 4,5 vezes maior que *A. thiooxidans* MET e aproximadamente 3 vezes maior que *A. thiooxidans* TAS.

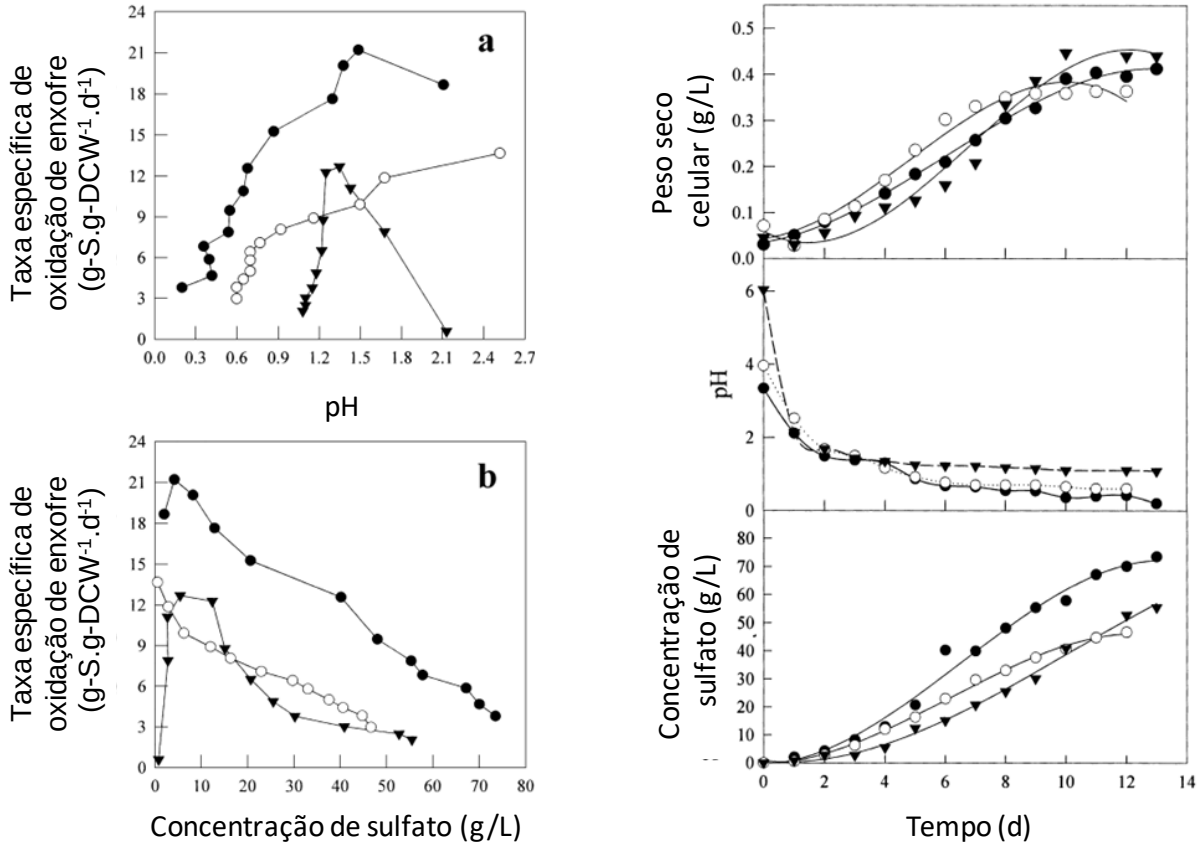


Figura 16 – (a) padrão de crescimento de *A. thiooxidans*, (b) taxa de oxidação de enxofre por *A. thiooxidans*, (c) influência da concentração de sulfato na taxa de oxidação de enxofre para *A. thiooxidans*. Legenda:(a) círculos abertos, *A. thiooxidans* MET, círculos fechados, *A. thiooxidans* AZ11, triângulos reversos, *A. thiooxidans* TAS. Adaptado de Lee et al. (2006).

É notória a redução de pH provocada pela oxidação de enxofre, assim como o consequente acúmulo de sulfato, observados no gráfico (a). Após 5 dias de experimento *A. thiooxidans* AZ11 provocou uma redução de pH até próximo de 1, sendo após 10 dias encontrados valores de pH 0,15. Pode ser observado também que a taxa de crescimento microbiano e a produção de sulfato apresentaram um crescimento consistente, indicando que os micro-organismos testados apresentam resistência à elevada acidez do meio de cultura.

É possível também inferir, a partir da análise dos gráficos (c), que a forte redução no pH não está diretamente ligada ao crescimento microbiológico, uma vez que é observada uma forte redução no pH mesmo no primeiro dia de cultura, especialmente para *A. thiooxidans* TAS, que provoca uma redução de pH de 6 para valores menores que 2 ainda quando a taxa de crescimento microbiológico era próxima de zero.

O processo de biolixiviação é outra interessante aplicação tecnológica das bactérias oxidantes de enxofre. A biolixiviação consiste na dissolução de minerais a partir de diversos substratos inorgânicos produzidos pela ação de micro-organismos (ATLAS; BARTHA, 1993). Os micro-organismos com capacidade de lixiviação são caracterizados por seu caráter oxidativo frente a minerais ferrosos e contendo formas reduzidas de enxofre. Atuam em temperaturas entre 25 ºC e 35 ºC, são autotróficos e apresentam alta atividade metabólica em condições de alta acidez. Assim, os micro-organismos comercialmente utilizados no processo de biolixiviação são bactérias das espécies *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* (SOBRAL et al, 2011).

Além da extração mineral, o processo de biolixiviação utilizando SOB é aplicável a outros processos tecnológicos. Em trabalho desenvolvido por França e Figueiredo (2001) um consórcio das bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* foi utilizado para redução de metais pesados do lodo de esgoto digerido gerado na Estação de Tratamento de Esgoto de Barueri – SP, por meio de processo de solubilização biológica. A extração de metais pesados do lodo é realizada por métodos químicos há cerca de 20 anos, por métodos como cloração, troca iônica e acidificação do lodo. Entretanto, estes métodos apresentam altos custos, problemas operacionais e resultados insatisfatórios. Dessa forma, a solubilização biológica de metais tem sido estudada e explorada (FRANÇA; FIGUEIREDO, 2001).

de Paula et al. (2007) utilizaram o mesmo consórcio de bactérias para o estudo da remoção de enxofre inorgânico de carvões provenientes de minas brasileiras. A queima do carvão, que pode conter até 9 % de enxofre total, gera óxidos de enxofre como dióxido de enxofre e trióxido de enxofre, reconhecidos como altamente poluentes e formadores de chuva ácida. Assim, a dessulfurização do carvão pode ser

realizada biologicamente, a partir da oxidação de sulfetos minerais insolúveis, transformando-os em sulfato solúvel, removendo assim o enxofre presente no carvão.

A capacidade de produção de ácido sulfúrico foi explorada por Farahani et al. (2014) na lixiviação de catalisadores utilizados nas indústrias de refino do petróleo. Os catalisadores após ciclos de reuso tornam-se desativados, e estes ciclos de reativação geram lodo contendo diversos metais como níquel, cobalto, vanádio e alumínio, que além de tóxicos e potencialmente poluidores no ambiente, podem ser recuperados por seus valores comerciais. Os resultados deste trabalho mostraram que os metais estão em maior quantidade na forma de óxidos depositados sobre uma matriz de alumina.

Assim, o mecanismo de recuperação dos metais é baseado no ataque do ácido produzido biologicamente sobre os óxidos metálicos, conforme as reações representadas a seguir, onde “M” representa um metal biolixiviado (MISHRA et al, 2008).

$$S + H_2O + 3/2\ O_2 \xrightarrow{\textit{A. thiooxidans}} H_2SO_4 \qquad \text{Equação 8}$$

$$MO + H_2SO_4 \longrightarrow MSO_4 + H_2O \qquad \text{Equação 9}$$

3.7 *Acidithiobacillus thiooxidans*

Bactérias da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* foram isoladas pela primeira vez por Waksman e Joffe em 1921, que observaram sua notória capacidade de oxidar enxofre elementar rapidamente com produção de ácido sulfúrico (WAKSMAN; JOFFE, 1921). Estas bactérias são descritas na literatura (VIDYALAKSHMI et al, 2009; ISLANDER et al, 1991) como bastões curtos com extremidades arredondadas, apresentando 1-3 µm de comprimento e 0,5 µm de largura, são Gram negativas e apresentam motilidade devido à presença de flagelo polar, como ilustrado na Figura 17.

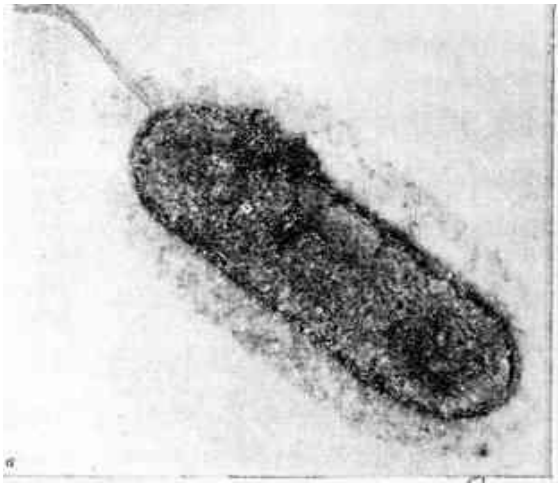


Figura 17 – Microscopia eletrônica de *Thiobacillus thiooxidans* (9000x) (GOLOVACHEVA, 1985).

Crescenzi et al. (2006) estudaram a influência de condições como temperatura e salinidade no crescimento de *Acidithiobacillus* sp. expostos ao ambiente. Neste trabalho Crescenzi et al. (2006) buscavam condições ideais de inibição do crescimento de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 504, entre outras espécies de *Thiobacillus*, em blocos de enxofre elementar. Este estudo foi motivado pelo impacto ambiental e alto custo de tratamento e manutenção provocados pela produção biológica de ácido sulfúrico em depósitos de enxofre no Canadá, constituídos de toneladas de blocos de enxofre que podem alcançar 20 metros de altura (CRESCENZI et al, 2006). Os resultados indicam que *A. thiooxidans* é um micro-organismo mesófilo, com temperatura ideal de crescimento em cerca de 30 ºC, e que a 5 ºC o crescimento bacteriano é inibido. A taxa de crescimento ou sua inibição foi avaliada em função das variações no pH, uma vez que o enxofre elementar, ao sofrer oxidação total, produz ácido sulfúrico, reduzindo o pH e aumentando a concentração de sulfato.

A taxa máxima de oxidação de enxofre alcançou 0,4 mmol/dia de íons H^+ por metro quadrado de enxofre exposto ao ambiente. Em temperatura ideal de crescimento *A. thiooxidans* foi capaz de produzir uma forte redução de pH, diminuindo seu valor de pH 6 a pH 2 em apenas 10 dias de exposição do bloco de enxofre analisado. A influência da força iônica foi analisada por densidade óptica da cultura em crescimento. Quanto maior a força iônica, provocada pela adição de sais iônicos como cloretos, sulfatos e nitratos alcalinos, menor a taxa de crescimento microbiano,

indicando que há um limite a partir do qual o crescimento bacteriano é inibido (CRESCENZI et al, 2006).

A formação de ácido sulfúrico como principal produto de oxidação de enxofre elementar por *Acidithiobacillus thiooxidans* foi também evidenciada por Kempner (1996) relacionando a redução de pH, ou seja, a formação de íons H^+ e o aumento na concentração de sulfato, derivados da atividade de *A. thiooxidans* ATCC® 8085™ sobre enxofre elementar na concentração de 10 g por litro de cultura (Figura 18).

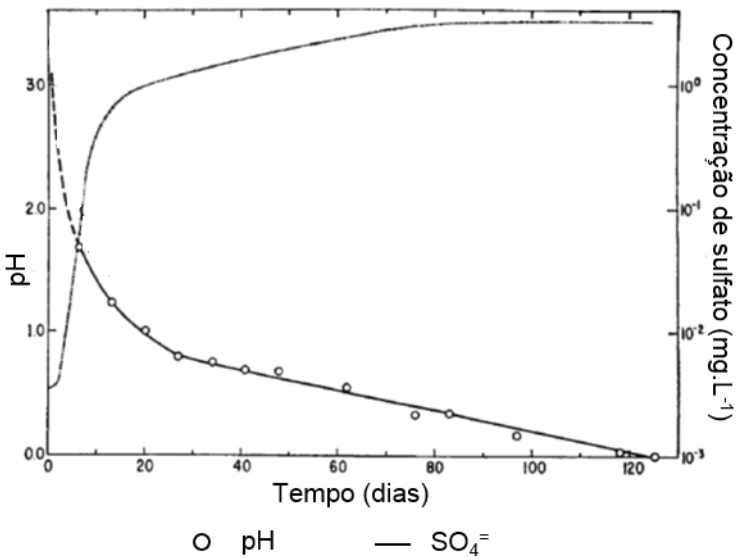


Figura 18 – Variações da acidez e da concentração de íons $SO_4^=$ decorrentes da ação de *A. thiooxidans* sobre enxofre elementar. Adaptado de Kempner (1996).

Neste trabalho foi relatado que o pH do cultivo de *A. thiooxidans* reduziu de 3 para 0,9 no intervalo entre 2 e 3 semanas, havendo um aumento exponencial na taxa de crescimento das culturas na primeira semana de experimento. E que a partir deste momento, houve uma redução na taxa de acúmulo de ácido que se estendeu por outros 100 dias. Kempner (1966) relatou também que *A. thiooxidans* foi capaz de oxidar enxofre e, consequentemente, produzir ácido sulfúrico em meios pré-ajustados para pH 0,9, reduzindo-o para 0,7. E que a exposição do meio de cultura a pH tão baixo quanto 0,01 não foi deletério para as células bacterianas (KEMPNER, 1996).

Embora existam dados na literatura sobre a cinética de crescimento de *Acidithiobacillus thiooxidans*, a maioria dos estudos publicados utilizaram enxofre

elementar como fonte de enxofre reduzido (CHEN et al, 2002; RAO; BERGER, 1971; KONISHI et al, 1995; TICHY et al, 1994).

Como apresentado anteriormente, é reconhecida a capacidade de *Acidithiobacillus* em oxidar outros compostos sulfurados reduzidos ou parcialmente oxidados. Entretanto, segundo os autores, o trabalho de Jensen et al. (2011) é o primeiro a relatar o estudo cinético de crescimento de *Acidithiobacillus thiooxidans* tendo H_2S como única fonte doadora de elétrons.

Jensen et al. (2011) buscavam estudar a cinética de crescimento de *A. thiooxidans* e sua influência na biocorrosão do concreto tendo como fonte de enxofre o sulfeto de hidrogênio. Neste contexto, foi construído um sistema de controle e acompanhamento do consumo de H_2S e de oxigênio, operando em ciclos, a fim de identificar os principais produtos metabólicos do consumo de H_2S pelos micro-organismos. Foram relacionadas as possíveis proporções estequiométricas de reação às taxas de utilização de enxofre (SUR) e às taxas de utilização de oxigênio (OUR). O sistema de reação utilizado é representado na Figura 19.

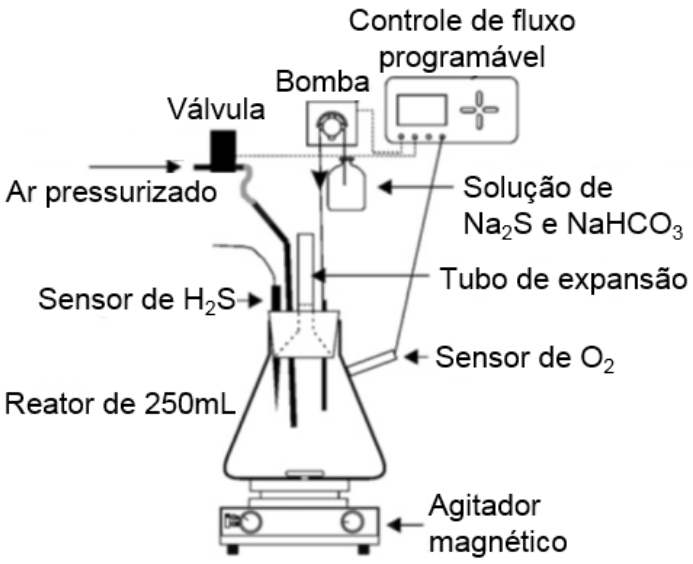


Figura 19 – Esquema do sistema para controle do consumo de H_2S e O_2. Adaptado de Jensen et al. (2011).

O sistema representado na Figura 19 foi completamente preenchido com solução aquosa de pH 1, acidificada com HCl ou H_2SO_4, na temperatura controlada em 22 ºC, e contendo micronutrientes (NH_4Cl, KH_2PO_4, $MgSO_4.2H_2O$, $CaCl_2$, $FeCl_3.6H_2O$) que garantissem que o crescimento bacteriano não fosse limitado pela ausência destes sais minerais. Foi adicionada à este sistema, contendo os micro-organismos obtidos por suspensão de certa massa de concreto corroído, solução 42 mmol.L^{-1} de Na_2S como fonte de H_2S e solução 7 mol.L^{-1} de bicarbonato de sódio como fonte de dióxido de carbono.

O sistema foi aerado a cada ciclo com ar atmosférico por 3 min, sendo monitorado o consumo de H_2S e O_2, bem como a produção de enxofre elementar e sulfato, na presença de H_2S. Os resultados obtidos indicaram que as taxas de consumo de sulfeto de hidrogênio e oxigênio mostram um mesmo padrão. Foi observado um aumento exponencial na taxa de utilização tanto de H_2S como de oxigênio. Após o consumo total de H_2S a taxa de utilização de oxigênio foi reduzida drasticamente, seguido de um rápido aumento constituindo um segundo pico de consumo de O_2 (Figura 20).

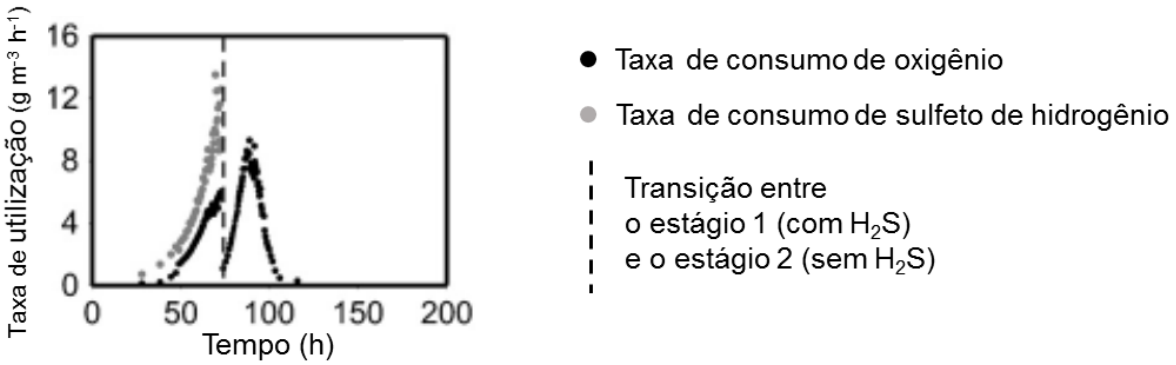


Figura 20 – Evolução da taxa de utilização de oxigênio de sulfeto de hidrogênio por *A. thiooxidans* em função do tempo. Adaptado de Jensen et al. (2011).

O padrão observado na taxa de utilização de oxigênio sugere que a formação do primeiro pico de consumo de O_2 foi devido à oxidação do sulfeto de hidrogênio, enquanto o segundo pico foi consequência do consumo dos produtos de oxidação de H_2S, que são oxidados em sua ausência.

As áreas sob as curvas foram utilizadas para a determinação das proporções estequiométricas de reação, sendo integradas para o oxigênio as duas áreas correspondentes às curvas observadas nos estágios 1 e 2.

A estequiometria de reação foi calculada pela razão entre o consumo de oxigênio e o consumo de sulfeto de hidrogênio, conforme a equação 10.

$$\frac{\int_{t1}^{t2} \mathrm{OUR}\, dt}{\int_{t1}^{t2} \mathrm{SUR}\, dt} = \frac{\int_{t1}^{t2} \mu \frac{X_{\mathrm{SOB}}}{Y_{\mathrm{O}}} dt}{\int_{t1}^{t2} \mu \frac{X_{\mathrm{SOB}}}{Y_{\mathrm{H_2S}}} dt} = \frac{Y_{\mathrm{H_2S}}}{Y_{\mathrm{O}}}$$

Equação 10

Os resultados são apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Relação entre a taxa de consumo de oxigênio (OUR) e a taxa de consumo de enxofre (SUR) por *A. thiooxidans* (JENSEN et al, 2011).

OUR/SUR		
Mediana	Percentil 25%	Percentil 75%
2,24	1,95	2,60
2,05	1,36	3,14
2,24	1,62	2,71

O consumo de H_2S por *A. thiooxidans* na presença de oxigênio pode ser representada pelas equações 11, 12 e 13 (JENSEN et al, 2011):

$$H_2S + 0{,}5\ O_2 \rightarrow S + H_2O$$ Equação 11

$$H_2S + O_2 \rightarrow 0{,}5\ S_2O_3^{-2} + 0{,}5\ H_2O + H^+$$ Equação 12

$$H_2S + 2\ O_2 \rightarrow SO_4^{-2} + 2\ H^+$$ Equação 13

As equações mostram que uma razão molar entre o consumo de oxigênio e de H_2S igual a 0,5 indica a formação de enxofre elementar, enquanto a formação de tiossulfato e ácido sulfúrico correspondem a razões iguais a 1 e 2, respectivamente. A razão de consumo total do processo indica a formação de ácido sulfúrico como produto final de oxidação, embora o valor médio encontrado, igual a 2,24, seja alto demais para indicar a formação de ácido sulfúrico. Os autores justificaram o alto valor encontrado pela difusão de oxigênio para o reator e de H_2S escapando do reator, o que superestima a OUR e subestima o consumo de H_2S.

As informações relatadas nos itens 3.6 e 3.7 indicam que os micro-organismos da espécie *A. thiooxidans* apresentam diversas características que lhe conferem um alto potencial de aplicação nos biossensores desenvolvidos neste trabalho. Algumas destas características são descritas a seguir.

▪ Apresenta alta taxa de consumo de H_2S. Esta característica reflete a taxa de produção de enxofre e íons H^+ e, consequentemente, impacta no tempo de resposta.

▪ Atividade metabólica em altas concentrações de sulfato. O biossensor foi desenvolvido visando sua potencial aplicação na determinação de H_2S em água produzida, gerada pela indústria petroquímica, em suas diversas etapas de tratamento. Assim, a manutenção da atividade em altas concentrações de sulfato é uma característica desejável do biocomponente utilizado.

▪ São quimiolitotróficos. Esta característica confere maior seletividade ao biossensor. O uso de micro-organismos heterotróficos favoreceria a metabolização de outras substâncias presentes no meio analisado, interferindo na confiabilidade e especificidade do sinal gerado.

▪ A possibilidade de controle do produto metabólico majoritário em função das condições de oxigenação do sistema. O ácido sulfúrico é gerado como metabólito principal em condições de oxigenação suficientes. Este é um ácido forte e estará completamente ionizado em baixa concentração, de forma que a concentração de H^+ gerado está diretamente relacionada à concentração de H_2S presente no meio analisado.

3.8 Meio de Cultura e Condições de Crescimento para *A. thiooxidans*

Em 1921 Selman Waksman e Jacob Joffe isolaram a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* de uma mistura de solo, enxofre e rochas fosfáticas. Utilizaram meio líquido, e a identificaram como um micro-organismo com reprodução em condições de alta acidez, com um pH ótimo entre 3 e 4, mas que pode crescer em pH tão baixo quanto 1. O descreveram como um micro-organismo quimiolitotrófico, capaz de obter energia a partir da oxidação de enxofre elementar e outros compostos inorgânicos sulfurados, que utiliza o gás carbônico atmosférico como fonte de carbono e que obtém nitrogênio a partir de sais de amônio ou nitratos, com necessidades minerais de traços de potássio, magnésio e sais de ferro e potássio (WAKSMAN, 1922).

Dessa forma, Waksman e Joffe propuseram um meio de isolamento e crescimento para *Acidithiobacillus thiooxidans* com a composição descrita na Tabela 2, tornando o pH inicial entre 2 e 3 utilizando ácido fosfórico e diidrogeno fosfato de potássio (WAKSMAN; JOFFE, 1922).

Tabela 2 – Meio de cultura para *Acidithiobacillus thiooxidans* (WAKSMAN; JOFFE, 1922).

Composição	Massa (g)
$(NH_4)_2SO_4$	2,00
KH_2PO_4	1,00
$MgSO_4$	0,50
KCl	0,50
$FeSO_4$	0,01
$Ca_3(PO_4)_2$	10,00
S^0	10,00
H_2O	1000,00

Waksman (1922) propôs ainda um meio de isolamento e crescimento mais simples para *Acidithiobacillus thiooxidans,* ainda hoje utilizado, que elimina a presença de fosfato de cálcio e substituindo a presença de KCl por $CaCl_2$. Este meio de crescimento para *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™, denominado meio de cultivo ATCC 125, é recomendado pela ATCC® (American Type Culture Collection),

um centro americano de recursos biológicos privado voltado para coleção, autenticação, desenvolvimento e distribuição de micro-organismos e materiais para pesquisa médica e biológica (ATCC, 2011). Este meio de crescimento apresenta a composição descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Meio de cultura para *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™.

Composição	Concentração (g/L)
$(NH_4)_2SO_4$	0,2
KH_2PO_4	3,0
$MgSO_4$	0,5
$CaCl_2$	0,25
$FeSO_4$	0,005
S^0	10,0
H_2O	1000,00

A constituição do meio de cultivo de Waksman não sofreu alterações significativas ao longo do tempo, mas algumas mudanças foram incorporadas, especialmente nas condições de temperatura, pH e agitação para adequação aos sistemas tecnológicos desenvolvidos especialmente para aplicações em sistema de biofiltração para remoção de H_2S e biolixiviação para extração de metais a partir de sulfetos minerais.

Em alguns trabalhos o crescimento foi realizado em meio 9K estritamente mineral, que apresenta diferenças nas concentrações dos constituintes, no uso de nitrato de cálcio ao invés de cloreto de cálcio e na ausência de sais de ferro. Este meio de crescimento apresenta a seguinte composição: 3 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g/L de KH_2PO_4, 0,5 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 0,01 g/L de $Ca(NO_3)_2$, 0,1 g/L de KCl e 10 g/L de enxofre elementar como fonte de energia (SILVERMAN; LUNDGREEN, 1959; FRANÇA; FIGUEIREDO, 2001).

Chaiprapat et al. (2011) utilizaram, em um sistema de biofiltração de gás natural para remoção de H_2S, um meio mineral complexo cujas principais diferenças são a presença de 1,2 g de Na_2HPO_4, 0,02 g de $MnSO_4$, 0,02 g de $FeCl_3$, 4,0 g de $NaHCO_3$

e 20 g de $Na_2S_2O_3.9H_2O$ como fonte de energia. Embora a espécie *A. thiooxidans* seja capaz de absorver CO_2 do ambiente, Jensen et al. (2011) também utilizaram bicarbonato de sódio como fonte de carbono, como forma de compensar a baixa solubilidade do dióxido de carbono em baixo pH da solução.

Outros exemplos de modificações do meio de cultivo para *A. thiooxidans* foram encontrados na literatura e organizados na Tabela 4, onde os números constantes na primeira linha correspondem a trabalhos publicados e referenciados ao final da tabela.

Tabela 4 – Diferentes composições de meios de crescimento para *A. thiooxidans*.

Composição	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
$(NH_4)_2SO_4$			0,8g/L			0,3g/L	
KH_2PO_4	1,8 g			3,0g/L	3g/L		2,0g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g		0,8 g/L	0,5g/L	0,5g/L	0,5g/L	
$MgCl_2.7H_2O$							0,2g/L
$CaCl_2.2H_2O$	0,03g	0,2 g/L		0,25g/L	0,3g/L	0,25g/L	
$FeSO_4.7H_2O$				0,01g/L	0,01g/L	0,018g/L	0,01g/L
Na_2HPO_4	1,2g						
K_2HPO_4		0,6g/L	0,08g/L			3,5g/L	2,0g/L
NH_4Cl	0,5g	1,0g/L		0,3g/L	0,1g/L		0,4g/L
$MnSO_4$	0,02g						
$FeCl_3$	0,02	0,02g/L					
$NaHCO_3$	4,0g						
$Na_2S_2O_3$	20g	10g/L					
$CaCO_3$		3g/L					
S^0			10g/L	0,5-2,0g/L	10g/L	5g/L	50g/L

Continua

Conclusão

	1	2	3	4	5	6	7
Condições							
pH inicial	4,5	5	2,8	4,5	4	4,5	3 - 6
Temperatura (ºC)		35	30	23	30		30
Agitação (rpm)		150	150	240	180		180

Fontes: 1: CHAIPRAPAT et al, 2011;2: RAVICHANDRA et al, 2009; 3: ROSSINI et al, 2014; 4: COOK, 1964; 5: LEE et al, 2000; 6: DWORKIN e FALKOW, 2006; 7: LEE et al, 2006.

As diferentes composições dos meios de crescimento para *Acidithiobacillus thiooxidans* foram estudas por Liu et al. (2004), buscando as condições ótimas de cultivo através do método estatístico de análise de variância (ANOVA). Neste trabalho foi aplicado o método de superfície de resposta com composto central (RSM-CCD) em um fatorial completo 2^4, investigando a influência de 4 variáveis de composição do meio no crescimento celular e na formação de ácido sulfúrico, que atuou como resposta no modelo matemático gerado.

A resposta foi avaliada em função de 30 ensaios tendo como variáveis independentes as concentrações de KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ e enxofre elementar no meio de cultura. Os autores relataram neste trabalho que os maiores valores de concentração de ácido sulfúrico foram obtidos no início da fase estacionária, com 300h de cultivo. Os altos valores de P encontrados para os parâmetros concentração de KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$ e $MgSO_4$ e o baixo valor de P encontrado para o parâmetro concentração de enxofre (P=0,0001) em ANOVA indicaram que o único fator que influenciou o resultado foi a concentração de enxofre. Não foram significativas as influências das concentrações dos outros componentes, nem suas interações, indicando que estes atuaram como nutrientes limitantes para o crescimento. Os melhores resultados foram obtidos com a seguinte composição: KH_2PO_4 3,5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 4,9 g/L, $MgSO_4$ 0,7 g/L e enxofre elementar na concentração 23,7 g/L. O crescimento celular e a produção de ácido sulfúrico podem ser observadas na Figura

21, que demonstra que concentrações de enxofre elementar maiores que 23,7 $g.L^{-1}$ reduziram drasticamente tanto o crescimento celular quanto a produção de H_2SO_4. (LIU et al, 2004).

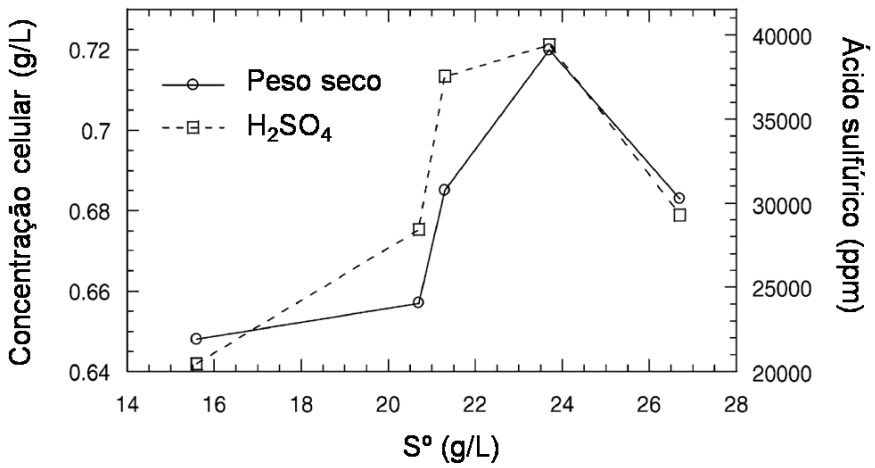


Figura 21 – Produção máxima de biomassa e ácido sulfúrico em função da concentração de enxofre. Adaptado de Liu et al. (2004).

Segundo Cook (1964), nas décadas de 40 e 50 havia discordância em relação às condições de crescimento de *A. thiooxidans*. Alguns autores indicavam que seria necessário realizar o cultivo estacionário (VOGLER; UMBREIT, 1941). Enquanto outros indicaram que o crescimento sob agitação fora marcantemente benéfico ao crescimento celular (NEWBURGH, 1954; STARKEY; JONES; FREDERICK, 1956).

Buscando dirimir estas diferenças de opinião Cook (1964) realizou um estudo sobre a influência da agitação do meio de cultivo no crescimento celular de *A. thiooxidans*. Os resultados demonstraram que o crescimento em cultivos agitados imediatamente após a inoculação sofreu um impacto negativo no crescimento celular, e que em concentrações de enxofre acima de 20 $g.L^{-1}$ a supressão do crescimento foi completa. Entretanto, em cultivos não agitados, concentrações de até 100 $g.L^{-1}$ de enxofre não foram inibitórias. Cook relatou que a aderência de células à superfície das partículas de enxofre foi essencial para o crescimento. A forte interação ocorreu através de agentes umectantes como fosfatidilinositol produzidos e liberados pelas bactérias, e que são dispersos quando o meio é imediatamente agitado (SCHAEFFER; UMBREIT, 1963). Os melhores resultados de crescimento celular

foram obtidos em cultivos que receberam 10 $g.L^{-1}$ de enxofre elementar e deixados em repouso por 3 dias de incubação antes de iniciada a agitação. Neste caso, a agitação foi definitivamente estimuladora.

3.9 Biossensores Ópticos

Biossensores são dispositivos analíticos que combinam um elemento de reconhecimento biológico com um transdutor para produzir um sinal proporcional à concentração de analito e permitir a detecção ou quantificação de espécies de interesse em áreas como medicina, monitoramento ambiental, segurança e processamento de alimentos (LEI et al, 2006).

O desenvolvimento de biossensores começou há mais de 25 anos. Alguns têm sido comercializados para aplicações especiais como determinação de glicose no sangue e controle de bioprocessos. Apresentam vantagens operacionais em relação aos métodos fotométricos tradicionais, como a rapidez de resposta, facilidade de uso, custo, simplicidade e portabilidade. Entretanto, sua comercialização ainda encontra desafios como a instabilidade do elemento de reconhecimento biológico (STREHLITZ et al, 2008).

As enzimas são os biorreceptores mais empregados na fabricação de biossensores (DU et al, 2008). Embora as enzimas possuam uma alta especificidade para seus substratos ou inibidores, sua aplicação na construção de biossensores é limitada pela etapa de purificação, normalmente um processo caro e demorado, requerendo muitas vezes múltiplas enzimas, cofatores ou coenzimas para gerar o produto de interesse. O uso de micro-organismos se apresenta como uma alternativa importante, pois muitas enzimas e cofatores coexistentes nas células lhes conferem a habilidade e consumir e, consequentemente, detectar diversas substâncias, além de poderem ser manipuladas para degradar novas substâncias em função das condições de cultivo (LEUNG et al, 1997).

O princípio de detecção de um biossensor é ilustrado na Figura 22. O biorreceptor, constituído de anticorpos, enzimas, proteínas, ácidos nucléicos,

organelas ou células, apresentam a propriedade de reconhecer e interagir com o analito de interesse. Dessa interação resultam sinais decorrentes de alterações das propriedades físico-químicas do sistema. O elemento transdutor converte este sinal biológico em uma resposta mensurável como corrente, potencial ou absorção de luz por meios eletroquímicos ou ópticos, que serão amplificados, processados e armazenados para posterior análise.

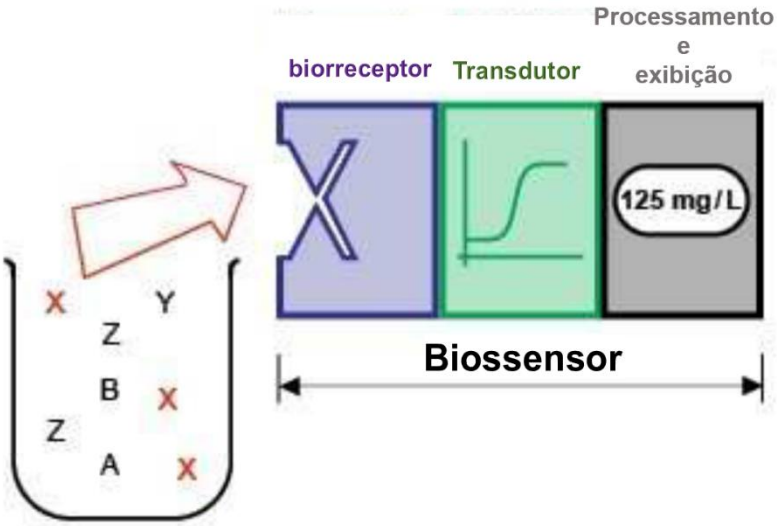


Figura 22 – Princípio de detecção de um biossensor. Adaptado de Strehlitz et al. (2008).

Em biossensores ópticos este sinal pode resultar de modificações de absorbância, luminescência, atividade óptica, fosforescência e mudanças no índice de refração decorrentes da interação entre o analito e o biorreceptor.

A bioluminescência é associada à emissão de luz por micro-organismos vivos e tem um importante papel no monitoramento de processos em tempo real. A compreensão da organização e funcionamento de genes bioluminescentes tem estimulado o desenvolvimento de biossensores celulares com diversas aplicações ambientais. As aplicações em biossensores bioluminescentes incluem a detecção e quantificação de contaminantes, a determinação da toxicidade de poluentes, o monitoramento da atividade metabólica celular, a detecção de patógenos e a distinção entre a forma biodisponível e inerte de poluentes metálicos (TECON; MEER, 2008).

As fusões gênicas com genes lux de bactérias luminescentes têm sido empregadas para o desenvolvimento de biossensores ópticos. Nestes biossensores, promotores reagem à presença intracelular do contaminante, controlando genes sinalizadores que codificam proteínas repórteres como as luciferases procariota (*lux*) e eucariota (*luc*) gerando respostas luminescentes que podem ser relacionadas às condições gerais de estresse, à concentração e biodisponibilidade de metais, compostos genotóxicos, oxidantes e orgânicos xenobióticos (COSTA, 2015; DAUNERT et al, 2000). Um biossensor óptico empregando células íntegras de *Ralstonia eutropha* AE2515 foi construído para detecção da biodisponibilidade de Ni^{2+} e Co^{2+} pela fusão transcricional de genes reguladores cnrYXH com o sistema repórter bioluminescente *lux* CDABE (TIBAZARWA et al, 2001). Costa, Salgado e Barrocas (2013) desenvolveram um biossensor microbiano bioluminescente empregando a bactéria *Escherichia coli* MC1061 que foi modificada por engenharia genética para emissão de luz reagindo especificamente à presença de Hg(II). A emissão de luz foi proporcional à concentração de mercúrio absorvida pela célula e permitiu o monitoramento ambiental da biodisponibilidade de mercúrio.

Outra tecnologia aplicada a biossensores que alcançou grandes avanços nos últimos 20 anos foi a tecnologia de Ressonância de Plasma de Superfície (SPR). A maior parcela das publicações empregando SPR foram dedicadas à bio-sensibilidade, ao acoplamento a diferentes técnicas, especialmente as eletroquímicas, e ao estudo das interações biomoleculares. A Ressonância de Plasma de Superfície é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal, normalmente constituído de Ag, Au, Cu ou Al, e outro, um dielétrico (CARVALHO et al, 2003).

A tecnologia de SPR aplicada à biossensores é baseada na excitação da superfície plasmática presente dentro do filme metálico do sensor, monitorando a medida da mudança do índice de refração. A concentração de biomoléculas na superfície está relacionada diretamente com a mudança no sinal da SPR. Essa tecnologia vem sendo usada em diferentes tipos de analitos, como por exemplo, a determinação de riboflavina em leite (CAELEN et al, 2004) e o estudo da hibridização de DNA (MALICKA et al, 2003).

Um sensor baseado em SPR utilizando finas camadas de cobre e óxido de zinco foi desenvolvido para determinação de H_2S em concentrações entre 10 $mg.L^{-1}$ e 100 $mg.L^{-1}$. Quando o H_2S gasoso entra em contato com a camada de zinco do sensor ocorrem modificações na constante dielétrica e no índice de refração desta camada aumentando o comprimento de onda ressonante proporcionalmente à concentração de H_2S (TABASSUM et al, 2013).

A análise química por espectrofotometria consiste de um método bem fundamentado e sempre aceito em função de sua precisão e acurácia, além de apresentar vantagens como boa frequência analítica e baixo custo de implementação e manutenção (HAMZAH et al, 2013; FIGUEIREDO et al, 2009). Quando a radiação eletromagnética atinge a matéria analisada verificam-se alterações em seu comportamento, havendo fenômenos óticos dos quais fazem parte a absorção, emissão, difração, reflexão e polarização, em toda a gama do espectro eletromagnético. O método espectrofotométrico é a medida quantitativa das propriedades de reflexão ou transmissão de um material em função do comprimento de onda. (SACRAMENTO, 2014).

O método espectrofotométrico é aplicado em biossensores empregando variadas configurações e biorreceptores, como células de plantas (WONG; CHONG, 2014), oligonucleotídeos (SATTARAHMADY et al, 2015), aptâmeros (WU et al, 2010), enzimas (HAMZAH et al, 2013) e células bacterianas íntegras (KIM et al, 2015). Adiguzel (2018) desenvolveu um biossensor para detecção de proteínas a partir da adição e secagem de albumina diretamente em cubeta de quartzo, encontrando linearidade para concentrações de albumina de até 50 $\mu mol.L^{-1}$. Gupta et al. (2008) desenvolveram um biossensor para íons Fe^{3+} baseado na absorbância em 450nm observada pelo complexo formado com sideróforos produzidos por *Pseudomonas fluorescens*. O tempo necessário para estabilização do sinal variou entre 5 e 60 min em função da concentração de Fe^{3+} analisada.

Em uma configuração diferente, células íntegras de *Flavobacterium* spp. foram utilizadas na detecção de metil-paration, um inseticida organofosforado. A membrana citoplasmática do micro-organismo possui enzimas que hidrolisam o metil-paration com formação de paranitrofenol, que pode ser detectado em comprimento de onda

característico em 410 nm. As células foram imobilizadas por adsorção em filtro de fibra de vidro de 5 cm de diâmetro e acondicionadas em um reator fechado e conectado por fibra ótica a um espectrofotômetro. Após a adição de solução do analito a luz de um LED foi conduzida para o reator por fibra ótica, incidiu sobre a amostra e foi então recoletada por um sensor de fibra ótica que a conduziu ao espectrofotômetro (KUMAR et al, 2006).

3.10 Biossensores potenciométricos

O elemento transdutor é parte essencial de um biossensor, sendo responsável pela conversão do sinal físico-químico, gerado pela interação entre o analito e o biocomponente, em um sinal elétrico mensurável e proporcional à concentração da espécie de interesse. A escolha do tipo de transdutor aplicado ao biossensor depende do produto desta interação. A geração ou consumo de íons ou gases, modificações térmicas ou de massa, ou de absorbância ou condutância do meio, definem o transdutor apropriado, seja ele eletroquímico, espectrofotométrico, térmico ou piezoelétrico (EGGENSTEIN et al, 1999; EGGINS, 1996).

As interações bioquímicas comumente ocorrem através de reações de oxirredução, gerando neste processo modificações em propriedades elétricas do sistema, como condutividade, resistência, produção de corrente ou potencial elétrico. Estas características, associadas à sua simplicidade, baixo custo de instrumentação, rapidez de resposta e operação em meios opticamente densos, fazem dos biossensores de transdução eletroquímica os mais comumente empregados, destacando-se os transdutores amperométricos e potenciométricos (SILVA, 2004).

Os transdutores potenciométricos envolvem medidas de variação do potencial de oxirredução do meio ou a detecção de íons produzidos ou consumidos aplicando eletrodos de íon-seletivos (EIS), sendo o último mais comumente empregado em biossensores (KARYAKIN et al, 1996). Os eletrodos de íon-seletivos empregam uma membrana, constituída normalmente de vidro, filme polimérico ou de um precipitado inorgânico. Essa membrana é presa ao fundo do corpo cilíndrico de um eletrodo

indicador, contendo em seu interior um eletrodo de referência interno. Este eletrodo, junto a um segundo eletrodo de referência externo são então imersos no meio contendo o íon de interesse.

O EIS responde especificamente a um íon, mesmo na presença de outros. Os íons gerados na reação metabólica são detectados, gerando um acúmulo de carga e um aumento na densidade de carga na superfície do eletrodo, sendo desenvolvida uma diferença de potencial na região limítrofe entre as fases (RUIZ, 2006).

Os potenciais dos eletrodos de referência são considerados constantes. Assim, a diferença de potencial na fronteira entre as fases é proporcional ao logaritmo da atividade do íon em questão, sendo definida pela equação de Nernst (Equação 14).

$$E_I = E_i^o + \frac{RT}{z_i F} \ln a_I(aq) = E_i^o + \frac{2{,}303RT}{z_i F} \log a_I(aq) \qquad \text{Equação 14}$$

Onde:

E_I = Diferença de potencial entre o eletrodo indicador e de referência;

E_I^o = Constante;

a_I = Atividade do íon I na solução analisada;

z_I = Carga do íon I;

R = Constante dos gases, igual a 8,3144 J K^{-1} mol^{-1};

F = Constante de Faraday, igual a $9{,}6484.10^4$ C mol^{-1};

T = Temperatura absoluta.

De acordo com a equação 14, um aumento de 10 vezes na atividade do íon I, com uma carga z_I, promove uma variação de 59,16 mV/z_I (LINDNER; PENDLEY, 2013). Este valor reflete o limite de sensibilidade de um eletrodo potenciométrico, isto é, a variação máxima de potencial observada por década de concentração de analito. Buscando superar esta limitação eletrodos modificados têm sido constituídos. Como exemplo, Karyakin et al. (1996) relatam que alcançaram uma inclinação na curva de

potencial de eletrodo *versus* pH igual a 118 mV por unidade de pH, utilizando a enzima tripsina imobilizada na superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com polianilina.

De forma geral, os biossensores potenciométricos são construídos a partir da imobilização do biocomponente na superfície ou nas imediações do transdutor. Após o tempo de estabilização do potencial de célula, a substância analisada é adicionada ao sistema, provocando variações na força eletromotriz da célula até que um novo potencial de equilíbrio é alcançado. Esta variação de potencial observado é proporcional à concentração da substância analisada. Este princípio pode ser aplicado na determinação de diversas substâncias de interesse (Quadro 4).

Quadro 4 – Espécies químicas analisadas por biossensores potenciométricos (MELO, 2009).

Espécie analítica	**Autores**
Ureia	WANG et al, 2003; LAKARD et al, 2004; RAJESH et al, 2005; KURALAY et al, 2005; JHA et al, 2008.
Etanol	ROTARIU et al, 2004
Glicose	KORMOS et al, 2000; ADELOJU e MOLINE, 2001; TINKILIC et al, 2002; LIAO et al, 2007.
Ácido L-ascórbico	FERNANDES et al, 1999.
Lisina	SAURINA et al, 1998; SAURINA et al, 1999; VILLAR et al, 2003.

Trivedi et al. (2009) descrevem o desenvolvimento de um biossensor para ureia em leite, sendo bastante ilustrativo do potencial de aplicação dos transdutores potenciométricos. Neste caso foi utilizado um eletrodo íon-seletivo contendo a enzima urease imobilizada por encapsulamento em uma matriz polimérica. Os autores relatam que a ação da enzima urease sobre a ureia produz NH_3 e CO_2, que reagem com a água produzindo íons NH_4^+, HCO_3^- e H^+, sendo neste caso possível desenvolver um

biossensor eletroquímico usando diversos eletrodos, sensíveis aos gases NH_3 ou CO_2, ou aos íons NH_4^+ ou H^+. Foi construído um eletrodo sensível ao íon NH_4^+, tendo como resposta analítica a diferença de potencial em relação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl. O limite de detecção foi $2,5.10^{-5}$ $mol.L^{-1}$, e a sensibilidade de 57,8 mV por década de concentração, apresentando uma estabilidade de 25 a 30 dias.

A utilização de H_2S como fonte de elétrons por *A. thiooxidans* tem como principal produto ácido sulfúrico, o que provoca um aumento na condutividade elétrica no meio e uma redução no valor de pH. O aumento na condutividade é um dado inespecífico, visto que o meio conterá outros íons e que terão suas concentrações variadas em amostras reais. Um transdutor potenciométrico pode ser aplicado para medição do potencial redox do sistema $S^=/SO_4^=$. Entretanto, este método dificilmente pode ser aplicado em sistemas multicomponentes, pois são gerados potenciais mistos e sua relação com a concentração de sulfeto torna-se ambígua (SILVA, 2000).

O ácido sulfúrico é um ácido forte, permanecendo em meio aquoso na sua forma ionizada. A produção de íons H^+ é uma alteração físico-química específica e diretamente relacionada ao consumo de H_2S por *A. thiooxidans*, podendo ser monitorada através de um eletrodo sensível a íons hidrogênio. Assim, o método de transdução potenciométrico é apropriado ao desenvolvimento do sistema biossensor para determinação de H_2S. A produção biológica de íons H^+ aumenta o potencial eletroquímico medido até que seja alcançado um estado estacionário. Conhecendo-se a acidez inicial do sistema, a variação de potencial observada é relacionada à concentração de H_2S presente no sistema. As variações de potencial observadas para diferentes concentrações de H_2S adicionados ao sistema biossensor permite a construção de uma curva de calibração relacionando a variação de potencial observada à concentração de analito.

3.11 Biossensores para detecção de H_2S

Embora sejam conhecidos diversos métodos de determinação de sulfeto de hidrogênio, conforme relatado no item 3.4, o desenvolvimento de biossensores tem sido ampliado durante os últimos 10 anos, especialmente para aplicação no

monitoramento ambiental e na área de saúde. Seu uso como ferramenta analítica alternativa às técnicas tradicionais deve-se especialmente às vantagens como a minimização do pré-tratamento de amostras, simplicidade de uso, redução dos custos e do tempo de análise e a sua considerável sensibilidade e seletividade (URSULA; ANTHONY, 2000; CHEN et al, 2012).

Alguns dos biossensores desenvolvidos para H_2S são baseados no caráter inibitório da atividade de algumas enzimas. Uma vez que é esperado que a porcentagem de inibição seja proporcional à concentração de sulfeto, biossensores de inibição podem ser construídos, especialmente os eletroquímicos, por sua simplicidade, baixo custo e rapidez de resposta (LAWRENCE et al, 2003).

A aplicação de métodos espectrofotométricos de detecção também pode ser utilizada para o desenvolvimento de biossensores ópticos de inibição. O composto pirogalol produz, na presença de H_2O_2 e da enzima peroxidase, um composto de cor laranja cuja absorbância pode ser observada em 420 nm. A presença de sulfeto de hidrogênio inibe a atividade da peroxidase, minimizando a formação do composto de cor laranja. Consequentemente, a absorbância na ausência e na presença de diferentes concentrações de H_2S em águas residuais de refinamento de açúcar pôde ser monitorada (GHADIRI et al, 2013).

A diferença de absorbância medida a 420 nm, na ausência e na presença de H_2S, dividida pela absorbância na ausência de inibidor, pode ser definida como a porcentagem de inibição. Quanto maior a quantidade de H_2S presente no meio, maior o caráter inibitório deste sobre a enzima peroxidase, de forma que pode ser obtida uma relação linear entre a porcentagem de inibição e a concentração de sulfeto de hidrogênio (GHOUS; TOWNSHEND, 1998).

Liu et al. (2008) desenvolveram um biossensor amperométrico para detecção de sulfeto em águas residuais de tratamento de couro e de usina de geração de energia. O método foi baseado na inibição da atividade da enzima peroxidase de raiz forte sobre Concavalin A. Na construção deste biossensor a enzima peroxidase imobilizada sobre a superfície de um eletrodo converte hidroquinona à benzoquinona, e a benzoquinona formada é reduzida novamente à hidroquinona à medida que o H_2O_2 é reduzido. A corrente de redução formada é proporcional à concentração de H_2O_2 e

relacionada à atividade da enzima. O sulfeto presente na amostra analisada ataca o grupo heme da enzima, causando inativação por bloqueio dos sítios ativos. Consequentemente, a corrente de redução sofre uma diminuição proporcional à concentração de sulfeto.

A quantificação de sulfeto de hidrogênio a partir da inibição da atividade de peroxidase de raiz forte na presença de sulfeto de hidrogênio, baseado no bloqueio do mecanismo catalítico descrito acima, foi explorada por outros grupos de pesquisa, através de diferentes formas de imobilização da enzima sobre o eletrodo, buscando aumentar o limite de resposta e a sensibilidade do biossensor. Zhao et al. (1996) desenvolveram um biossensor para detecção quantitativa de cianeto, tioureia e sulfeto pela imobilização de peroxidase de raiz forte (HRP) em nanopartículas de ouro coloidal, encontrando um limite de detecção de sulfeto de 8 $\mu mol.L^{-1}$.

Yang et al. (2004) construíram um biossensor amperométrico para H_2S pela imobilização covalente de HRP através da técnica de monocamada automontada (SAM). Neste trabalho foi usada cisteamina ligada à superfície de um eletrodo de ouro. Os grupos mercaptílicos da cisteamina foram utilizados para imobilização de HRP através de ligações cruzadas com glutaraldeído, obtendo-se um biossensor por inibição que segundo os autores apresentou boa estabilidade, seletividade e baixo custo. O biossensor foi testado em amostras de água corrente de montanha fortificada com H_2S e foi obtido um limite de detecção de 0,3 $\mu mol.L^{-1}$ de sulfeto.

O funcionamento de um biossensor eletroquímico enzimático requer a conjugação entre enzima e as reações de oxirredução que estas participam. Esta conjugação pode ser alcançada em um biossensor potenciométrico pela medida das variações de potencial redox do meio ou através do uso de eletrodos íons seletivos, capazes de detectar íons produzidos ou consumidos durante o processo enzimático (KARYAKIN et al, 1996).

A enzima ascorbato oxidase catalisa a oxidação do ácido ascórbico através da redução do oxigênio molecular. O íon sulfeto possui ação inibitória sobre essa enzima. Assim, se esta reação ocorrer na superfície de um eletrodo sensível ao oxigênio, a redução na concentração de O_2 dissolvido pode ser relacionada à concentração de sulfeto presente no meio. Baseado neste princípio, Poor et al. (2014) desenvolveram

um biossensor para sulfeto através da imobilização da enzima ascorbato oxidase na superfície de membrana de Nylon. Esta enzima foi misturada a solução de glutaraldeído 12,5 % (m/m) e a mistura distribuída de forma homogênea na superfície da membrana de Nylon, sendo então fixada na extremidade de um eletrodo de Clark para oxigênio como elemento transdutor.

É interessante ressaltar que os valores de redução na concentração de oxigênio foram obtidos pela medida de sua concentração na ausência de H_2S e na presença de diferentes concentrações de H_2S, depois de atingido o estado estacionário. O tempo de resposta foi de cerca de 60 segundos, obtendo-se uma relação linear para diferentes concentrações de H_2S (POOR et al, 2014).

Os biossensores enzimáticos apresentam altas seletividade, sensibilidade e atividade catalítica. Entretanto, os custos com produção e purificação de enzimas são altos e representam uma desvantagem frente aos biossensores microbianos (FRENCH; GWENI, 2011). Por sua vez, os biossensores microbianos são mais duráveis, apresentam menor custo e são mais estáveis, sofrendo menor influência de variações nas condições do meio, pois as enzimas estão protegidas em seu ambiente natural (SASAKI et al, 1997; BELKIS et al, 2008).

As características metabólicas das espécies dos gêneros *Acidithiobacillus* e *Thiobacillus* podem ser aplicadas no desenvolvimento de biossensores para determinação de H_2S. Estes micro-organismos são quimiolitotróficos obrigatórios, sendo por este motivo esperada uma boa seletividade para biossensores que os utilizam como elemento de reconhecimento biológico (KUBO et al, 1995). Além disso, são bactérias aeróbias, de forma que o consumo de sulfeto de hidrogênio é acompanhado, em sistema fechado, de uma redução na quantidade de oxigênio dissolvido, cuja concentração pode ser monitorada através de um eletrodo sensível ao oxigênio.

Um biossensor microbiano para detecção de sulfeto de hidrogênio foi desenvolvido a partir da imobilização de *Thiobacillus thioparus* TK-m em uma matriz de álcool polivinílico, utilizando um eletrodo para oxigênio dissolvido como elemento transdutor (MIRZAEI et al, 2014). Esta bactéria é capaz de degradar sulfeto com produção de ácido tiossulfúrico ou ácido politiônico, na presença de oxigênio, em pH

entre 5 e 7. Assim, o consumo de oxigênio pode ser monitorado e relacionado à concentração de H_2S presente no meio.

A tecnologia de imobilização de enzimas e bactérias é uma etapa crítica no desenvolvimento de biossensores, sendo determinantes para a estabilidade operacional e para durabilidade do biossensor. Uma das técnicas de imobilização mais utilizadas para imobilização celular é a de encapsulamento. Nesta técnica as células vivas são retidas no interior e na superfície de uma matriz polimérica porosa, que permite a difusão dos substratos até as células, e a saída dos metabólitos produzidos (WU; WISECARVER, 1991). O álcool polivinílico (PVA) é um polímero com resistência mecânica, barato e não é tóxico aos micro-organismos, sendo adequado à imobilização microbiana (ZHANGA et al, 2009).

O biorreator utilizado no biossensor construído por Mizraei et al. (2014) foi constituído de uma câmara de detecção contendo uma entrada para o eletrodo sensível ao oxigênio e outra para injeção de ar e H_2S gasoso. Foram adicionados 300 mL de solução 50 mM de tampão fosfato de pH 7 contendo as células de *T. thioparus* imobilizadas em esferas de alginato de sódio e PVA, como representado na Figura 23 (MIRZAEI et al, 2014).

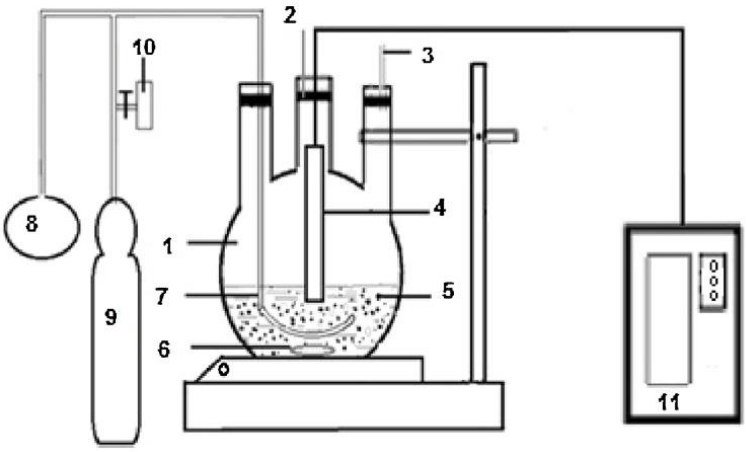


Figura 23 – Diagrama esquemático do sistema biossensor para H_2S. (1) biorreator; (2) tampa de teflon; (3) termômetro; (4) sensor para oxigênio dissolvido; (5) esferas imobilizadas; (6) agitador magético; (7) entrada de gás; (8) bomba de ar; (9) tanque de H_2S; (10) medidor de fluxo; (11) computador (MIRZAEI et al, 2014).

Foi observada uma relação linear entre a redução nas concentrações de oxigênio dissolvido e a concentração de H_2S. Esta redução foi obtida a partir da diferença entre as concentrações de O_2 inicial e em estado estacionário para concentrações de sulfeto de hidrogênio entre 1 $mg.L^{-1}$ e 20 $mg.L^{-1}$ (Figura 24).

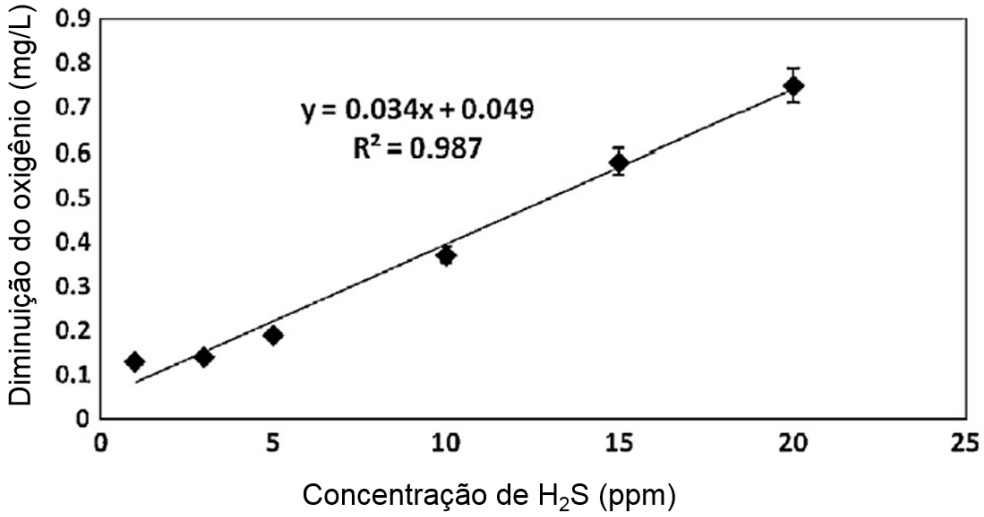


Figura 24 – Curva de correlação linear entre concentração de H_2S e de oxigênio dissolvido. Adaptado de Mirzaei et al. (2014).

Os mesmos princípios foram utilizados por Vosoughi et al. (2015) para a construção de um biossensor microbiano para sulfeto de hidrogênio, utilizando o mesmo sistema de transdução e elemento de reconhecimento biológico. Neste caso, o objetivo do trabalho foi a avaliação do impacto de diferentes métodos de imobilização de *Thiobacillus thioparus* no tempo de resposta do biossensor. As bactérias foram imobilizadas na superfície de esferas de alginato de sódio e de agarose, por sua alta porosidade, adequada à imobilização celular (JAISWAL; PRAKASH, 2011).

Os resultados deste trabalho indicaram um tempo de resposta para imobilização em alginato de sódio e em agarose de 72 s e 120 s, respectivamente. Foi possível a determinação de sulfeto em baixas concentrações de H_2S como 0,5 $mg.L^{-1}$. O sulfeto de hidrogênio apresentou alta solubilidade em solução salina normal, de forma que cerca de 80 % do H_2S injetado estava em sua forma dissolvida e não ionizada (VOSOUGHI et al, 2015).

Conforme discutido anteriormente, as bactérias da espécie *Thiobacillus thioparus* são capazes de utilizar enxofre, H_2S, tiossulfato e tetrationato como espécies eletrodoadoras em seu metabolismo, formando sulfato, enxofre e íons H^+ como produtos finais de oxidação, de acordo com as equações a seguir (VISHNIAC, 1952; CACERES et al, 2010; EBRAHIMI et al, 2014).

$$3\ S_4O_6^{=} + 5/2\ O_2 + H_2O \rightarrow 4\ S_3O_6^{=} + 2\ H^+ \qquad \text{Equação 15}$$

$$5\ S_2O_3^{=} + 4\ O_2 + H_2O \rightarrow 6\ SO_4^{=} + 4\ S + 2\ H^+ \qquad \text{Equação 16}$$

$$2\ HS^- + O_2 \rightarrow 2\ S + 2OH^- \qquad \text{Equação 17}$$

$$H_2S + 2\ O_2 \rightarrow SO_4^{=} + 2\ H^+ \qquad \text{Equação 18}$$

Embora ocorra a formação de enxofre elementar em seu metabolismo, a oxidação de sulfeto de hidrogênio ocorrerá preferencialmente, até que este acabe, sendo então o metabolismo direcionado para oxidação do enxofre. Esta característica se deve ao fato de que mais energia pode ser adquirida pela célula pela oxidação de H_2S em comparação ao enxofre elementar (POLLOCK; KNOX, 1943).

Uma vez que o produto final de oxidação metabólica de sulfeto de hidrogênio é o ácido sulfúrico, não apenas a redução na concentração de O_2 pode ser utilizada para monitorar o consumo de H_2S, como também a formação de íons H^+ em solução pode ser acompanhada e relacionada à concentração de sulfeto de hidrogênio presente no meio. A partir destes conceitos Ebrahimi et al. (2014) desenvolveram um biossensor baseado em variações de potencial em solução para sulfeto de hidrogênio, que segundo os autores, foi o primeiro do gênero a ser investigado.

O biossensor construído consistia de um biorreator de 50 mL com saídas na parte superior para entrada de H_2S, ar e para um eletrodo de pH, utilizado como elemento transdutor para a medida das variações de concentração de íons H^+. Seu funcionamento consistia de uma etapa de aeração de uma solução salina, utilizada como eletrólito, até sua saturação, seguida da etapa de introdução de H_2S gasoso em quantidade adequada a cada concentração.

Os micro-organismos foram imobilizados por encapsulamento em esferas de alginato de sódio e por adsorção na superfície de gelatina suportada em fina membrana de silicone, e utilizando solução a 5 % de glutaraldeído para fixação das bactérias. Diferentes concentrações celulares e de gelatina foram testadas, mostrando que há uma relação ótima entre estes fatores. Um excesso de gelatina pode inibir o transporte de oxigênio e H_2S até as células imobilizadas, enquanto uma alta concentração celular leva a formação de um biofilme que impede a chegada destes substratos aos micro-organismos em camadas inferiores.

O máximo de alteração no potencial de eletrodo de hidrogênio foi obtido para gelatina, com método de imobilização por adsorção. As condições de imobilização otimizadas indicaram uma concentração de gelatina de 0,6 % e uma densidade óptica bacteriana igual a 88. Estas condições foram obtidas a partir de um modelo matemático e estatístico de análise de variância (ANOVA), relacionando a variação de potencial observada e as diferentes condições experimentais. O tempo de resposta foi definido neste trabalho como o tempo necessário para que fosse observada uma mudança em particular no potencial de hidrogênio, enquanto em outros trabalhos estes é definido como o tempo necessário até que o sinal observado se torne estável (DAMGAARD et al, 2001). As mudanças nos potenciais em função da concentração de H_2S foram registradas para ambos os métodos de imobilização, sendo obtida uma relação linear entre 1 e 30 $mg.L^{-1}$ de H_2S para o método de imobilização por adsorção, enquanto para o método de encapsulamento foi obtida uma relação quadrática, segundo os autores, por limitações no processo de transferência de massa.

Embora alguns biossensores tenham sido desenvolvidos para determinação do sulfeto de hidrogênio, estes são em sua maioria biossensores amperométricos e de inibição enzimática, sendo escassas as informações sobre biossensores microbianos. Os únicos trabalhos encontrados na literatura sobre este tema são os relatados neste item, sendo todos desenvolvidos por pesquisadores da Universidade de Tehrân, no Iran.

Os dois biossensores microbianos desenvolvidos por estes pesquisadores foram baseados na atividade da bactéria *Thiobacillus thioparus* sobre o H_2S. A aplicação de *Acidithiobacillus thiooxidans* em biossensor potenciométrico, como o desenvolvido

nesta tese, apresenta algumas potenciais vantagens frente ao *T. thioparus*. A taxa de consumo de H_2S é cerca de 26 vezes maior para *A. thiooxidans*, estando ambos em condições ótimas de metabolismo (AROCA et al, 2007). O produto majoritário de metabolismo do *A. thiooxidans* é H_2SO_4, em condições de alta acidez e oxigenação suficiente, enquanto *T. thioparus* tende a formar enxofre como produto de oxidação em meio próximo à neutralidade, entre diversas outras espécies sulfuradas formadas em seu metabolismo, conforme discutido anteriormente. Além disso, o pH ótimo para atuação de *A. thiooxidans* corresponde a condição em que a espécie altamente predominante em equilíbrio é H_2S, enquanto em pH ótimo de atuação de *T. thioparus* o H_2S corresponde a cerca de 50 % das espécies, existindo em equilíbrio especialmente com o íon HS^- (RABBANI et al, 2015).

4. Materiais e Métodos

Este item apresenta os métodos, condições experimentais, equipamentos e reagentes utilizados para alcançar os objetivos deste trabalho. Foram desenvolvidas metodologias buscando otimizar as condições de cultivo, determinar a concentração celular, caracterizar o comportamento dos biossensores e definir as condições de sistema que favorecem o controle metabólico de *A. thiooxidans*.

4.1 Equipamentos e reagentes

As técnicas utilizadas neste trabalho envolvem reagentes e equipamentos pertencentes aos laboratórios da Escola de Química da UFRJ, cujo uso foi gentilmente concedido pelos professores responsáveis. Estes são listados nos itens a seguir.

4.1.1 Equipamentos

- Placa de aquecimento e agitação (QUIMIS);
- Agitador de tubos Vortex (QUIMIS);
- Espectrofotômetro UV-visível (FEMTO – 800 XI)
- Balança AG200- IV2000 – Analisador de Umidade por Infra-vermelho, (GEHAKA);
- Centrífuga (QUIMIS);
- Medidor de pH (TECNOPON – Mpa 210);
- Microscópio óptico (Olympus CX-31);
- Autoclave vertical (Prismatec).

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes foram adquiridos em grau P.A. da Sigma-Aldrich e utilizados conforme recebidos. Os meios de cultura, vidrarias e ponteiras plásticas de pipeta utilizadas nos experimentos de crescimento microbiológico foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121 ºC. O enxofre, por fundir a 106,8 ºC, não pode ser autoclavado junto ao outros materiais, sendo esterilizado separadamente. Neste caso, o procedimento consistiu em dividir o enxofre em envelopes de papel alumínio contendo 1 g cada, autoclavados por 3 dias consecutivos a 100 ºC por 30 min (ATCC, 2011).

Reagentes: Hidróxido de sódio em pastilha, sulfeto de sódio, iodo ressublimado, tiossulfato de sódio, solução de ácido clorídrico, sulfato de amônio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, diidrogeno-fosfato de potássio, sulfato ferroso, cloreto de potássio, cloreto férrico, enxofre elementar.

4.1.2.1 Solução de tiossulfato de sódio

As soluções de tiossulfato de sódio foram preparadas semanalmente a partir da dissolução de 0,248 g de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ em água destilada suficiente para 500 mL de solução. As soluções produzidas foram padronizadas utilizando dicromato de potássio como padrão primário (MORITA; ASSUMPÇÃO,1993). O procedimento consistiu na dissolução de 50 mg de $K_2Cr_2O_7$, seco por 3 h a 150 ºC, em 50 mL de água. Foram adicionados à solução cerca de 1 g de KI e 1 mL de HCl concentrado pouco antes da titulação com a solução de tiossulfato de sódio. Utilizou-se 1 mL de solução de goma de amido 1 %(m/v) como indicador. A concentração de tiossulfato foi calculada estequiometricamente através das equações 23 e 24.

$$K_2Cr_2O_{7(aq)} + 6\ KI_{(aq)} + 14\ HCl_{(aq)} \rightarrow 8\ KCl_{(aq)} + 2\ CrCl_{3(aq)} + 3\ I_{2(aq)} + 7\ H_2O_{(l)}$$

Equação 23

$$I_{2(aq)} + 2\ Na_2S_2O_{3(aq)} \rightarrow 2\ NaI_{(aq)} + Na_2S_4O_{6(aq)}$$ Equação 24

4.1.2.2 Solução de sulfeto de hidrogênio

As soluções de sulfeto de hidrogênio utilizadas nos biossensores foram obtidas em concentrações entre 1 e 100 $mg.L^{-1}$ a partir da dissolução de quantidade apropriada de sulfeto de sódio ($Na_2S.9H_2O$) em água destilada. A determinação da concentração das soluções de H_2S seguiu uma adaptação dos procedimentos utilizados por Oliveira Filho et al. (2004) e de Almeida et al. (2009). O procedimento está descrito abaixo, na sequência em que foi realizado.

1. Adicionou-se 1mL de solução de iodo 0,02 $mol.L^{-1}$ a um Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada.

2. Transferiu-se 5 mL de solução de H_2S ao Erlenmeyer contendo a solução de iodo, sendo deixado em repouso por 10 min em local escuro.

3. Titulou-se o excesso de iodo com solução padronizada de $Na_2S_2O_3$ 0,002 $mol.L^{-1}$ até que a coloração original quase desparecesse.

4. Adicionou-se ao sistema 1 mL de solução de goma de amido a 1 % (m/v). A solução adquire coloração azul característica do complexo formado entre o íon I_3^- e o amido. A solução de amido deve ser adicionada próximo ao final da titulação, pois o amido forma com o íon tri-iodeto um complexo insolúvel em água e retém em sua estrutura parte do iodo presente na solução.

5. A titulação foi continuada até o desaparecimento da coloração azul, sendo o volume de titulante utilizado registrado.

6. Foi iniciada uma nova titulação, nas mesmas condições, entretanto, substituindo a solução de H_2S por igual volume de água destilada. O volume ao final da titulação corresponde ao volume utilizado para o ensaio em branco. O experimento foi realizado em duplicata.

O sulfeto de hidrogênio reage com o iodo conforme a equação 25 e o excesso de iodo reage com o tiossulfato de sódio segundo a equação 26.

$$H_2S_{(aq)} + I_{2(aq)} \rightarrow 2\ H^+_{(aq)} + 2\ I^-_{(aq)} + S_{(s)} \qquad \text{Equação 25}$$

$$2\ S_2O_3^{2-}{}_{(aq)} + I_{2(aq)} \rightarrow 2\ I^-_{(aq)} + S_4O_6^{2-}{}_{(aq)} \qquad \text{Equação 26}$$

Considerando a estequiometria destas reações foi construída a equação 27, utilizada para a determinação da concentração das soluções de H_2S.

$$C_{H_2S}(mg/L) = \frac{M_{S_2O_3^=} \times V_{S_2O_3^=} \times 34 \times 1000}{2 \times V_{H_2S}} \qquad \text{Equação 27}$$

Onde:

$M_{S_2O_3^=}$ = Concentração em quantidade de matéria de $Na_2S_2O_3$.

$V_{S_2O_3^=}$ = Diferença, em mililitros, entre o volume de tiossulfato de sódio utilizado na titulação do branco e da amostra de H_2S.

V_{H_2S} = Volume, em mililitros, de solução de H_2S adicionada.

4.1.3 Micro-organismo

A bactéria utilizada em todas as etapas do processo é da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* FG-01, isolado de efluente ácido de mina de urânio em Figueira, no Paraná (GARCIA JR., 1991). O micro-organismo foi gentilmente doado pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM). Os cultivos são mantidos no CETEM por repique a cada três meses em solução de sais do meio “9K” (SILVERMAN; LUNDGREEN, 1959), em pH 2,8 e substituindo-se a fonte de energia Fe^{2+}, por enxofre elementar, e mantidos refrigerados a 5 ºC.

4.2 Remoção de enxofre disperso em cultivos de *A. thiooxidans*

O enxofre elementar não consumido permanece disperso em cultivos crescidos de *A. thiooxidans*. Este deve ser removido do sistema para obtenção de valores de concentração celular confiáveis e representativos.

A remoção do enxofre não consumido foi testada a partir de duas técnicas: centrifugações sucessivas e filtração do meio de cultivo crescido. Foram testadas combinações de velocidade de rotação de 1600, 900, 400, 100 e 25 xg e tempos de centrifugação de 5, 4, 3, 2, 1,5 e 1 minutos. Comparativamente, foram realizadas filtrações a vácuo sucessivas em papéis de filtro de porosidade 7,5 µm e 2 µm até a obtenção de valores estáveis de absorbância.

4.3 Definição do meio e condições de cultivo

Diversos meios de cultivo são aplicáveis a micro-organismos da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* em função da existência de modificação genética, da cepa aplicada, ou de sua não especificidade, tratando-se muitas vezes de consórcio de micro-organismos. Portanto, há entre os diferentes meios de crescimento encontrados na literatura variações de condições e composição ou concentração do meio mineral.

Os subitens a seguir descrevem os diferentes meios e condições de cultivo testados. Os resultados dos experimentos foram avaliados por medidas potenciométricas de íons H^+ (pH) e espectrofotométricas da densidade óptica celular em 620nm (DO_{620}). Para obtenção de todas as medidas o enxofre residual foi previamente removido por centrifugação e retornou ao sistema de crescimento nos experimentos envolvendo medidas diárias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.3.1 Estudo da composição do meio de cultivo

Foram avaliados três meios de cultivo relatados na literatura. O meio de cultivo “Meio A” é citado no site da ATCC (American Type Culture Collection) como adequado para *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™ (ATCC, 2011). O meio de cultivo identificado como “Meio B” corresponde ao meio de crescimento 9K estritamente mineral (SILVERMAN; LUNDGREEN, 1959) e utilizado nos trabalhos de França e Figueiredo (2001) e por Oprime et al. (2001) para a espécie *A. thiooxidans* FG-01. O “meio C” é mais complexo, permitindo avaliar a influência de sais de manganês e ferro no crescimento celular. Este consiste no meio de cultivo utilizado por Liu et al. (2003) para *A. thiooxidans* OMG, com exceção do antibiótico antifúngico Nistatina. As composições dos meios testados são apresentadas a seguir, nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 – Meio de cultivo para *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™ (ATCC, 2011).

Meio A (solução aquosa)	
Composição	Concentração ($g.L^{-1}$)
$(NH_4)_2SO_4$	0,2
KH_2PO_4	3,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,5
$CaCl_2$	0,25
$FeSO_4$	0,005
S^0	10,0

Tabela 6 – Meio de cultivo para *Acidithiobacillus thiooxidans* 9K estritamente mineral (SILVERMAN; LUNDGREEN, 1959).

Meio B (solução aquosa)	
Composição	Concentração ($g.L^{-1}$)
$(NH_4)_2SO_4$	3
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4.7H_2O$	0,5
$Ca(NO_3)_2$	0,01
KCl	0,1
S^0	10,0

Tabela 7 – Meio de cultivo para *Acidithiobacillus thiooxidans* OMG (LIU et al, 2003).

Meio B (solução aquosa)	
Composição	Concentração ($g.L^{-1}$)
$(NH_4)_2SO_4$	2,54
KH_2PO_4	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,1
$MnSO_4$	0,02
$CaCl_2$	0,03
$FeCl_3$	0,02
S^0	10,0

Os experimentos foram iniciados no mesmo dia e a partir de um mesmo cultivo original. As demais condições de sistema foram: temperatura: 30 ºC, pH inicial: 4, concentração de inoculo: 10 %(v/v), volume de suspensão: 100 mL, agitação orbital: 150 rpm.

Os resultados de crescimento foram avaliados por espectrofotometria. No décimo dia de crescimento o enxofre disperso no meio de crescimento foi removido por dupla centrifugação em 25 xg por 1,5 min. O sobrenadante foi homogeneizado e foi obtida a leitura da absorbância da suspensão celular a 620 nm.

4.3.2 Estudo da influência da condição de agitação

O crescimento celular foi acompanhado e avaliado sob duas diferentes condições de agitação. Em uma delas o meio de crescimento após a inoculação foi deixado em repouso por 3 dias e então levado a agitação orbital a 150 rpm. Em uma condição comparativa, o meio de crescimento foi levado a agitação orbital a 150 rpm imediatamente após a inoculação. As modificações de pH e DO_{620} foram acompanhadas até que fossem observados valores constantes de absorbância, indicando o início da fase estacionária de crescimento (LIU et al, 2003; LEE et al. 2000).

4.3.3 Estudo da influência da concentração de enxofre no crescimento

O crescimento de *A. thiooxidans* ocorre a partir de uma etapa primária de adsorção dos micro-organismos na superfície do enxofre. Assim, a área superficial e, consequentemente, a quantidade de enxofre dispersa no meio influenciam a taxa de crescimento. A influência da concentração inicial de enxofre foi avaliada para meios de crescimento contendo 10 $g.L^{-1}$ e 20 $g.L^{-1}$ de enxofre elementar. Os sistemas foram acompanhados por medidas diárias de pH e DO_{620} até que fossem alcançados valores constantes de absorbância, sendo conduzidos em temperatura: 30 ºC, pH inicial: 3, concentração de inoculo: 10 %(v/v), volume de suspensão: 100 mL, agitação orbital: 150 rpm.

4.3.4 Estudo da influência da concentração de inóculo no crescimento bacteriano

A influência da quantidade inicial de células na taxa de crescimento e na concentração celular máxima alcançada na fase estacionária foi avaliada a partir de sistemas contendo 10 e 20 %(v/v) de inóculo em meio ATCC 125. As demais condições de sistema foram 30 ºC, concentração de enxofre 10 $g.L^{-1}$ e pH igual a 3. A agitação em 150 rpm foi iniciada imediatamente após a inoculação.

4.3.5 Otimização das condições de cultivo variando o pH inicial, a concentração de enxofre e a temperatura

A influência dos fatores temperatura, pH e concentração de enxofre no meio reacional foram estudadas a partir de um planejamento de experimentos com fatorial completo 2^3, com dois níveis, descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Níveis do fatorial completo 2^3 para condições de crescimento de *A. thiooxidans*.

	Fatores		
Níveis	**Temperatura (ºC)**	**pH**	**Concentração de enxofre (g/L)**
Baixo (-)	26	3	10
Alto (+)	30	4	20

Os sistemas contendo 10%(v/v) de inóculo em meio ATCC 125 foram mantidos sob agitação orbital a 150 rpm. Os resultados, expressos em função da densidade óptica celular, foram obtidos ao final de 10 dias de crescimento. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do programa Design Expert®.

Os experimentos seguiram a organização descrita na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros dos experimentos de fatorial completo 2^3.

Experimento	pH	Enxofre (g/L)	Temperatura (ºC)
1	4	20	26
2	3	20	26
3	3	20	30
4	3	10	26
5	4	10	30
6	3	10	30
7	4	10	26
8	4	20	30

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente a partir da análise de variância (ANOVA) e a partir desta foram definidas as condições de crescimento utilizadas em todas as culturas subsequentes.

4.4 Curva de crescimento e determinação da concentração celular

A inoculação do meio de cultura consistiu em adicionar enxofre elementar a um Erlenmeyer de 250 mL seco e esterilizado e tampá-lo com rolha de algodão. Em outro frasco foram adicionados 90mL de meio ATCC 125 e 10 mL de inóculo crescido por 8 dias (COOK, 1964). O pH foi ajustado à 3,0 com solução de NaOH 1 $mol.L^{-1}$. O conteúdo do frasco contendo o inóculo em meio ATCC 125 foi cuidadosamente adicionado ao Erlenmeyer, pelas paredes do recipiente de forma a não molhar o enxofre, ou seja, este deve estar flutuando sobre o meio de cultura (ATCC, 2011). O sistema foi então levado a agitação orbital a 150 rpm nas melhores condições definidas no item 4.3.5.

O crescimento celular foi acompanhado diariamente por turbidimetria, através de medidas espectrofotométricas em 620 nm e através de medidas potenciométricas do pH até que fosse alcançada uma medida constante para construção da curva de crescimento microbiano (LIU et al, 2003).

4.4.1 Determinação do peso seco celular

O cultivo crescido por 10 dias foi centrifugado para a remoção do enxofre. O sobrenadante foi centrifugado por 10 min em 5400 x g (KHAN et al, 2012) e a biomassa foi filtrada a vácuo em membrana Milipore de porosidade 0,2 µm e pesada em uma balança que elimina toda a umidade da amostra. A concentração celular foi obtida dividindo a massa celular pelo volume de suspensão filtrada (9 mL).

A curva de calibração foi construída relacionando a concentração celular e a absorbância medida por espectrofotometria em 620 nm para a suspensão celular concentrada. A absorbância máxima corresponde à concentração celular na solução original. A partir desta foram realizadas diluições para 7 diferentes concentrações analisadas por espectrofotometria. Obteve-se no total 8 pontos para a determinação da equação da reta que relaciona concentração celular e absorbância. Esta curva de calibração foi utilizada nos experimentos subsequentes para determinação da concentração celular.

4.5 Ensaios com o Biossensor Potenciométrico

Em função de sua volatilidade o sulfeto de hidrogênio foi confinado em diferentes configurações de reatores. Estes consistiram em frascos Erlenmeyers fechados com tampa de borracha ou de algodão e reator de vidro com tampa de vedação em teflon. Volumes apropriados de solução de sulfeto de hidrogênio, de concentração determinada por iodometria, e dispersões celulares de concentração ajustada por medidas de absorbância em 620 nm foram misturados. As respostas foram obtidas a partir da variação de potencial de eletrodo em relação a um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) a partir de uma condição definida de pH. Para manutenção da concentração celular entre os experimentos foram utilizadas dispersões celulares de concentração 2,2 $g.L^{-1}$.

O procedimento para obtenção das dispersões celulares utilizadas nos experimentos consistiu na remoção do enxofre por dupla centrifugação dos cultivos de *A. thiooxidans* em 25 xg por 1,5 min. O sobrenadante foi centrifugado por 20min

em 5400 xg e as células precipitadas foram ressuspensas em solução salina 0,85 % (m/v).

4.5.1 Experimentos em sistema fechado com tampa de borracha

O sistema de reação consistiu em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de suspensão celular, 40 mL de solução de H_2S 30 $mg.L^{-1}$ e 80 mL de água destilada, preenchendo quase completamente o frasco reator. Este foi fechado com tampa de borracha que foi furada de forma a acomodar o eletrodo de hidrogênio. O pH foi ajustado a 3 com soluções de NaOH e HCl diluídos e a variação em milivolt foi acompanhada por 3 h sob agitação branda. Foram realizadas alterações neste sistema, avaliando a influência do meio reacional, substituindo a água destilada por meio de cultivo ATCC 125 e a prévia aeração por 15 min da mistura de meio reacional e suspensão celular. A Tabela 10 apresenta as condições experimentais aplicadas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 10 – Condições experimentais aplicadas aos reatores em sistema fechado para consumo de H_2S por *A. thiooxidans* (DO_{620}=2,0).

Condições de sistema	1	2	3	4	5
Concentração de H_2S ($mg.L^{-1}$)	30	30	30	30	30
Volume de H_2S (mL)	40	40	40	40	40
Volume de meio ATCC 125 (mL)	0	0	80	80	50
Volume de H_2O (mL)	80	80	0	0	0
Densidade óptica da suspensão em 620 nm	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Volume de suspensão (mL)	10	10	10	10	40
pH	3	3	3	3	3
Aeração	N	S	N	S	S

Nota: N=sem aeração prévia; S=aeração por 15min.

4.5.2 Experimentos em sistema fechado com tampa porosa

Os sistemas de reação consistiram em Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de solução de H_2S de concentrações 30 $mg.L^{-1}$ a 50 $mg.L^{-1}$, e 25 mL de dispersões celulares com 6 dias de crescimento e densidade óptica 2,0. Foram testados pHs iniciais dos sistemas entre 1,0 e 3,5. Em uma condição comparativa as células foram mantidas por 24 ou 48 h em tubos falcon fechados com tampa, na ausência de nutrientes, antes de serem ressuspendidas em solução salina 0,85 % (m/v). Para as medidas potenciométricas o eletrodo de pH foi envolvido em gaze de algodão e ajustado ao Erlenmeyer de forma a minimizar a perda de H_2S conforme representado na Figura 25.

Figura 25 – Reator utilizado nos experimentos em sistema fechado com tampa porosa. Fonte: O autor (2018).

4.5.3 Experimentos utilizando o reator fechado com tampa de teflon

Foi desenvolvido um reator para determinação de H_2S, em sistema fechado, utilizado em três diferentes configurações. Em uma primeira configuração, representada na Figura 28, 150 mL de meio ATCC 125 aerado por 15 min foi misturado a sulfeto de sódio em quantidade necessária para produção de 30 $mg.L^{-1}$ de H_2S e adicionados ao reator, que foi imediatamente fechado. A acidez do sistema foi ajustada a pH 3 com soluções de HCl ou NaOH diluídos, utilizando uma micropipeta. Através do funil de decantação foram adicionados 25 mL de suspensão celular de densidade óptica 2,0 e pH 3. A acidez da mistura foi novamente ajustada a pH 3 e após sua estabilização a variação de potencial, em mV, foi acompanhada ao longo do tempo. O sistema foi mantido sob agitação branda.

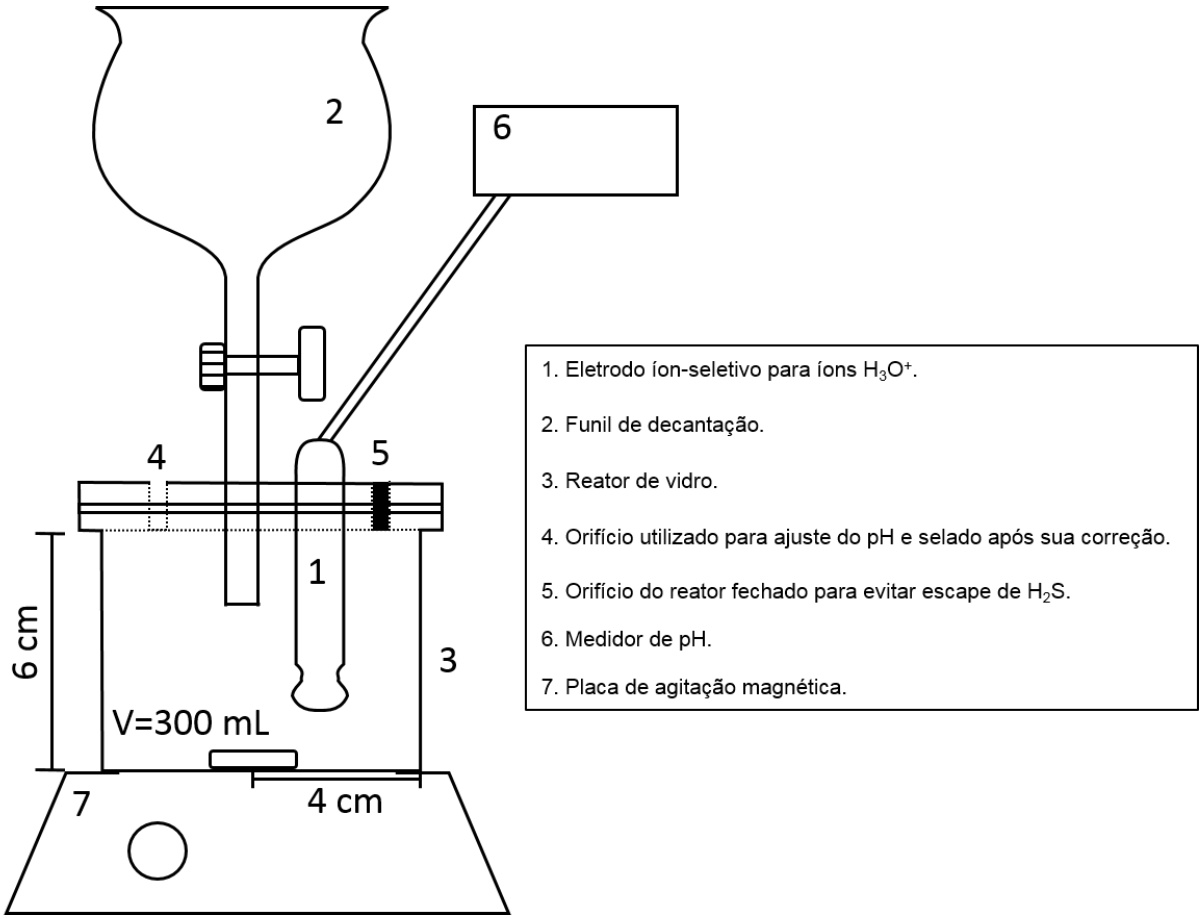


Figura 26 – Esquema de construção do sistema de determinação de H_2S em meio ATCC 125 não aerado utilizando o reator de vidro em configuração 1.

Em uma segunda configuração, representada na Figura 27, foram utilizadas as mesmas condições de sistema aplicadas para o sistema reator com a primeira configuração, adicionando um sistema para aeração com vazão controlada durante o experimento. Uma mangueira conectada a uma bomba de ar foi acoplada ao sistema e outra conectou o sistema a um béquer contendo acetato de zinco 1 mol.L^{-1}.

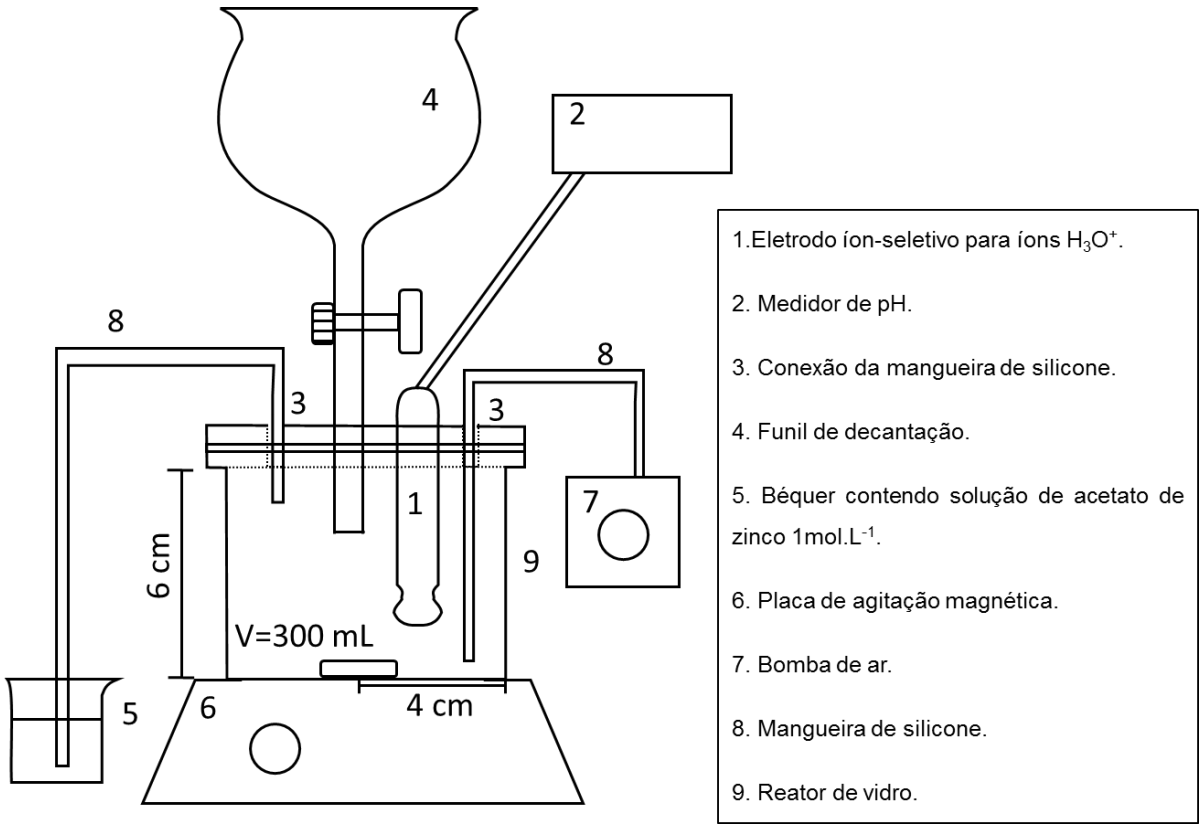


Figura 27 – Esquema de construção do sistema de determinação de H_2S em meio ATCC 125 aerado utilizando o reator de vidro em configuração 2.

A terceira configuração do reator (Figura 28) foi desenvolvida de forma a reduzir o volume de meio líquido, aumentando a razão entre a concentração celular e a concentração de sulfeto de hidrogênio. Esta configuração promove um aumento do volume de ar disponível para biorreação em relação às configurações 1 e 2. O procedimento consistiu em adicionar à um béquer de plástico 30 mL de suspensão

celular em densidade óptica 2,0 e pH 3,2. O sistema foi fechado e 25 mL de solução de H_2S foi adicionada ao bécher através do funil de separação. O pH foi ajustado, quando necessário, através da adição de soluções de HCl ou NaOH diluídos. O sistema foi mantido sob agitação branda e, após estabilização do pH, o potencial de eletrodo foi acompanhado ao longo do tempo.

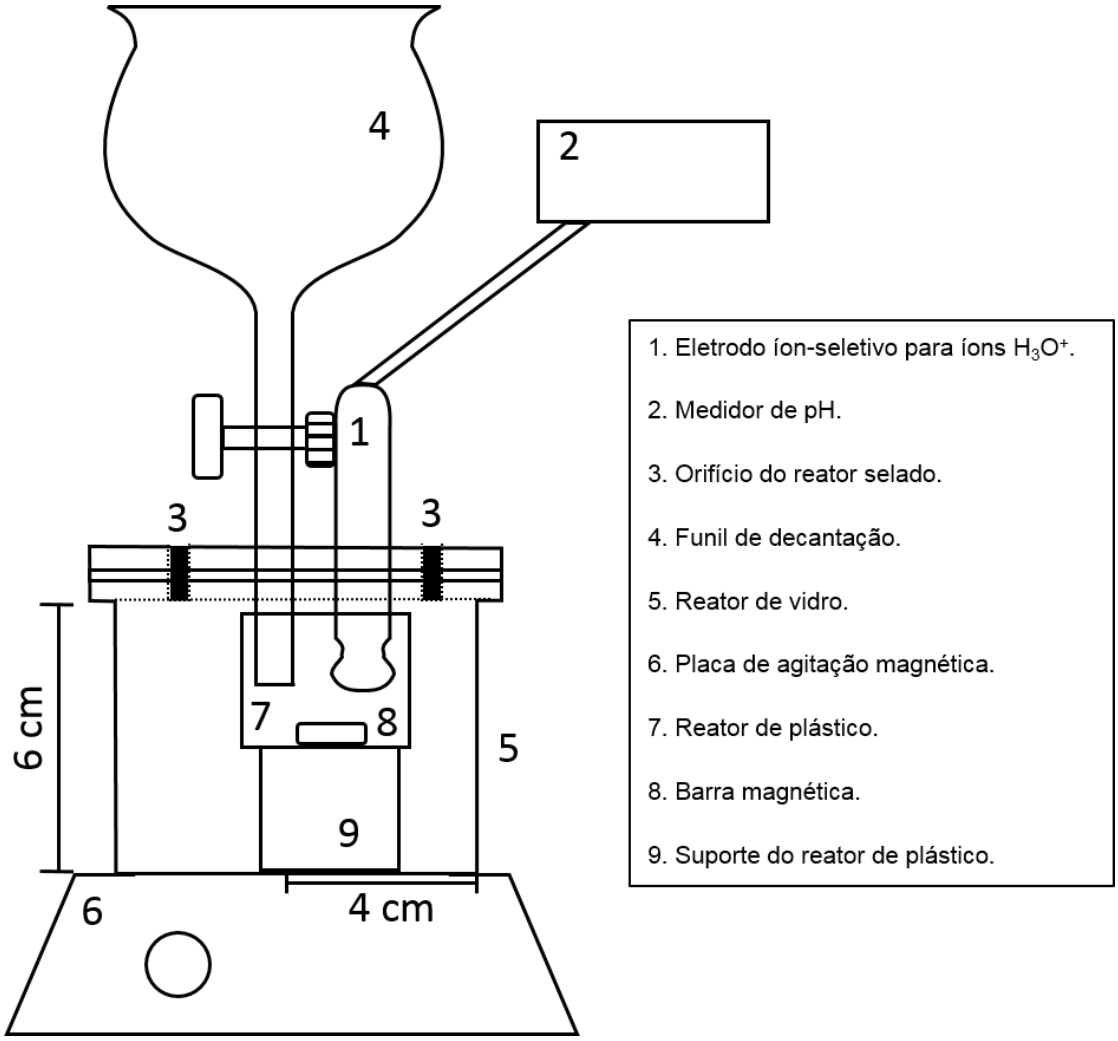


Figura 28 – Esquema de montagem do reator de vidro em configuração 3 contendo 30 mL de suspensão celular (DO=2,0) e 25 mL de solução de H_2S.

4.5.3.1 Brancos reacionais na ausência de células e de sulfeto de hidrogênio

Foram realizados dois testes controle para avaliação da resposta potenciométrica empregando o reator de vidro com a configuração 3. Em um primeiro teste foi avaliada a resposta para um sistema na ausência de células, contendo 30 mL de solução salina em pH 3,0 e 25 mL de solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$. Após a mistura o pH do sistema foi ajustado para 3,5. O segundo teste avaliou a resposta na ausência de sulfeto de hidrogênio. Foram misturados 30 mL de suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$ em pH 3,0 com 25 mL de água destilada. O pH foi ajustado após mistura a 3,5. Após estabilização do pH a variação de potencial e do pH foi acompanhada por 3 h.

4.5.3.2 Influência de possíveis espécies químicas interferentes

Uma possível aplicação do biossensor potenciométrico é a determinação de H_2S em água produzida, cuja concentração pode alcançar 140 $mg.L^{-1}$ de sulfeto dependendo da formação geológica e da localização do reservatório de petróleo (E&P FORUM, 1994) e variar entre 5 e 110 $mg.L^{-1}$ de H_2S em tanques de separação para tratamento da mistura entre óleo e água, especialmente pela atividade de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (ALMEIDA et al, 2009).

Para avaliar a influência na resposta potenciométrica de íons presentes na água produzida foram realizados ensaios empregando o reator com tampa de teflon com a configuração 3 na determinação de H_2S em concentração 30 $mg.L^{-1}$. O sulfeto de sódio foi dissolvido diretamente em solução contendo os íons relacionados na Tabela 11, na concentração determinada por Andrade (2009) para água produzida coletada no Terminal da Petrobras localizado em São Sebastião, no estado de São Paulo.

Tabela 11 – Composição da água produzida coletada de Terminal da Petrobras em São Sebastião, São Paulo. Adaptado de Andrade (2009).

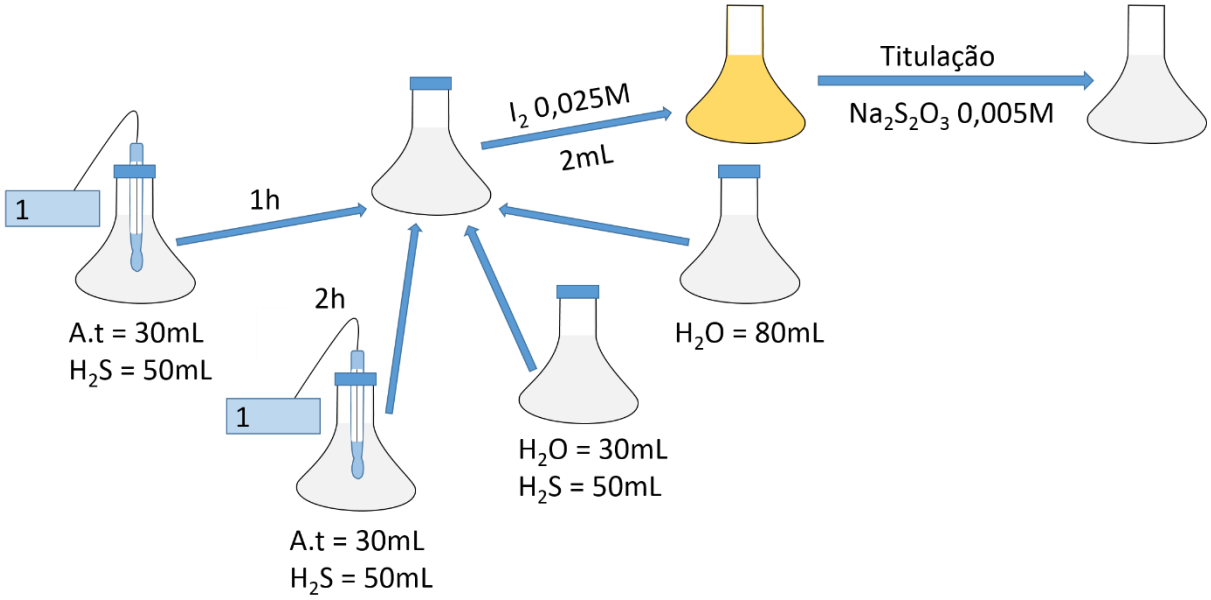
Parâmetro	Concentração ($mg.L^{-1}$)
sódio	2251
cloreto	26473
cálcio	786
magnésio	528
fósforo	8,2
bário	12,6
amônio	99
potássio	243
nitrato	50
sulfato	500

Outros metais como zinco, níquel, manganês, berílio, cádmio, chumbo, estanho e mercúrio foram determinados por Andrade (2009) em concentração inferior a 0,2 $mg.L^{-1}$ e não foram adicionados à solução analisada pelo biossensor. A concentração de H_2S foi determinada e ajustada pelo método iodométrico e a análise foi realizada em pH 3,5 a partir da mistura de 25 mL de solução contendo H_2S e 30 mL de suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$. Os resultados foram comparados com um ensaio em branco, realizado em condições semelhantes, mas na ausência de H_2S. Neste caso a solução de H_2S foi substituída por 25 mL de solução contendo os sais em composição descrita na Tabela 11.

4.6 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação entre a resposta potenciométrica e a titulação iodométrica

A extensão da reação de consumo e de oxidação completa de H_2S por *A. thiooxidans* foi avaliada, respectivamente, por titulação iodométrica e por medidas de

variação de potencial. Os sistemas consistiram de Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL suspensão celular (DO_{620}=0,5) e 50 mL de solução de H_2S 20 mg.L^{-1} fechado com tampa de borracha nitrílica. O pH do sistema foi ajustado a 2. A variação de potencial, em mV, foi acompanhada ao longo da reação entre a suspensão celular e a solução de H_2S. Após determinado tempo de reação o consumo de H_2S foi avaliado por iodometria utilizando soluções de $Na_2S_2O_3$ e I_2. Um volume conhecido de solução de iodo foi adicionado ao sistema após o tempo de reação definido e o iodo não consumido pelo H_2S foi titulado com solução de tiossulfato de sódio 0,005 mol.L^{-1} até o desaparecimento da coloração castanho-alaranjada, característica do iodo. Comparativamente, foram realizadas nas mesmas condições titulações de sistemas contendo 80 mL de água e a mistura de 30 mL de água destilada e 50 mL de solução de H_2S. Estes consistiram nos ensaios em branco realizados na ausência e na presença de sulfeto de hidrogênio. O procedimento é esquematicamente representado na Figura 29.



1 - medidor de pH

A.t - suspensão celular.

Figura 29 – Esquema experimental de consumo de H_2S por potenciometria e titulação iodométrica

4.7 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação da resposta potenciométrica e por espectrofotometria

As extensões das reações de oxidação completa e incompleta de H_2S podem ser relacionadas através de medidas potenciométricas e espectrofotométricas, respectivamente. O experimento consistiu em dois sistemas de consumo de H_2S, em condições semelhantes, que foram monitorados por 3 h através de medidas de pH e de absorbância em 620 nm. Os sistemas consistiram de 25 mL de solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ misturados em um Erlenmeyer de 50 mL a 25 mL de suspensão celular de densidade óptica 2,0 e pH 2. Ambos os sistemas foram preparados a partir de mesmas solução de H_2S e suspensão celular. Os Erlenmeyers foram fechados com tampa porosa e a mistura mantida sob agitação branda pelo tempo do experimento. Um sistema teve o pH monitorado, enquanto do outro foram retiradas alíquotas de 2 mL, a cada 15 min, que foram levadas à leitura espectrofotométrica em 620 nm e retornaram ao sistema após leitura.

4.8 Ensaios com o Biossensor Óptico

A formação de enxofre elementar como produto de oxidação de sulfeto de hidrogênio por *A. thiooxidans* foi acompanhada espectrofotometricamente. Nos experimentos de desenvolvimento do biossensor óptico para H_2S um volume apropriado de suspensão celular e solução de H_2S foram diretamente misturados em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e a evolução da absorbância em 620nm foi acompanhada em função do tempo. A definição do tempo de resposta foi baseada na saturação da biorreação (RAMESH et al, 2015) que consistiu no intervalo de tempo necessário para a estabilização da resposta espectrofotométrica.

4.8.1 Preparo das dispersões celulares para aplicação no biossensor óptico

As células foram cultivadas em condições ótimas definidas no item 4.3.5. Após determinado tempo de crescimento o enxofre elementar residual foi removido por

filtração a vácuo. Os cultivos crescidos foram filtrados duas vezes através de papel de filtro de porosidade 7,5 µm e uma terceira vez através de papel de filtro de porosidade 2 µm. A suspensão resultante foi centrifugada em 5400 xg por 20 minutos. O precipitado celular foi suspenso em solução salina normal e o pH foi ajustado com soluções de NaOH 1 $mol.L^{-1}$ e HCl 10 %(v/v) até que fosse alcançada a densidade óptica e o pH determinados.

4.8.2 Caracterização da resposta espectrofotométrica

A origem do aumento de absorbância observado em 620 nm foi explorada através de experimentos realizados na ausência ou presença de células e sulfeto de hidrogênio e na observação do espectro de absorção de possíveis espécies químicas formadas durante a reação.

4.8.2.1 Resposta à presença de H_2S

A resposta de aumento de absorbância em 620 nm foi testada para soluções de H_2S de concentrações 25 $mg.L^{-1}$ e 70 $mg.L^{-1}$. A leitura espectrofotométrica foi zerada com água destilada. A cubeta de quartzo contendo 1,7 mL de suspensão celular de densidade óptica 2,0 e pH igual a 1,0 foi posicionada no espectrofotômetro. Com o auxílio de uma micropipeta 1,7 mL de solução de H_2S foram adicionados diretamente à cubeta, sobre a suspensão celular. A leitura espectrofotométrica foi zerada imediatamente após a mistura e acompanhada até a obtenção de uma resposta constante.

4.8.2.2 Resposta à ausência de H_2S e à ausência de células

A origem do aumento de absorbância foi explorada através de dois testes controle. Em um primeiro teste 1,7 mL de suspensão celular de pH 1,0 e DO_{620} igual a 2,0 foram adicionados à cubeta de quartzo. Esta foi posicionada no espectrofotômetro e 1,7 mL de solução salina normal foram adicionados sobre a suspensão. A leitura espectrofotométrica foi zerada imediatamente após a mistura e

acompanhada por 10 minutos. O procedimento foi repetido, substituindo a suspensão celular por igual volume de solução salina normal e a solução salina normal por igual volume de solução de H_2S a 30 $mg.L^{-1}$. Os experimentos são sumarizados na Tabela 12.

Tabela 12 – Discriminação das condições experimentais para determinação da resposta espectrofotométrica à ausência de células e de H_2S.

	Suspensão celular em pH 1,0 e DO_{620} 2,0 (mL)	Solução de H_2S 30 $mg.L^{-1}$ (mL)	Solução de NaCl 0,85 % (mL)
Resposta à ausência de células		1,7	1,7
Resposta à ausência de H_2S	1,7		1,7

4.8.2.3 Espectro de absorção das espécies químicas H_2S, $SO_4^=$, $S_2O_3^=$ e NaCl

Espécies químicas presentes ou produzidas no sistema durante a biorreação podem potencialmente influenciar a resposta espectrofotométrica. Para avaliar a influência das espécies químicas H_2S, $SO_4^=$, $S_2O_3^=$ e NaCl foi realizada uma varredura de seus espectros de absorção entre 200 e 900 nm. Foram analisadas soluções 25 $mg.L^{-1}$ de H_2S e 1.000 $\mu mol.L^{-1}$ de NaCl, $Na_2S_2O_3$ e Na_2SO_4.

4.8.3 Influência do tempo de cultivo celular na resposta espectrofotométrica

A taxa metabólica e consequentemente o consumo de H_2S podem ser influenciados pela idade celular. As células de cultivos crescidos nas condições definidas no item 4.4 foram colhidas em diferentes estágios de crescimento e aplicadas para análise de soluções de H_2S a 50 $mg.L^{-1}$. A análise consistiu em acompanhar o aumento da absorbância em 620nm de misturas de 1,7 mL de solução de H_2S e 1,7 mL de dispersões celulares com pH ajustado em 2,0 e DO_{620} igual a 2,0.

As dispersões celulares foram obtidas a partir de diferentes cultivos com 4, 6, 7, 9 e 11 dias de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.4 Influência da variação de pH na resposta espectrofotométrica

Modificações no pH extracelular provocam alterações bioquímicas e fisiológicas que afetam o metabolismo de *A. thiooxidans* sendo uma variável importante a ser caracterizada no comportamento do biossensor.

O efeito do pH foi avaliado para dispersões celulares obtidas a partir de um mesmo cultivo crescido por 6 dias. A mistura reacional consistiu em 1,7 mL de solução de H_2S a 30 $mg.L^{-1}$ e 1,7 mL de suspensão celular de DO_{620} igual 2,0. A resposta espectrofotométrica em 620 nm foi avaliada para dispersões celulares com pH ajustado em 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0. Foram realizadas no mínimo duas repetições para cada diferente condição de acidez.

4.8.5 Repetitividade e reprodutibilidade da resposta espectrofotomética

O procedimento experimental para a determinação da repetitividade e da reprodutibilidade consistiu em adicionar à cubeta de quartzo sequencialmente 1,7 mL de suspensão celular, 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL de solução de H_2S de concentração 50 $mg.L^{-1}$. A leitura espectrofotométrica foi zerada para descontar a redução de absorbância provocada pela diluição e o aumento de absorbância foi acompanhado por 10 minutos. As dispersões celulares foram obtidas de cultivos crescidos por 6 dias e utilizadas em pH 1,0 e densidade óptica 2,0.

A repetitividade foi avaliada a partir da variância e desvio padrão relativo de 13 determinações sucessivas de uma mesma suspensão celular e solução de H_2S. A determinação da reprodutibilidade da resposta do biossensor foi obtida através de medidas realizadas em 4 dias ao longo de um mês.

4.8.6 Influência da concentração de H_2S na resposta espectrofotométrica

A quantidade de enxofre elementar formado na biorreação está estequiometricamente relacionada à quantidade de H_2S consumida no sistema. A relação entre a quantidade de H_2S disponível e a resposta espectrofotométrica foi obtida a partir da análise de soluções de sulfeto de hidrogênio de concentrações entre 5 e 100 $mg.L^{-1}$. Foram utilizadas dispersões celulares obtidas a partir de diferentes cultivos com 6 dias de crescimento, densidade óptica em 620 nm igual a 2,0 e pH ajustado em 1,0. A resposta espectrofotométrica foi obtida para misturas de 1,7 mL de solução de H_2S e 1,7 mL de suspensão celular. Os experimentos foram realizados em triplicata. A partir destes resultados foram definidos importantes parâmetros do biossensor, como sensibilidade, limite de detecção, faixa de linearidade e a obtenção de uma curva de calibração que permitiu correlacionar a resposta de absorbância em 620nm com a concentração de sulfeto de hidrogênio.

4.8.7 Influência de possíveis espécies químicas interferentes

A seletividade é um importante fator na performance de um biossensor. A potencial influência da presença de diversas espécies iônicas na resposta espectrofotométrica foi avaliada a partir de soluções contendo 1.000 $\mu mol.L^{-1}$ dos sulfatos dos cátions Na^+, K^+, NH_4^+, Fe^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} e dos sais de sódio correspondentes aos ânions Cl^-, I^-, $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-}, NO_3^- e HPO_4^{2-}.

Os experimentos na presença de interferentes foram realizados a partir de 1,7 mL de suspensão celular em pH 1,0 e DO_{620} igual a 2,0 adicionada à cubeta de quartzo. A cubeta foi posicionada no espectrofotômetro e sobre a suspensão celular foram adicionados 1,0mL de cada solução de interferente e 1,0 mL de solução de H_2S a 50 $mg.L^{-1}$. Para análise da interferência de cada espécie foi realizado um ensaio em branco pela substituição dos interferentes por igual volume de água destilada.

Dois testes controle foram realizados para avaliar a interação entre o H_2S e potenciais espécies interferentes. O procedimento adotado foi semelhante ao descrito acima, sendo a suspensão celular substituída por igual volume de solução salina. No

primeiro teste a solução de interferente foi substituída por igual volume de uma solução contendo 1.000 µmol.L^{-1} de todos os interferentes. No segundo teste a solução de interferente foi substituída por igual volume de meio ATCC 125. A Tabela 13 apresenta as quantidades das espécies participantes no teste com interferentes e no teste controle.

Tabela 13 – Condições experimentais dos experimentos com potenciais espécies químicas interferentes e testes controle de resposta do biossensor.

Suspensão celular em pH 1,0 e DO_{620} 2,0 (mL)	Solução de NaCl 0,85 % (mL)	Solução de H_2S 50 mg.L^{-1} (mL)	Solução contendo 1.000 µmol.L^{-1} de cada interferente (mL)	Meio ATCC 125 (mL)	Solução contendo 1.000 µmol.L^{-1} de todos os interferentes (mL)
1,7		1,0	1,0		
	1,7	1,0			1,0
	1,7	1,0		1,0	

4.9 Ensaios com amostra real – Água produzida

Os ensaios com amostra real foram divididos em duas etapas para o biossensor óptico. Em uma primeira etapa a resposta foi avaliada para um simulacro de água produzida, na ausência dos constituintes orgânicos comumente encontrados. Em uma segunda etapa o ensaio foi realizado com uma amostra real de água produzida, gentilmente cedida pelo Centro de Pesquisa da Petrobras (CENPES).

Na primeira etapa foram misturados diretamente na cubeta de quartzo, posicionada no espectrofotômetro, 1,7 mL de suspensão celular em pH 1 e concentração 2,2 g.L^{-1} e 1,7 mL de solução de H_2S 30 mg.L^{-1} contendo íons nas concentrações descritas na Tabela 12. O espectrômetro foi zerado e a absorbância em 620 nm foi acompanhada por 10 min. O ensaio foi realizado em cinco replicatas.

Para a segunda etapa foi utilizada solução de água produzida acrescida de 30 mg.L^{-1} de H_2S a partir da dissolução de 0,0105 g de $Na_2S.9H_2O$ em 50 mL de solução. O cultivo celular empregado foi mantido em repouso por 1h após

ressuspensão e ajuste de pH em 1 antes de sua utilização. A análise foi realizada a partir da mistura de 1,7 mL de suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$ e 1,7 mL de solução de água produzida contendo H_2S. O espectrômetro foi zerado imediatamente após a mistura e a absorbância foi acompanhada em 620 nm por 20 min. O experimento foi realizado em triplicata.

Os ensaios com o biossensor potenciométrico foram realizados a partir da análise de água produzida acrescida de 30 $mg.L^{-1}$ e 50 $mg.L^{-1}$ de H_2S, a partir da dissolução de massa apropriada de sulfeto de sódio diretamente na água produzida. Os experimentos foram realizados empregando o reator de vidro com a configuração 3, a partir da mistura de 30 mL de suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$ em pH 2,2 e 25 mL de solução de água produzida contendo H_2S. O pH foi ajustado em 3,5 utilizando soluções diluídas de HCl e NaOH e a variação de potencial, em mV, foi acompanhada ao longo do tempo.

5. Resultados e Discussão

5.1 Estudo da remoção de enxofre do meio crescido

A remoção das células do meio de crescimento envolve longos períodos de centrifugação a altas velocidades de rotação, como 5400 xg durante 20 minutos (DIAO et al, 2014). Entretanto, nestas condições ocorre a precipitação do enxofre disperso junto às células, não havendo uma separação efetiva. Os experimentos realizados para verificação do crescimento celular, por determinação da absorbância a 620 nm, não foram satisfatórios sem a efetiva remoção do enxofre. Houve uma redução do valor de absorbância ao longo do tempo, indicando que o valor observado se deveu, em parte, à absorção de radiação pelas partículas de enxofre em suspensão. A Figura 30 apresenta fotografias obtidas ao microscópio óptico onde é possível observar partículas de enxofre cercadas por células de *A. thiooxidans*.

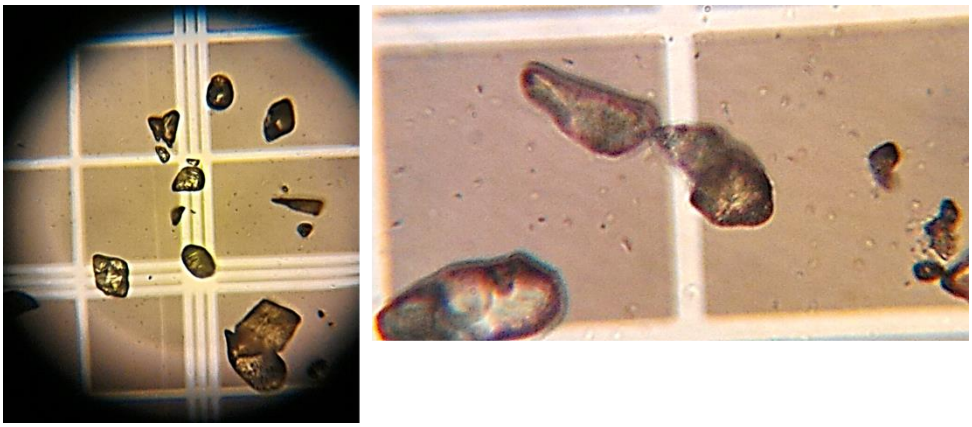


Figura 30 – Fotografia obtida em microscópio óptico de bactérias *A. thiooxidans* e partículas de enxofre em câmara de Neubauer (Aumento de 1000x). Fonte: O autor (2017).

Como alternativa foram experimentadas centrifugações dos cultivos em diversas velocidades e tempos de rotação, observando o aspecto do precipitado. A formação de precipitado escuro sobre o enxofre amarelado indica a deposição de células. Os melhores resultados foram obtidos em baixas rotações, a 25 xg e por 1,5 min, havendo deposição do enxofre sem a observação de precipitado escuro. A suspensão celular centrifugada apresentou um aspecto turvo de cor clara e estável. A observação em 620nm resultou em um valor constante de absorbância, mesmo após 10 minutos de repouso, indicando a formação de uma suspensão celular estável e sem precipitação

de enxofre. Não foram realizadas análises para determinação da presença de enxofre residual nas dispersões, mas uma subsequente centrifugação a 25 xg por 5 minutos não resultou em precipitado, sendo assim o resultado considerado satisfatório.

Konishi et al. (1995) utilizaram filtração por sucção e papel de filtro quantitativo para remoção de enxofre de cultivos de *T. thioparus* e Rohwerdert e Sand (2003) utilizaram filtração em membrana de Nylon de porosidade 2 µm para a remoção de enxofre de cultivos de bactérias oxidantes de enxofre. De forma semelhante, a filtração por sucção foi avaliada como método de remoção de enxofre utilizando papéis de filtro de 7,5 µm e 2 µm. Houve uma rápida obstrução dos poros quando realizada a filtração do cultivo através do papel de filtro de menor porosidade. Assim, as partículas maiores de enxofre foram previamente removidas por filtração em papel de filtro de porosidade 7,5 µm.

Os resultados de DO_{620} para cultivos filtrados, apresentados na Tabela 14, indicam que pouca variação na DO_{620} foi observada em dispersões que sofreram uma segunda filtração em papel de filtro de mesma porosidade. Uma redução na absorbância em 620 nm foi observada em dispersões que sofreram uma filtração subsequente em papel de filtro de porosidade 2 µm. Este resultado indica que uma remoção mais efetiva do enxofre disperso é alcançada com papel de filtro de menor porosidade.

Tabela 14 - Avaliação da filtração como método de remoção de enxofre de cultivos de *A. thiooxidans* através da absorbância em 620 nm de dispersões celulares obtidas ao final de diferentes etapas de filtração.

Filtração	Absorbância em 620 nm			
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4
1ª em papel de filtro 7,5 µm	0,643	0,715	0,741	0,589
2ª em papel de filtro 7,5 µm	0,650	0,718	0,736	0,585
Em papel de filtro 2 µm	0,603	0,701	0,706	0,550

A suspensão celular obtida após uma filtração por sucção em papel de filtro de porosidade 7,5 µm seguida de uma filtração em papel de filtro 2 µm apresentou

absorbância estável em 620 nm. Este procedimento reduziu o tempo de obtenção de dispersões celulares prontas para uso e foi adotado nos experimentos com o biossensor óptico.

5.2 Determinação do meio de cultura

Os cultivos para cada meio analisado foram realizados em duplicata e foram feitas duas medidas da absorbância em 620 nm em diferentes alíquotas dos meios de cultivo. Os resultados são apresentados na Figura 31, sendo a barra de erros representativa do desvio padrão dessas medidas.

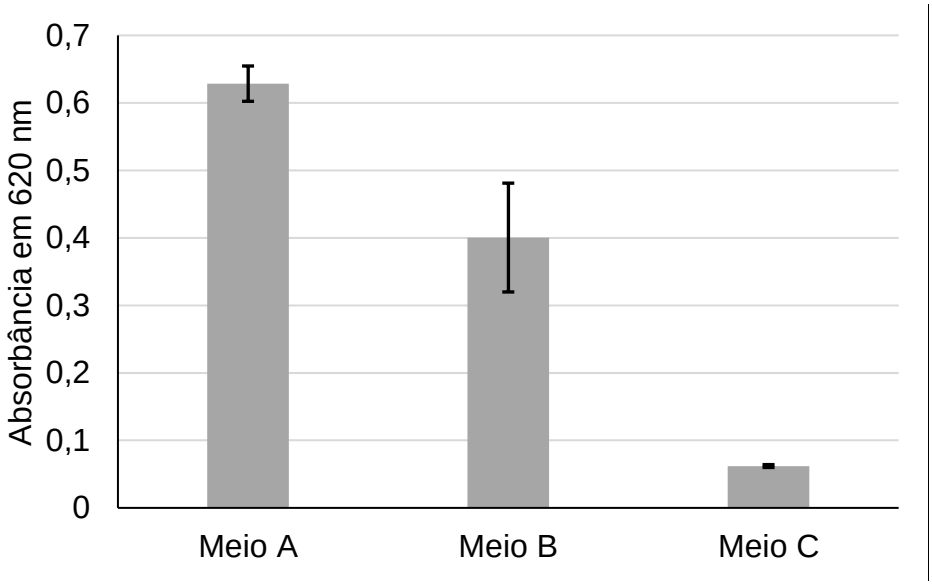


Figura 31 – Avaliação dos meios de crescimento para *A. thiooxidans*.

Os cultivos foram realizados, simultaneamente e nas mesmas condições descritas no item 4.3.1, sendo avaliada a absorbância em 620 nm ao final de 10 dias de crescimento. Entretanto, os resultados apresentados na Figura 31 indicam crescimentos bastante diferentes para os meios de cultivo analisados. Os melhores resultados foram obtidos para o “meio A”, recomendado pela ATCC® para *A. thiooxidans* 8085™. Embora este não corresponda ao micro-organismo utilizado neste trabalho, os melhores resultados podem ser explicados pela prévia adaptação da cepa

FG-01 à este meio, que vinha sendo utilizado para manutenção e renovação desta cultura. Além de apresentar os melhores resultados de crescimento, o “meio A” corresponde ao meio de cultivo de composição mais simples, e será utilizado em todos os experimentos subsequentes.

5.3 Influência da condição de agitação

O crescimento celular foi acompanhado em relação à absorbância em 620 nm ao longo do tempo para culturas de *A. thiooxidans* em meio ATCC 125 nas condições: temperatura: 30 ºC, concentração de enxofre elementar: 10 $g.L^{-1}$, concentração de inoculo: 10 % (v/v), pH inicial: 3, volume de suspensão: 100 mL.

Os cultivos foram realizados em condições semelhantes, exceto pela condição de agitação. Em um sistema empregou-se agitação a 150 rpm iniciada imediatamente após a inoculação, enquanto em outro a agitação em 150 rpm foi iniciada após 3 dias de repouso. Os resultados foram acompanhados em relação à absorbância das dispersões centrifugadas por 1,5 min a 25 xg, assim como pela variação no pH do meio de crescimento, indicadas pelos gráficos das Figuras 32 e 33.

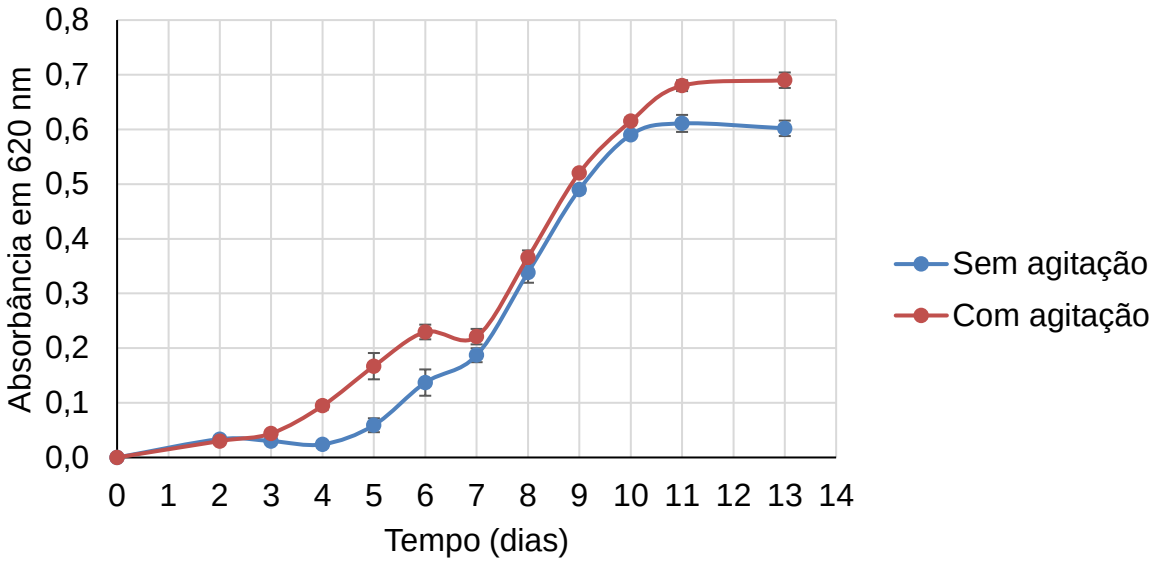


Figura 32 – Curvas de crescimento de *A. thiooxidans* FG-01 em função da agitação. Legenda: “sem agitação”, repouso por 3 dias antes da agitação; “com agitação”, agitação imediata após inoculação.

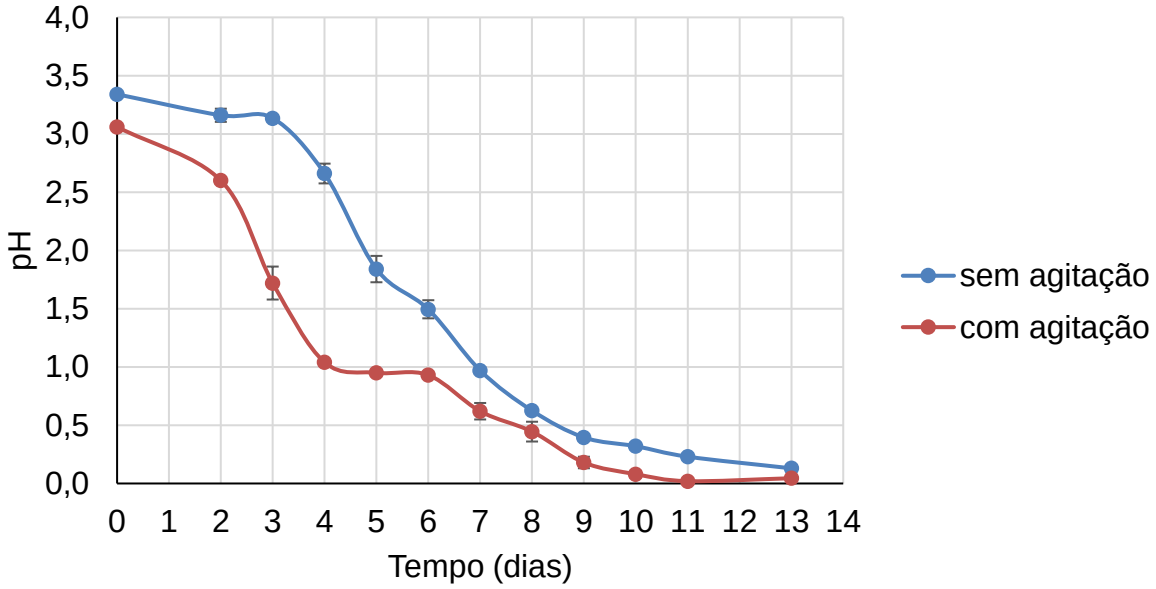


Figura 33 – Variação do pH ao longo do tempo para cultivos de *A. thiooxidans* FG-01 em função da condição de agitação. Legenda: “sem agitação”, repouso por 3 dias antes da agitação; “com agitação”, agitação imediata após inoculação.

Os cultivos foram realizados em duplicata, sendo apresentadas as médias das respostas obtidas. Os resultados apresentados nos gráficos das figuras 34 e 35

permitem inferir que para a espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* FG-01 o período de adaptação de 3 dias, anterior à agitação, não caracterizou estímulo para o crescimento celular. Houve um prolongamento da fase *lag* de crescimento e um menor número de células presentes na fase estacionária. Houve pequena redução de pH durante o período de repouso indicando baixa atividade metabólica neste período. Para o sistema com agitação imediata o pH sofreu uma importante redução nos primeiros 3 dias, indicando uma intensa atividade metabólica não relacionada ao crescimento celular, visto que os sistemas ainda se encontravam em fase de adaptação. Os sistemas com agitação iniciada imediatamente após a inoculação apresentaram um crescimento celular mais intenso e uma maior redução do pH, indicando uma alta taxa de metabolismo nestas condições. Dessa forma, as culturas subsequentes foram realizadas com agitação imediata, sem o período de repouso após inoculação.

5.4 Influência da concentração de inóculo

Grande parte dos trabalhos envolvendo o crescimento de *Acidithiobacillus thiooxidans* utilizam condições de crescimento que envolvem concentração de inoculo de 10 % (v/v). Entretanto, é esperado que uma maior quantidade de inóculo propicie um maior crescimento celular. Assim, foram comparadas condições de crescimento descritas a seguir, diferenciadas apenas pela concentração de inóculo iguais a 10 % e 20 % (v/v).

- Temperatura: 30 ºC
- Concentração de enxofre elementar: 10 $g.L^{-1}$
- Agitação orbital imediatamente após inoculação: 150 rpm
- pH inicial: 3
- Volume de suspensão: 100 mL

As Figuras 34 e 35 apresentam os gráficos em função da absorbância a 620 nm e da variação de pH ao longo do tempo.

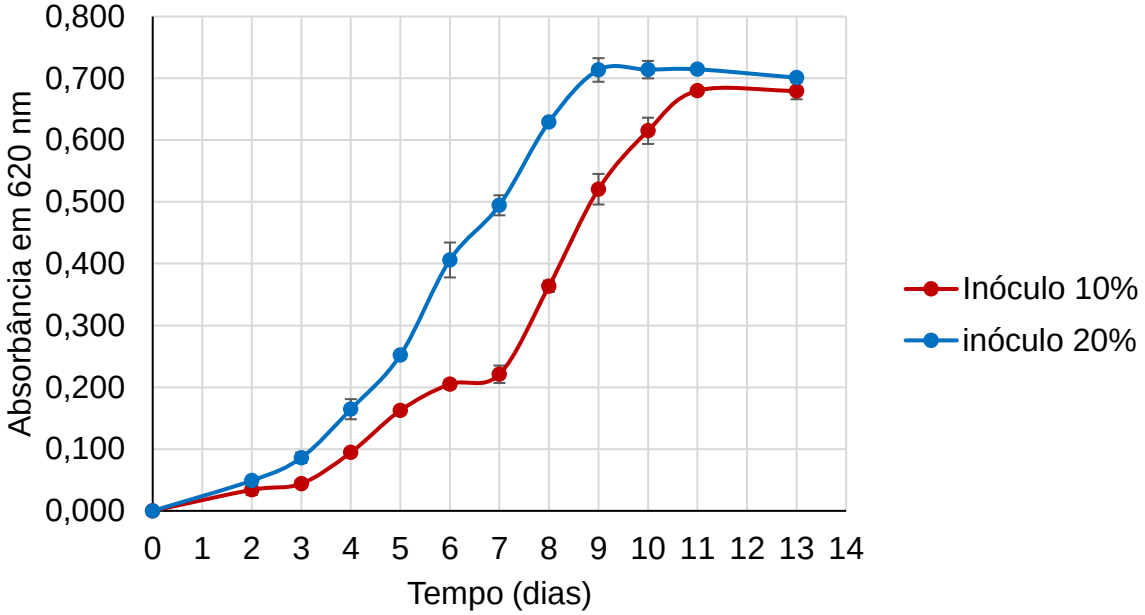


Figura 34 – Variação da absorbância em 620 nm para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração de inóculo.

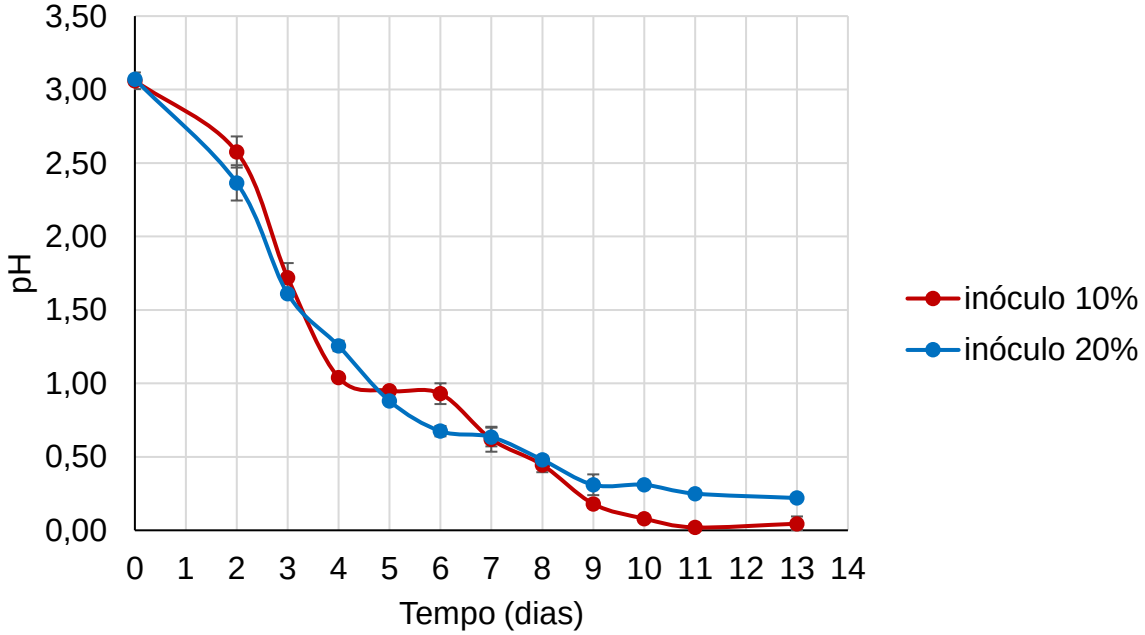


Figura 35 – Variação do pH para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração de inóculo.

Os resultados obtidos nos gráficos das Figuras 36 e 37 estão em concordância com aqueles encontrados por Konishi, Asai e Yoshida (1995). A concentração de inóculo inicial não influenciou fortemente na quantidade máxima de células produzidas, uma vez que não houve um aumento significativo na absorbância observada no estágio estacionário. Entretanto, a quantidade inicial de inóculo influenciou intensamente o crescimento nos primeiros dias de cultivo, aumentando a taxa de reprodução celular no estágio exponencial de crescimento.

Em ambas as condições foi observada uma forte redução no pH do meio de cultivo, mas não houve variações significativas na taxa de redução do pH. A taxa de produção de ácido sulfúrico e, consequentemente, de redução do pH está relacionada à capacidade de metabolização ou oxidação do enxofre, passando por uma etapa de adsorção à superfície do enxofre. Assim, a taxa de redução de pH é limitada pela área superficial de enxofre disponível para adsorção celular, dependendo mais do número de sítios não ocupados que da concentração celular. O desempenho do biossensor não foi baseado na taxa de reprodução, mas na taxa de metabolismo celular, de forma que as culturas subsequentes foram realizadas com uma concentração de inóculo inicial igual a 10 % (v/v).

5.5 Influência da concentração de enxofre no meio de crescimento

O crescimento celular foi acompanhado em relação à absorbância em 620 nm ao longo do tempo para cultivos de *A. thiooxidans* em meio ATCC 125, variando a concentração inicial de enxofre de 10 g/L para 20 g/L, e nas demais condições citadas a seguir: temperatura: 30 ºC, concentração de inoculo: 10 % (v/v), pH inicial: 3, volume de suspensão: 100 mL, agitação orbital a 150 rpm iniciada imediatamente após a inoculação.

As Figuras 36 e 37 apresentam os resultados de crescimento celular, refletida pela absorbância a 620 nm e pela redução no pH do meio de crescimento, com a variação da concentração de enxofre.

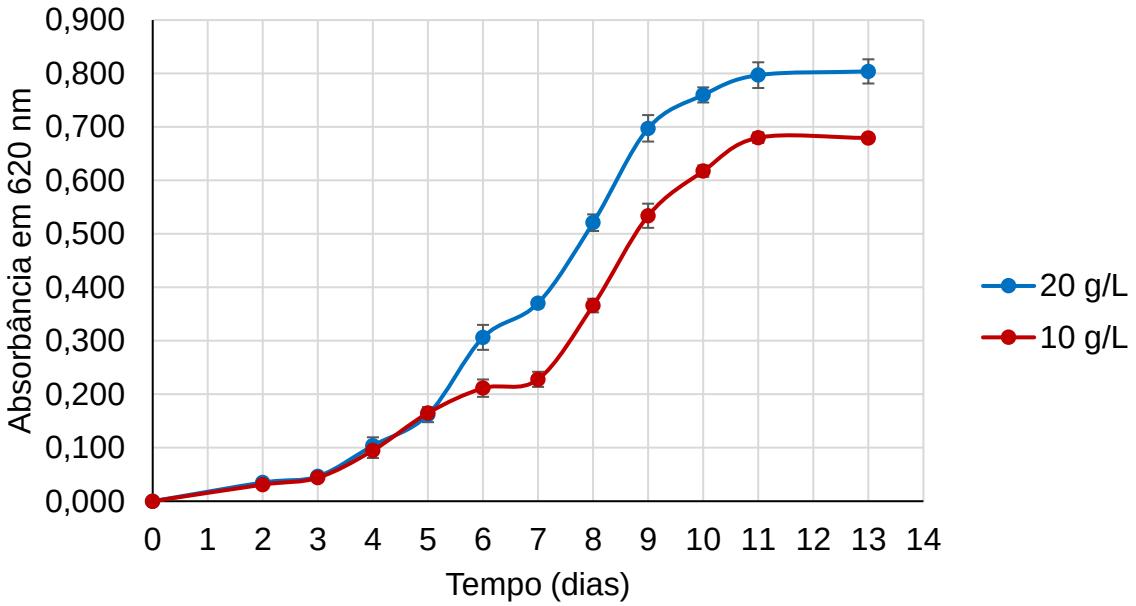


Figura 36 – Variação da absorbância em 620 nm para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração inicial de enxofre.

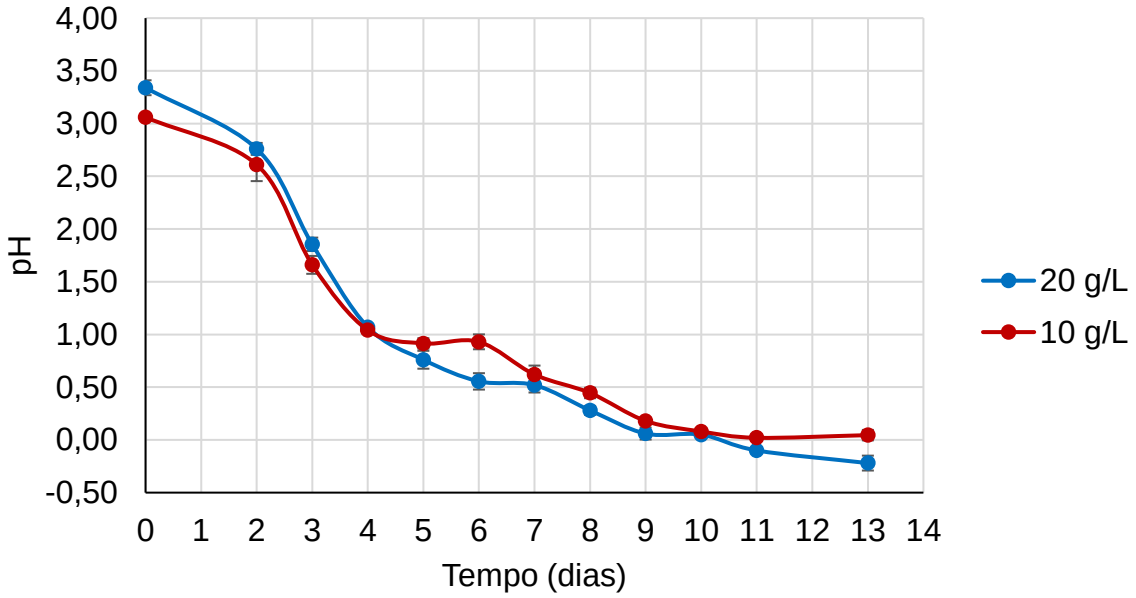


Figura 37– Variação do pH para crescimento de *A. thiooxidans* em função da concentração inicial de enxofre.

A análise dos gráficos das Figuras 38 e 39 indica que a fase de adaptação do micro-organismo ao meio de cultura não sofre influência da concentração inicial de enxofre, uma vez que em ambas as condições há uma variação semelhante na

absorbância a 620 nm e na redução do pH, indicando uma taxa metabólica semelhante. Este resultado pode ser justificado pela área superficial disponível para adesão celular ser inicialmente semelhante em ambos os casos, uma vez que sendo apolar e, portanto, insolúvel em água, o enxofre encontra-se suspenso sobre a fase aquosa. As células metabolizam apenas o enxofre disponível na região interfacial sólido-líquido, limitada pelo diâmetro interno do Erlenmeyer nesta interface.

O crescimento de *A. thiooxidans* na superfície do enxofre promove a formação de substâncias poliméricas extracelulares e fosfolipídios como fosfatidil inositol, que modificam as características superficiais do enxofre elementar e atuam como agentes surfactantes, permitindo que o enxofre disperse no meio líquido (SHIVELY; BENSON, 1967; SHARIHARI et al, 1993). A partir do 4º dia de crescimento o enxofre inicialmente insolúvel encontra-se disperso no meio de crescimento. A diferença de concentração inicial de enxofre passa então a apresentar um importante papel, não apenas pela maior quantidade de enxofre disponível para metabolização, como também pela oxidação deste a espécies parcialmente oxidadas de enxofre, que sendo solúveis também se encontram disponíveis para o metabolismo celular. Este fato é refletido no intenso aumento da taxa de crescimento celular na condição de maior concentração de enxofre, na maior absorbância alcançada na fase estacionária de crescimento e na acentuada redução do pH a valores menores que zero a partir do décimo dia de crescimento.

A concentração inicial de enxofre é uma condição de sistema importante, que influenciou na taxa de crescimento microbiano. Entretanto, a maioria dos artigos envolvendo a aplicação tecnológica de *A. thiooxidans* utilizaram concentração inicial de enxofre igual a 10 g/L. Assim, a influência deste parâmetro foi avaliada de forma mais ampla a partir de um planejamento de experimentos.

5.6 Determinação das melhores condições de cultivo

Os resultados obtidos no item 5.5 indicaram que a concentração inicial de enxofre no meio de crescimento é um parâmetro de sistema que deve ser avaliado mais profundamente. Outras condições avaliadas no planejamento de experimentos descrito no item 4.3.5 são a temperatura e o pH inicial do meio de crescimento.

Em relação à temperatura, a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* é um micro-organismo mesófilo, que atua em temperaturas entre 25 ºC e 35 ºC. Entretanto, não foram encontrados trabalhos relatando a influência da temperatura no crescimento desta bactéria em meio líquido. Este é um parâmetro potencialmente importante e cujo estudo traz informações sobre as condições de atuação do micro-organismo no sistema biossensor.

Em relação ao valor de pH, os trabalhos envolvendo aplicações tecnológicas de *A. thiooxidans* utilizaram uma ampla gama de valores iniciais de pH dos sistemas variando de 1,8 a 4,5 (COOK, 1964; PAULA; SOBRAL; OLIVEIRA, 2015). O micro-organismo *A. thiooxidans* FG-01 é acidófilo, sendo esperada uma redução da taxa de metabolismo em pH maior que 4. O biossensor será avaliado em função da produção de íons H^+, relacionada diretamente à redução do pH, que ocorre em menor intensidade em pH abaixo de 3, de forma que a faixa de pH escolhida para estudo varia de 3 a 4.

Os experimentos foram realizados em duplicata mantendo-se as outras condições de crescimento. Concentração do meio de cultivo, em $g.L^{-1}$: $(NH_4)_2SO_4$, 0,2; KH_2PO_4, 3,0; $MgSO_4.7H_2O$, 0,5; $CaCl_2$, 0,25; $FeSO_4$, 0,005; Enxofre elementar, 10. Concentração de inóculo: 10 % (v/v), volume de suspensão: 50 mL, agitação orbital a 150 rpm imediatamente após a inoculação.

Os resultados de crescimento celular foram avaliados em função da absorbância a 620 nm no décimo dia de cultivo e são relatados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados de absorbância para os experimentos do planejamento fatorial 2^3.

Experimento	pH	Enxofre ($g.L^{-1}$)	Temperatura (ºC)	Abs (620 nm)	Abs (620 nm)
1	4	20	26	0,687	0,681
2	3	20	26	0,675	0,590
3	3	20	30	0,770	0,810
4	3	10	26	0,656	0,618
5	4	10	30	0,674	0,752
6	3	10	30	0,718	0,762
7	4	10	26	0,649	0,641
8	4	20	30	0,811	0,794

Os dados de absorbância obtidos do planejamento fatorial completo 2^3 foram analisados com auxílio do programa Design-Expert® versão 10.0 quanto à análise de variância (ANOVA) dos parâmetros isolados e de suas interações. Os resultados de ANOVA são apresentados na Tabela 16, considerando todos os fatores e suas interações no modelo estatístico.

Tabela 16 – Resultado de ANOVA para o fatorial completo 2^3 considerando todos os fatores principais e suas interações.

Fonte	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Valor de F	Valor de P Prob > F	
Modelo	0,064	$9,126.10^{-3}$	7,82	0,0047	Significativo
A - pH	$5,062.10^{-4}$	$5,062.10^{-4}$	0,43	0,5287	
B - Enxofre	$7,569.10^{-3}$	$7,569.10^{-3}$	6,48	0,0344	
C - Temperatura	0,050	0,050	42,79	0,0002	
AB	$1,722.10^{-3}$	$1,722.10^{-3}$	1,48	0,2591	
AC	$1,369.10^{-3}$	$1,369.10^{-3}$	1,17	0,3104	
BC	$2,756.10^{-3}$	$2,756.10^{-3}$	2,36	0,1630	
ABC	$4,000.10^{-6}$	$4,000.10^{-6}$	0,00343	0,9548	
Erro puro	$9,339.10^{-3}$	$1,167.10^{-3}$			
Cor Total	0,073				
Coeficiente de correlação				0,8724	
Coeficiente de correlação ajustado				0,7608	

Em ANOVA o valor de F é calculado pela razão entre o quadrado médio do modelo e o quadrado médio dos resíduos. Quanto maior esta razão, maior é a significância das variâncias sistemáticas dos dados em relação às variâncias não sistemáticas, ligadas ao erro. Assim, quanto maior o valor de F, maior a significância da variável no modelo matemático. De outra forma, o valor de p representa a probabilidade de se rejeitar a hipótese nula quando ela for verdadeira, ou seja, identifica a chance de que alguma diferença observada se deveu ao acaso. Assim, quanto menor o valor de p, mais significativo é o resultado para o tratamento analisado ou o modelo.

O modelo adquirido em ANOVA apresenta um valor de F igual a 7,82 e um valor de p igual a 0,0047, indicando que há menos de 0,47 % de chance de que as diferenças observadas sejam ao acaso, indicando que o modelo é significativo. Corroborando esta análise foi obtido um alto valor de coeficiente de correlação, e próximo ao coeficiente de correlação ajustado, indicando que as variáveis independentes do modelo explicam cerca de 87 % das respostas obtidas.

O baixo valor de p obtido para o parâmetro temperatura e o alto valor de p determinado para o parâmetro pH, bem superior a 0,05, indicam que a temperatura apresenta uma grande influência no crescimento das culturas de *A. thiooxidans*, enquanto a variação de pH não exerceu influência no crescimento. Este resultado está em consonância com os obtidos por Lors, Chehade e Damidot (2009). Cultivos de *A. thiooxidans* inicialmente em pH entre 5,5 e 3,5 alcançaram um pH próximo em apenas dois dias, ainda antes de iniciar a fase exponencial de crescimento, não sendo esperada uma grande influência ao final de 10 dias de crescimento.

A concentração de enxofre exerceu influência na absorbância em 620 nm, com uma variação de cerca de 0,1, concordando com o resultado obtido no item 5.5. Entretanto, a influência da variação de temperatura é relevante em função do valor de F notavelmente alto.

A influência das interações entre quaisquer tratamentos é negligenciável, podendo ser retirados do modelo matemático obtido, assim como o parâmetro pH. Um modelo considerando apenas os parâmetros principais temperatura e concentração de enxofre apresentou um valor de p igual a 0,0001 para o modelo e 0,0264 e 0,0001 para os parâmetros concentração de enxofre e temperatura, respectivamente, indicando que estes são fortemente significativos. Entretanto, não há interação entre estes parâmetros, conforme indicado pelas retas paralelas observadas na Figura 38, representando a interação entre estes.

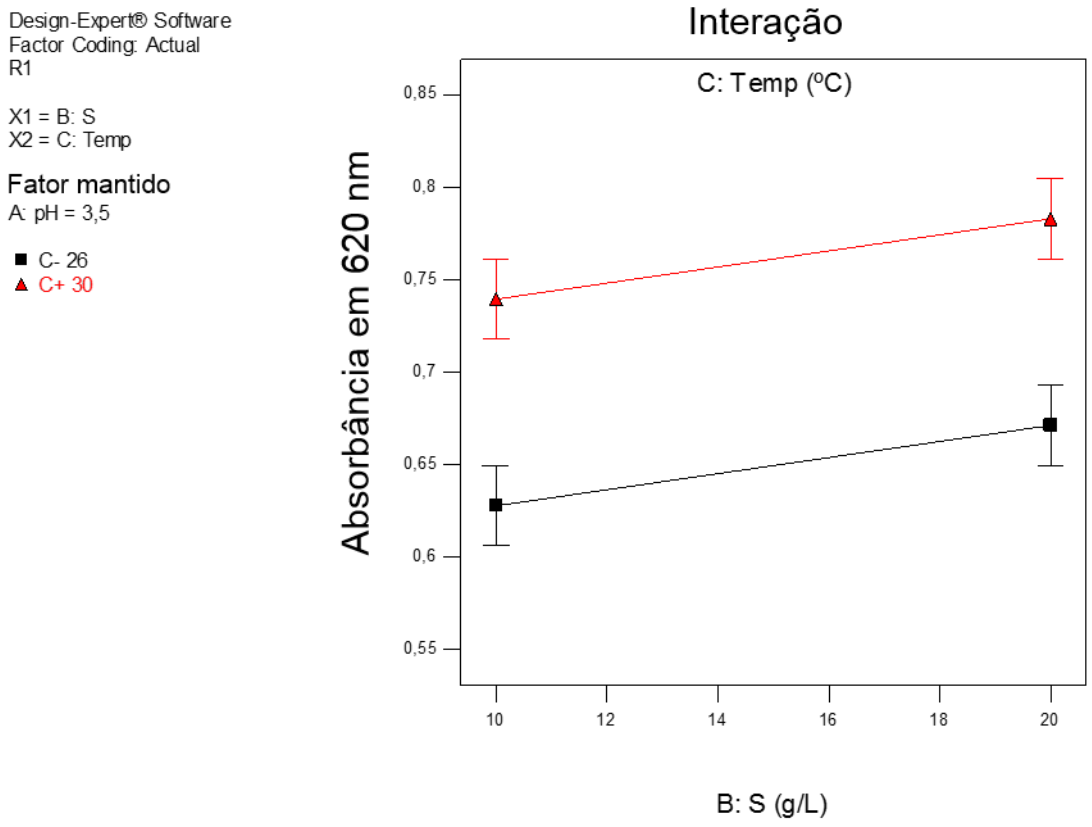


Figura 38 – Gráfico de interação entre os parâmetros Temperatura e concentração de enxofre.

Embora não exista interação entre os parâmetros, a influência de cada parâmetro na variável dependente pode ser avaliada observando o gráfico de contorno da Figura 39.

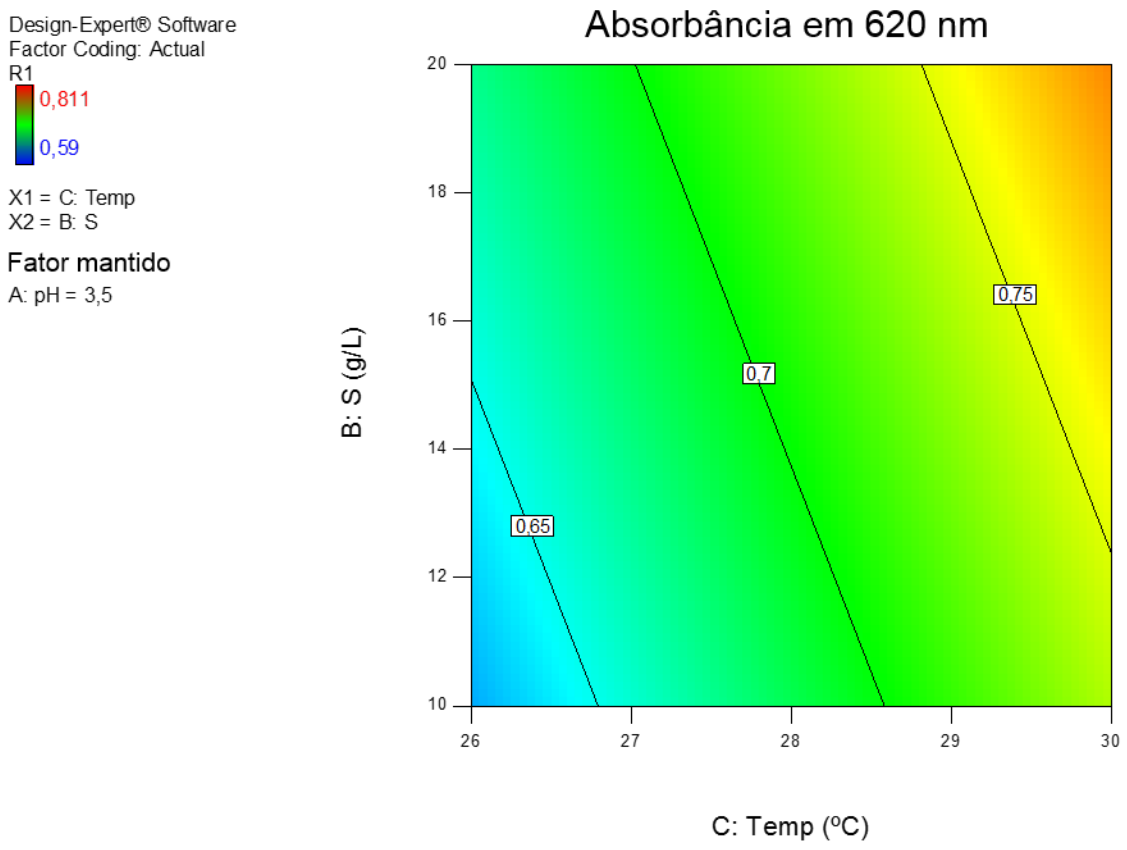


Figura 39 – Influência dos parâmetros temperatura e concentração de enxofre no crescimento de *Acidithiobacillus thiooxidans* FG-01.

Os resultados indicam que o maior resultado de crescimento dos cultivos analisados ao final de 10 dias ocorre em concentração de enxofre igual a 20 $g.L^{-1}$ e temperatura de 30 ºC, independendo do pH inicial na faixa entre 3 e 4. Entretanto, sendo micro-organismos acidófilos será utilizada a condição de pH 3 para as culturas subsequentes, nas maiores condições de temperatura e concentração de enxofre estudadas neste planejamento fatorial.

5.7 Curva de peso seco celular

A determinação da concentração celular foi realizada conforme descrito no item 4.4.1, sendo obtida uma massa celular de 0,005 g em um volume de 9 mL filtrados, correspondendo a uma concentração celular de 0,56 $g.L^{-1}$.

Foi medida a absorbância em 620 nm para sete diluições da suspensão original, descritas na Tabela 17, sendo correlacionadas às respectivas concentrações para construção do gráfico apresentado na Figura 40.

Tabela 17 – Absorbância das dispersões utilizadas para determinação da curva de peso seco celular.

Volume de suspensão (mL)	Volume de água (mL)	Concentração relativa	Concentração ($g.L^{-1}$)	Absorbância (620 nm)
5	0	1	0,5600	0,620
4	1	0,8	0,4480	0,513
2,5	2,5	0,5	0,2800	0,308
1,5	3,5	0,3	0,1680	0,176
0,5	4,5	0,1	0,0560	0,079
0,25	4,75	0,05	0,0280	0,044
0,1	4,9	0,02	0,0112	0,026
0,05	4,95	0,01	0,0056	0,002

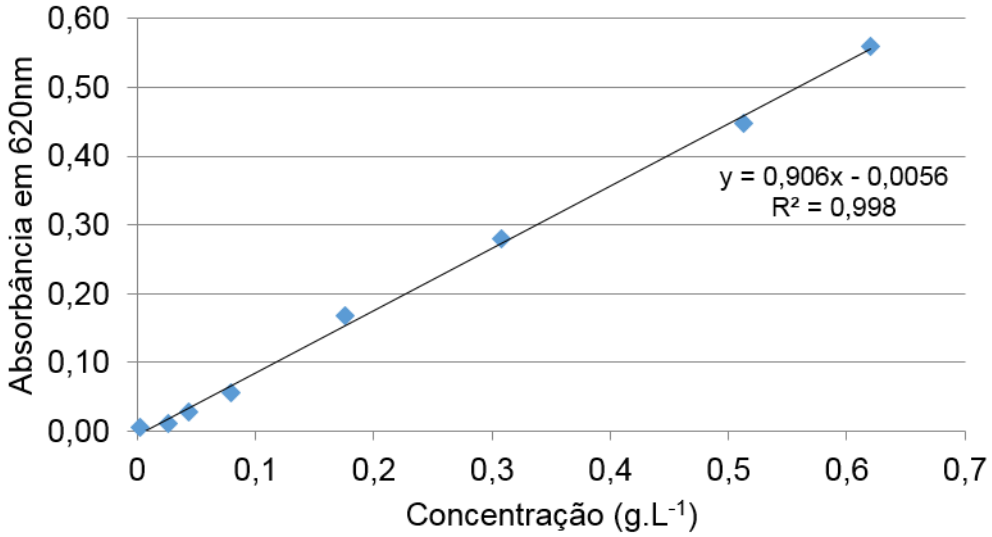


Figura 40 – Correlação entre absorbância e peso seco para *A. thiooxidans* FG-01.

Para que os resultados de análise do biossensor sejam coerentes e válidos é importante que a concentração celular seja conhecida e reprodutível. Assim, os ajustes de concentração celular foram realizados através da equação da reta obtida para a curva de peso seco observada na Figura 42, através da relação descrita a seguir.

$$\text{Concentração celular (g/L)} = \frac{\text{Absorbância (620 nm)} + 0{,}0056}{0{,}906}$$

A aplicação da equação acima define que uma densidade óptica igual a 1 corresponde a uma concentração celular de 1,11 g/L. Utilizando meio de cultura semelhante e enxofre elementar como fonte de energia Lee et al. (2006) encontraram para *A. thiooxidans* valor próximo de concentração celular para densidade óptica igual a 1, igual a 0,98 g/L, indicando que o resultado de concentração apresentado neste estudo é coerente.

5.8 Desenvolvimento do biossensor potenciométrico

Os biossensores potenciométricos permitem o monitoramento não invasivo e em tempo real das mudanças no ambiente extracelular a partir de medidas de potencial de eletrodo na ausência de corrente apreciável (WANGA et al, 2010).

O cerne do estudo realizado para o desenvolvimento do biossensor potenciométrico foi a identificação de condições de sistema que favorecessem a oxidação completa de H_2S, com formação de ácido sulfúrico como principal produto metabólico. O consequente aumento da concentração de íons H_3O^+ em solução promove uma redução de pH e um aumento do potencial de eletrodo que pôde ser medido através de um potenciômetro com eletrodo sensível a íons hidrogênio.

O pH e o potencial de eletrodo são inversamente proporcionais e relacionados através da Equação de Nernst. O coeficiente angular dessa equação determina, para um eletrodo ideal, que a redução de uma unidade de pH acarreta um aumento de potencial de 59,16 mV. A quantidade de íons H_3O^+ gerado nos experimentos envolveu uma pequena variação de pH, especialmente por serem realizados na faixa de pH ótimo para *A. thiooxidans*. Assim, a variação de potencial de eletrodo em relação a um estado inicial de acidez é mais apropriada como resposta do biossensor e foi utilizado ao longo do trabalho.

A condição metabólica e consequentemente a resposta potenciométrica podem ser influenciados por condições de sistema como o pH no início da análise, a concentração celular, o tempo de cultivo das células aplicadas, o meio de análise (meio de cultivo, água destilada, solução salina), a concentração de oxigênio disponível e a proporção entre a quantidade de células e H_2S. Para avaliar estes fatores foram utilizadas três configurações principais de reator: Erlenmeyer fechado com tampa de borracha, Erlenmeyer fechado com tampa porosa e aplicando o reator de vidro desenvolvido especialmente para este método de transdução.

5.8.1 Experimentos em sistema fechado com tampa de borracha

A espécie *A. thiooxidans* é um micro-organismo aeróbio. Deve haver uma quantidade de oxigênio no sistema suficiente para permitir a oxidação completa do sulfeto de hidrogênio a ácido sulfúrico. Quanto maior o volume de *headspace*, maior a quantidade de oxigênio disponível para a biorreação. Entretanto, em meio ácido o H_2S encontra-se em sua forma não-ionizada, tendendo a escapar da solução para a fase gasosa. Quanto maior o volume de *headspace*, menor a quantidade de H_2S que permanece em solução. Nesta primeira configuração de reator optou-se por minimizar o volume de *headspace* no sistema. O Erlenmeyer foi preenchido completamente e fechado com tampa de borracha buscando evitar o escape de H_2S. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Condições experimentais aplicadas aos reatores em sistema fechado com tampa de borracha para consumo de H_2S por *A. thiooxidans*.

Condições de sistema	1	2	3	4	5
Concentração de H_2S ($mg.L^{-1}$)	30	30	30	30	30
Volume de H_2S (mL)	40	40	40	40	40
Volume de meio ATCC 125 (mL)	0	0	80	80	50
Volume de H_2O (mL)	80	80	0	0	0
Densidade óptica da suspensão em 620 nm	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Volume de suspensão (mL)	10	10	10	10	40
pH	3	3	3	3	3
Aeração	N	S	N	S	S
Resposta potenciométrica (mV)	-0,3	2,1	2,2	4,4	6,2
	+1,3	3,7	2,8	3,4	4,9

Os resultados obtidos para a condição de sistema 1 foi notoriamente desfavorável ao metabolismo de *A. thiooxidans*. A oxidação de H_2S foi comprometida possivelmente pela carência de oxigênio, uma molécula apolar e pouco solúvel em água. Buscando vencer esta limitação o sistema contendo 10 mL de suspensão celular em pH 3,0 e 80 mL de água foi aerado em uma proveta de 100 mL por 10 min com o auxílio de uma bomba de ar. A concentração de oxigênio, medida com o auxílio de um eletrodo do tipo Clark, aumentou de 6,8 $mg.L^{-1}$ para 12,5 $mg.L^{-1}$ durante a aeração, mas foi reduzida a aproximadamente 10 $mg.L^{-1}$ em cerca de 2 min após o fim da aeração, de forma que o sistema de consumo de H_2S foi iniciado imediatamente após o término da aeração. Os resultados para o experimento na condição de sistema 2 indicaram um pequeno aumento no consumo de H_2S. Entretanto, ainda foi percebido forte odor de H_2S ao final de 3 h de reação.

Na condição do sistema 3 a água destilada adicionada ao sistema foi substituída por meio de cultivo ATCC 125, considerando que a condição metabólica de *A. thiooxidans* seria favorecida pela presença de micronutrientes e de um meio com maior força iônica e pressão osmótica que a água destilada. Houve um pequeno aumento na variação de potencial em relação à condição de sistema 1. Considerando que a presença de micronutrientes beneficiou o consumo de H_2S foi realizado novo experimento na condição do sistema 4, realizando a aeração da mistura contendo 10mL de suspensão celular e 80 mL de meio ATCC 125. Não houve um aumento expressivo no potencial medido após 3h de reação embora tenham sido encontrados melhores resultados de variação de potencial. O resultado indica que a redução na solubilidade do oxigênio provocada pelo aumento da concentração salina (GENG; DUAN, 2010) foi compensada pela presença de nutrientes.

Os melhores resultados nesta configuração de reator foram obtidos na condição do sistema 5. Nas condições dos sistemas anteriores houve, após a mistura reacional, uma redução de 13 vezes na concentração celular original. Uma maior concentração celular propiciou um aumento no consumo de H_2S e uma maior quantidade de íons H_3O^+ gerados. Entretanto, a variação de potencial obtida foi pequena considerando a concentração relativamente alta de sulfeto de hidrogênio.

5.8.2 Experimentos com o reator na configuração 1

Os experimentos realizados em sistema fechado com tampa de borracha evidenciaram problemas de reprodutibilidade e uma limitação na variação de potencial obtida em cerca de 6 mV, possivelmente relacionada à carência de oxigênio disponível para a biorreação. Estes também indicaram que a atividade de *A. thiooxidans* foi favorecida pela presença de micronutrientes. Assim, os experimentos com o reator foram realizados nas seguintes condições:

- Meio ATCC 125 aerado por 15 min antes da produção de H_2S, buscando uma maior quantidade de oxigênio disponível para a biorreação.
- Sulfeto de sódio dissolvido diretamente em meio ATCC 125 evitando a diluição decorrente da mistura de meio de cultivo e solução de H_2S.
- Volume de fase líquida igual a 175 mL permitindo que cerca de 1/3 do volume do reator fosse constituído por fase gasosa. O *Headspace* conteria a reserva de oxigênio utilizada a medida que o oxigênio dissolvido fosse consumido.
- Suspensão celular adicionada através do funil de adição evitando a abertura do sistema e a consequente perda de H_2S por volatilização em decorrência da redução de pH.
- Experimento realizado em pH 3 considerando a faixa ótima para crescimento de *A. thiooxidans*.

O experimento foi realizado em triplicata sendo obtidos aumentos de potencial iguais a 2,0 mV, 0,3 mV e 1,5 mV ao final de uma hora de reação. O aumento de potencial do último sistema foi acompanhado por um tempo maior. Houve um aumento aproximadamente linear, alcançando 4,5 mV ao final de 3 h de reação sem a observação de um estado estacionário na variação de potencial (Figura 41).

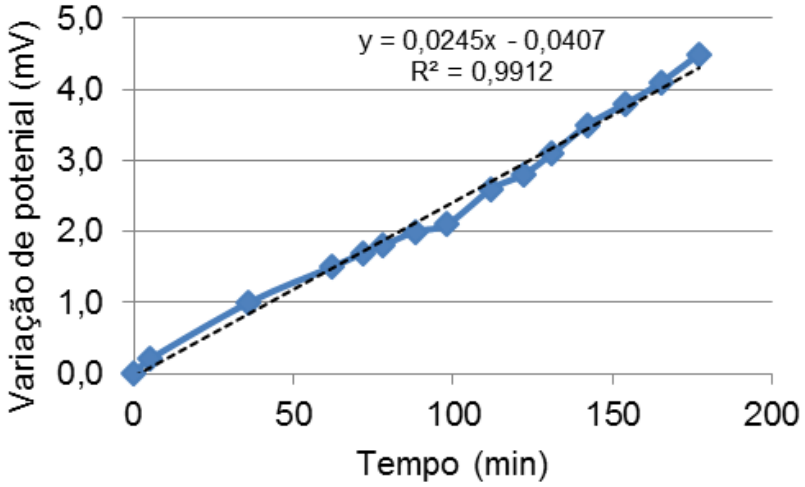


Figura 41 – Resposta potenciométrica do sistema de determinação de H_2S na configuração 1. A linha pontilhada representa a linha de tendência linear.

A variação de potencial observada neste experimento foi pequena mesmo considerando 3 h de reação. Possíveis justificativas são a baixa concentração celular, o escape de H_2S para a fase gasosa, limitando sua disponibilidade para consumo e a quantidade de oxigênio ainda insuficiente para uma extensão apreciável da reação.

A suspensão celular sofre diluição ao ser adicionada ao sistema, havendo uma redução de 7 vezes em sua concentração original. Somado a este fato, um aumento do volume de sistema, comparado ao sistema fechado com tampa de borracha, acarreta a necessidade de uma maior quantidade de íons H_3O^+ gerados na biorreação para a mesma variação de potencial, uma vez que esta variação é função da concentração em quantidade de matéria de íons H_3O^+.

A solução de meio de cultivo ATCC 125 inicialmente em pH 4,5 teve seu pH aumentado para aproximadamente 11 após a dissolução do sulfeto de sódio, uma vez que este sofre hidrólise gerando íons OH^-. Neste pH o íon bissulfeto (HS^-) é a principal espécie em equilíbrio, havendo num pequeno espaço de tempo pouca perda de H_2S por volatilização. Quando o pH do sistema é ajustado a 3,0 o equilíbrio químico é deslocado e o H_2S prevalece como espécie preponderante, volatilizando e alcançando um novo estado de equilíbrio entre $H_2S(aq)$ e $H_2S(g)$. O sulfeto de hidrogênio na fase gasosa não está disponível para consumo por *A. thiooxidans*. Entretanto, o consumo de H_2S na fase líquida cria um gradiente de potencial químico que desloca o equilíbrio

de solubilização aumentando sua concentração na fase líquida. Neste processo é esperada uma taxa de reação baixa, mas não uma limitação pela quantidade de H_2S volatilizada, contribuindo para ausência de um patamar mesmo após 3 h de reação.

A redução de pH também provoca uma redução na solubilidade do oxigênio, sendo a quantidade de oxigênio dissolvido e disponível para consumo bacteriano inversamente proporcional ao volume de *Headspace* e à força iônica do meio, considerando temperatura e pressão constantes. Buscando minimizar a limitação pela disponibilidade de oxigênio o sistema foi modificado para aeração durante a reação.

5.8.3 Experimentos com o reator na configuração 2

As condições de sistema foram semelhantes às aplicadas para o reator em configuração 1. Além do *headspace* e da aeração prévia do meio ATCC 125 houve um fluxo contínuo de ar em vazão controlada conforme representado na Figura 42.

Figura 42 – Reator para determinação de H_2S com sistema de aeração com vazão controlada. Fonte: O autor (2017).

A entrada de ar para o sistema, borbulhado próximo ao fundo do reator, acarretou a saída de gases do reator, inevitavelmente contendo sulfeto de hidrogênio. Os gases que saíram do reator foram borbulhados em solução de acetato de zinco 1 mol.L^{-1} de forma a evitar a liberação de H_2S para o ambiente e como medida qualitativa da perda de H_2S do sistema. Para minimizar a perda de H_2S foi aplicada uma baixa vazão de ar para o sistema, de aproximadamente 15 mL/min.

A expectativa desta modificação no reator foi que a entrada de ar no sistema aumentasse a disponibilidade de oxigênio para o consumo metabólico de H_2S por *A. thiooxidans* aumentando a taxa de reação e a variação de potencial observada, compensando a perda de H_2S que foi minimizada pela baixa vazão de ar. Entretanto, foram obtidos pequenos aumentos de potencial, de 1,4 mV e 2,0 mV, após 1,5 h de reação. Em um terceiro experimento, um aumento na vazão de ar provocou uma redução de 1,3 mV na resposta do sensor. Mesmo em uma baixa vazão de ar foi notória a perda de H_2S do sistema, havendo rápida formação de precipitado no béquer contendo acetato de zinco. Os resultados indicaram que a formação de ácido sulfúrico e o consequente aumento de potencial foram limitados. Possíveis motivos para esta limitação são a perda de H_2S do sistema e a baixa concentração celular discutida no item 5.9.1.

5.8.4 Experimentos em sistema fechado com tampa porosa

Os experimentos em sistema fechado com tampa de borracha evidenciaram uma limitação da resposta do biossensor pela quantidade de oxigênio presente no sistema e os realizados com o reator fechado com tampa de teflon foram limitados possivelmente pela baixa concentração celular no sistema. A fim de minimizar estas limitações foram realizados experimentos de consumo de H_2S em frascos Erlenmeyer de 50 mL, fechados com tampa de algodão para permitir a entrada de oxigênio. O sistema foi operado na ausência de *headspace* e com igual volume de solução de H_2S e suspensão celular, eliminando a diluição pelo meio de cultivo e aumentando a relação entre a quantidade de células e H_2S.

O frasco reator foi fechado com o eletrodo de hidrogênio firmemente envolvido com gaze de algodão. Os poros formados permitiram a entrada de oxigênio para o sistema, como também a saída de H_2S do sistema. A perda de H_2S foi confirmada pelo escurecimento de um papel de filtro embebido em solução de acetato de chumbo, posicionado sobre a tampa de algodão. Entretanto, esta configuração de sistema foi desenvolvida apenas para avaliação das condições de sistema que maximizem a resposta do sensor, considerando que a perda de H_2S por volatilização é lenta o suficiente para permitir esta avaliação.

Os resultados apresentados na Figura 43 correspondem à resposta do sistema ao consumo de H_2S em concentração 50 $mg.L^{-1}$, realizado em triplicata, utilizando 25 mL de dispersões celulares de concentração 2,2 $g.L^{-1}$ e pH final da mistura reacional ajustado para 2,5.

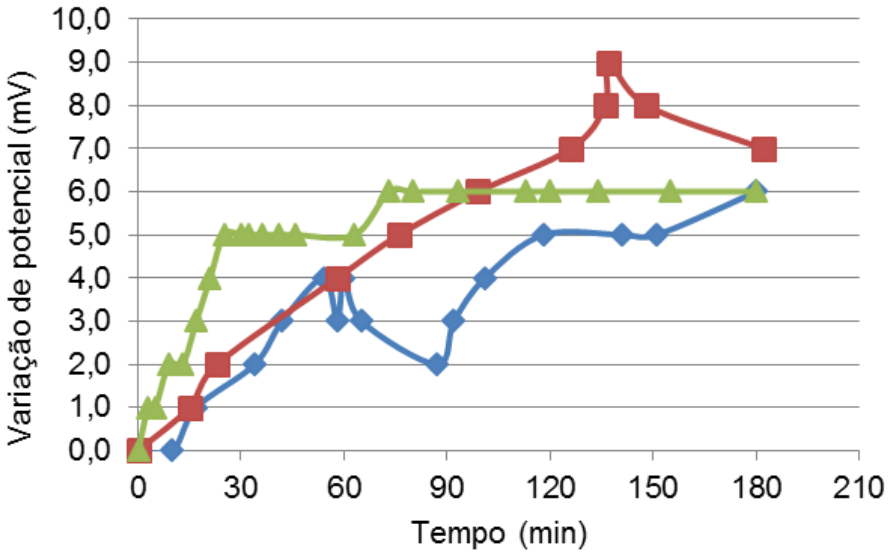


Figura 43 – Variação de potencial de eletrodo em função do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* utilizando frasco reator fechado com tampa porosa.

As respostas potenciométricas foram maiores que as obtidas com o reator fechado com tampa de teflon, mas são baixas considerando a alta concentração de sulfeto de hidrogênio empregada. Os valores ao final de 3 h de reação foram próximos, mas não foi observado um comportamento linear. As taxas de aumento de potencial

foram notoriamente diferentes entre as réplicas. O aumento da relação entre a concentração celular e a de H_2S favoreceu o aumento de potencial, entretanto, este foi limitado a aproximadamente 7 mV.

5.8.4.1 Influência da estarvação celular na resposta potenciométrica

Os experimentos anteriores foram realizados com cultivos crescidos por 6 dias e aplicados imediatamente após remoção das células por centrifugação e ressuspensão em solução salina normal. As células nestas condições estavam adaptadas a um ambiente com excesso de enxofre. Para avaliar o efeito da carência energética sobre o metabolismo as células recém centrifugadas foram mantidas em tubo falcon fechado com tampa por 24 h e 48 h. Após este período estas foram ressuspensas em solução salina normal e aplicadas no sistema de consumo de sulfeto de hidrogênio.

Os sistemas empregaram soluções de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ e dispersões celulares de concentração 2,2 $g.L^{-1}$. O pH foi ajustado em 2,5 para comparação com o comportamento da resposta sem o período de estarvação. Os resultados após 3 h de reação são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Variação de potencial para sistema fechado com tampa porosa em função do tempo de estarvação celular para solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ e suspensão celular 2,2 $g.L^{-1}$ em pH 2,5.

Tempo de estarvação (h)	Variação de potencial (mV)		Média (mV)	Desvio padrão (mV)
0	6	7	6,5	0,71
24	11,6	11,2	11,4	0,28
48	0,7	0,5	0,6	0,14

Houve um aumento na variação de potencial após 24 h de estarvação quando comparado aos resultados obtidos com células aplicadas imediatamente após remoção do meio de cultivo. Segundo Knaysi (1983) as células jovens de *A. thiooxidans* crescidas com enxofre como fonte de energia possuem em seu protoplasma grandes vacúolos contendo uma mistura de volutina e enxofre como reserva energética para sobreviver na ausência de espécies oxidáveis de enxofre. O material presente nestes vacúolos é corado com solução de lugol (I_2-KI) indicando que parte deste material apresenta natureza lipídica. Após 16 a 24 horas de estarvação a cor marrom escura característica da reação com iodo normalmente não é mais observada, indicando que este material foi consumido durante o período de estarvação. Os resultados indicam que a condição de carência energética alcançada após 24 h de estarvação favorece o consumo de H_2S e sua oxidação a ácido sulfúrico, melhorando a performance do sensor.

Os sistemas com células submetidas a 48 h de estarvação apresentaram um aumento de potencial desprezível considerando a alta concentração de H_2S, indicando que este período foi deletério ao metabolismo celular nas condições empregadas. Estudos sobre o efeito da estarvação em *Thiobacillus acidophilus* mostraram que após cerca de 50 horas de estarvação os níveis de ATP foram reduzidos a 1/3 do valor original e após cerca de 60 h a viabilidade celular foi reduzida à metade (ZYCHLINSKY; MATIN, 1983).

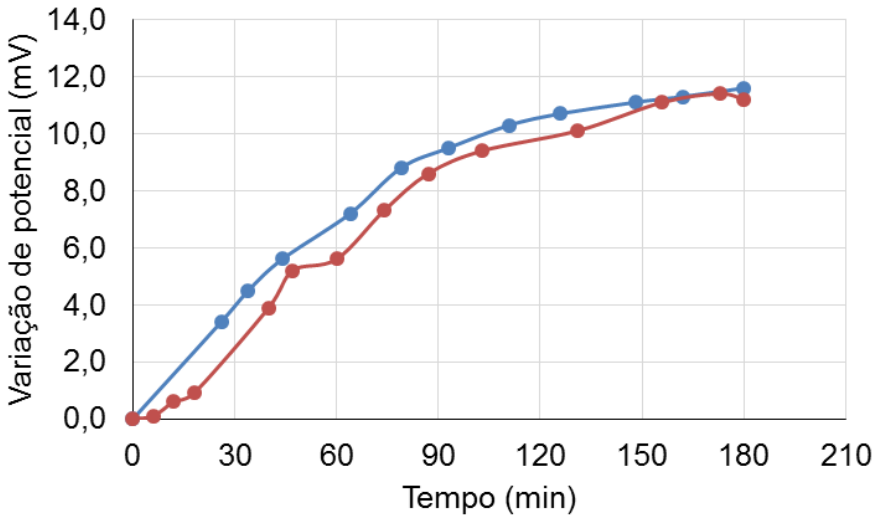


Figura 44 – Resposta potenciométrica utilizando reator fechado com tampa porosa para análise de solução de H_2S 50 mg.L^{-1} utilizando células de *A. thiooxidans* submetidas a estarvação de 24 h.

Os resultados obtidos com 24 h de estarvação, graficamente representados na Figura 48, evidenciaram um comportamento próximo à linearidade durante a primeira 1,5 h de reação (R^2 = 0,98) seguida de uma gradativa redução da variação de potencial, aproximando-se de um estado estacionário após 2 h de reação. Uma vez que foram alcançados melhores resultados nesta condição os experimentos subsequentes foram realizados empregando células submetidas à estarvação de 24 h.

5.8.4.2 Influência do pH na resposta potenciométrica

O sistema de consumo de H_2S empregando células submetidas a estarvação por 24 h foi utilizado em pH 2,0 para avaliar a resposta potenciométrica a diferentes concentrações de H_2S, verificando a sensibilidade nestas condições para soluções em concentração na faixa de 30 a 50 $mg.L^{-1}$. Os resultados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resposta potenciométrica após 3 h de reação para concentrações de H_2S entre 30 e 50 $mg.L^{-1}$ empregando o reator fechado com tampa porosa em pH 2.

Concentração de H_2S ($mg.L^{-1}$)	**Variação de potencial (mV)**	
30	5	6
40	6	
50	7	7

Os potenciais alcançados para soluções de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ foram bastante próximos daqueles obtidos para 30 $mg.L^{-1}$. Não houve sensibilidade para esta faixa de concentração mesmo empregando células submetidas a estarvação. Estes resultados evidenciam a importância da escolha do pH de análise. Os experimentos foram realizados em pH 2,0, considerado ótimo para a atividade metabólica de *A.*

thiooxidans. Entretanto, quanto menor o pH maior a quantidade de íons H_3O^+ que devem ser gerados para obter a mesma variação de pH. Para efeito de comparação, a quantidade de íons H_3O^+ necessária para redução de pH de 2,0 para 1,5 é cerca de 30 vezes maior que a quantidade de íons H_3O^+ necessária para uma redução de pH de 3,5 para 3,0. Assim, uma variação entre a concentração máxima e mínima estudada, de 20 $mg.L^{-1}$, considerando a total conversão do H_2S presente no sistema em H_2SO_4, corresponde a uma variação de pH de aproximadamente 0,02 unidades ou uma diferença entre os potenciais de 1 a 2 mV.

A reposta potenciométrica para o sistema de consumo de H_2S em reator fechado com tampa porosa foi obtida em pH variando entre 2,0 e 3,5, o limite máximo da faixa de pH ótimo para *A. thiooxidans* (SYED et al, 2006). Os experimentos foram realizados empregando 25 mL de solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ e 25 mL de suspensão celular mantida em estarvação por 24 h. Os valores de potencial alcançados após 3 h de reação são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Resposta potenciométrica em função da variação de pH para análise de soluções de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ em sistema fechado com tampa porosa.

pH	**Variação de potencial (mV)**	
2,0	7	7
2,5	11,6	11,2
3,0	14,3	8
3,5	19	31

A maior eficiência de biofiltros empregando células de *A. thiooxidans* para remoção de H_2S é alcançada em pH 2,0 (AITA et al, 2016). Entretanto, o aumento do pH teve um efeito positivo sobre a resposta potenciométrica. Não é possível afirmar com este experimento se o aumento de pH favoreceu a oxidação completa de H_2S a H_2SO_4 nas condições empregadas, ou se o aumento de pH tornou o sistema mais sensível a variações de acidez decorrentes da reação. O aumento de pH foi realizado

dentro da faixa ótima de pH para *A. thiooxidans*, de forma que o melhor desempenho é possivelmente decorrente de ambos os fatores.

É interessante observar que a réplica realizada em pH 3,0 apresentou um aumento de 8 mV, cerca de 56 % do aumento obtido para o primeiro experimento. Durante o ajuste de acidez, após a mistura reacional, o sistema alcançou momentaneamente pH 10, sendo reajustado a 3,0 com solução de HCl diluído. Experimentos em que o pH do sistema alcançou valores acima de 8 durante o ajuste de acidez frequentemente não apresentaram aumento na resposta potenciométrica ou apresentaram valores abaixo dos comumente obtidos. Este comportamento indica que o choque de pH para valores acima de 8, mesmo por curto espaço de tempo é deletério ao metabolismo celular. Em bactérias acidófilas como *A. thiooxidans* a homeostase do pH intracelular, próximo da neutralidade, é mantida a partir de um complexo equilíbrio envolvendo a síntese de proteínas e lipídeos que modificam a permeabilidade da membrana celular e a produção de citocromo oxidase, NAD^+ e ATP para controlar o consumo de H^+ e o transporte através da membrana (GHOSH; DAM, 2009; FENG et al, 2015). Li et al. (2011) relataram que cultivos de *A. ferrooxidans* submetidos a estresse alcalino pela adição de KOH ao meio de cultivo cessaram o crescimento imediatamente, o retomando após um período de adaptação. O aumento de pH ativou um mecanismo de auto-proteção com o aumento na expressão de genes envolvidos na captura de prótons, metabolismo de fosfato e fixação de CO_2.

A modificação no pH da mistura reacional de 2,0 para 3,5 provocou um aumento expressivo na resposta potenciométrica. Entretanto, como pode ser observado na Figura 45, acompanhando a maior sensibilidade a variações de pH foi observada maior variabilidade das respostas e um maior tempo de reação necessário para estabilização do sinal.

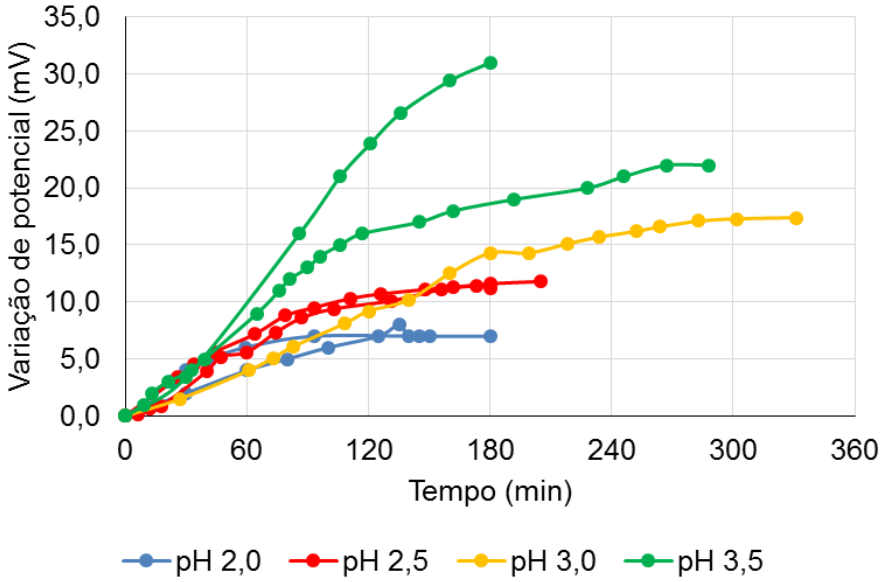


Figura 45 - Resposta potenciométrica em função da variação de pH para análise de soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} em sistema fechado com tampa porosa.

A maior variabilidade de resposta observada em pH 3,5 pode ser justificada também pela maior sensibilidade da resposta à perda de H_2S através da tampa porosa. A perda de H_2S não pode ser padronizada nesta configuração de reator, pois é dependente da forma como a tampa de algodão se adapta ao reator. Entretanto, esta configuração de reator permitiu avaliar parâmetros de otimização do sensor para H_2S. A determinação de H_2S deve ser realizada em reator fechado, não apenas buscando uma maior reprodutibilidade da resposta, como também pela alta toxicidade do sulfeto de hidrogênio.

5.8.5 Experimentos com o reator na configuração 3

Experimentos anteriores com diferentes configurações de reator e parâmetros de sistema evidenciaram condições limitantes na determinação de H_2S, como também definiram características que melhoraram sua performance. Baseado nestas observações foram realizadas modificações no reator e nas condições empregadas, estabelecendo uma terceira configuração para o reator fechado com tampa de teflon, descrita a seguir.

- Melhores resultados foram obtidos com o aumento da relação entre a quantidade de células e H_2S. Assim, a adição de meio de cultivo ATCC 125 ao sistema foi eliminada. Foi realizado um pequeno aumento no volume de suspensão celular para melhor acomodação do eletrodo no seio da mistura reacional, evitando o contato com a barra magnética de agitação. Assim, os experimentos foram realizados pela mistura de 30 mL de suspensão celular e 25 mL de solução de H_2S.

- Em testes anteriores a oxidação completa de H_2S a H_2SO_4 foi limitada pela quantidade de oxigênio disponível para consumo pelo *A. thiooxidans*. Não é possível realizar uma aeração do sistema fechado. Dessa forma, o volume de fase líquida no sistema foi reduzido e mantido em um pequeno béquer de plástico. O ar contido no volume restante do reator foi utilizado como reserva de oxigênio para a biorreação.

- Os experimentos com células submetidas à estarvação apresentaram melhores resultados de aumento de potencial eletroquímico. Portanto, as células utilizadas foram removidas do crescimento após 6 dias de cultivo, centrifugadas, e armazenadas em tubo falcon fechado por 24 h antes de sua utilização.

- Maiores valores de potencial foram alcançados empregando pH final da mistura reacional igual a 3,5. Considerando que foram adicionados ao sistema 30 mL de suspensão celular e 25 mL de solução de H_2S em pH aproximadamente 11, e que foram obtidos 55 mL de mistura reacional em pH 3,5, foi definido o pH para suspensão celular igual a 3,2. O pH final foi próximo de 3,5, sendo necessários pequenos ajustes de pH com solução de HCl e NaOH diluídos, minimizando o tempo que o reator permanece aberto para ajuste da acidez e a perda de H_2S por volatilização.

O reator nas condições definidas foi utilizado para análise de soluções de sulfeto de hidrogênio a 30 mg.L^{-1}, acompanhando as modificações nos potenciais de eletrodo e valores de pH ao longo do tempo. O eletrodo sensível a íons hidrogênio apresentou uma resposta potenciométrica com comportamento aproximadamente Nernstiniano. Foi observada uma relação linear com boa correlação entre o pH e a variação de potencial (R^2=0,9986), com coeficiente angular -54,73 mV/pH (Figura 46).

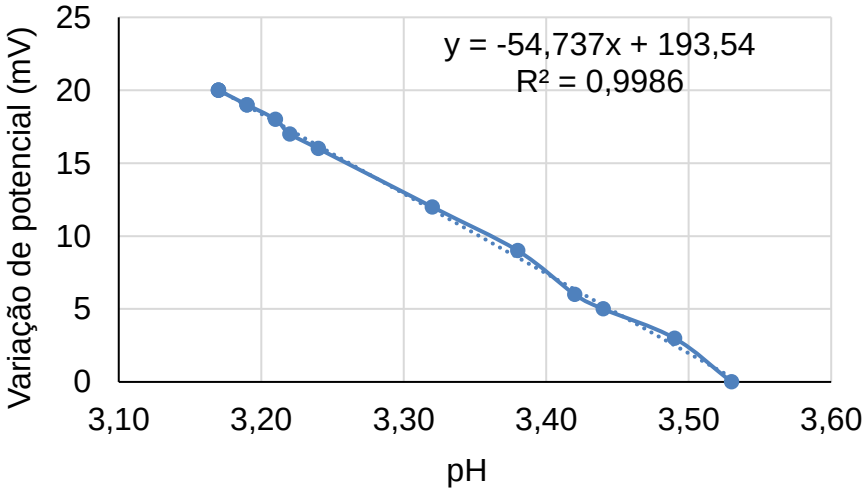


Figura 46 – Curva analítica do eletrodo sensível a íons hidrogênio nas condições experimentais de determinação de solução de H_2S 30 mg.L^{-1} empregando o reator na configuração 3.

A concentração da solução de H_2S foi determinada por titulação iodométrica de 10 mL de amostra, sendo determinada uma concentração 29,9 mg.L^{-1}. Houve um aumento linear no potencial de eletrodo nas primeiras duas horas de reação, acompanhado por uma redução de pH. A partir de aproximadamente 120 min houve uma redução gradativa do potencial até a observação de um patamar em 20 mV (Figura 47). O experimento foi realizado em duplicata a partir de células removidas do cultivo no mesmo dia, sendo obtida boa repetitividade dos resultados.

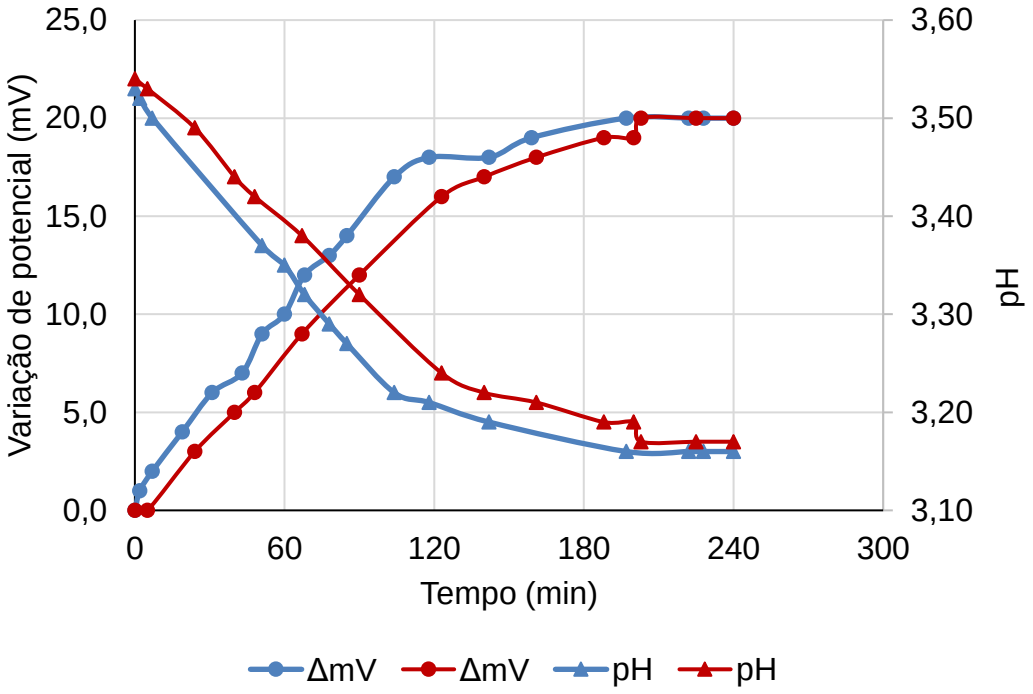


Figura 47 – Variação de potencial de eletrodo e de pH para análise de soluções de H_2S 30 mg.L^{-1} utilizando reator fechado com tampa de teflon em configuração 3. As curvas azuis representam os resultados para um primeiro experimento e as vermelhas para sua réplica.

O sulfeto de hidrogênio apresenta um limite de percepção olfativo bastante baixo, de aproximadamente 0,5 a 2 ppb em volume (GABRIEL; DESHUSSES, 2003). Ao abrir o reator, no final do experimento, não foi percebido odor característico de H_2S. Considerando que o reator é fechado para evitar o escape de gases este resultado indica que foi obtido um consumo de sulfeto de hidrogênio estimado em cerca de 99 %.

5.8.5.1 Influência da concentração de H_2S na resposta potenciométrica

Soluções de sulfeto de hidrogênio de concentrações 1, 5, 15, 50 e 70 $mg.L^{-1}$ foram testadas nas mesmas condições empregadas para o sistema contendo 30 $mg.L^{-1}$ de H_2S, definidas no item 5.9.5. As concentrações foram ajustadas por diluição apropriada e determinadas por titulação iodométrica até a obtenção da concentração desejada. Os resultados para concentrações entre 1 e 50 $mg.L^{-1}$ são apresentadas na Figura 48.

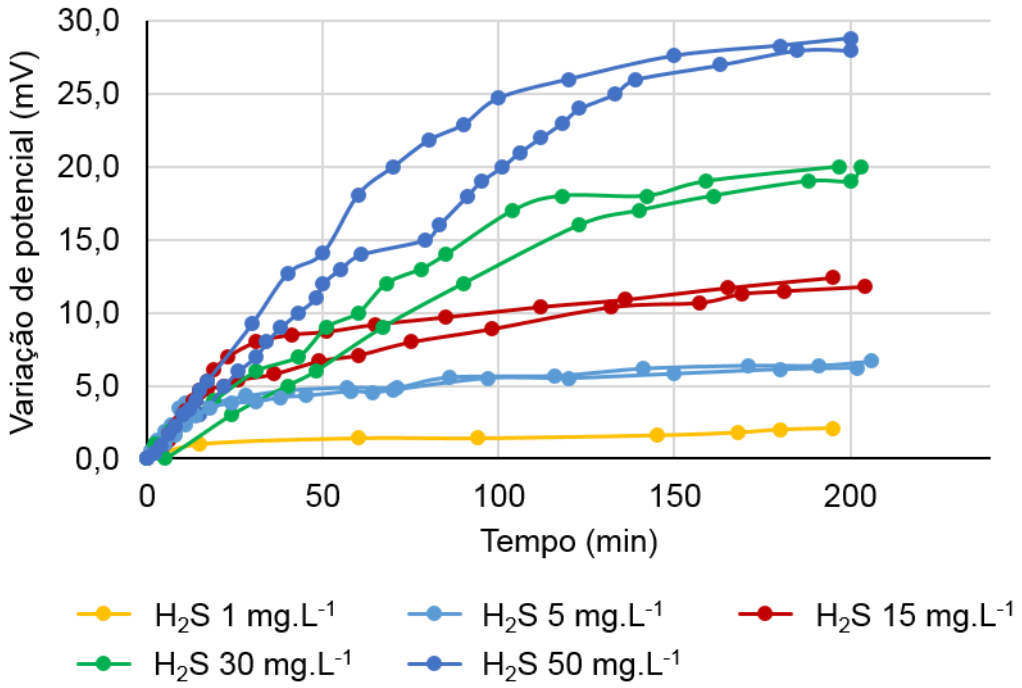


Figura 48 – Resposta potenciométrica em função da variação da concentração de H_2S utilizando reator fechado com tampa de teflon em configuração 3.

O aumento de potencial mostrou relação direta com a concentração de H_2S. As respostas para concentrações entre 1e 50 $mg.L^{-1}$ apresentaram um perfil semelhante. Houve uma região de aumento linear da variação de potencial, que se estendeu por um tempo maior à medida que aumentou a concentração de H_2S. Este foi seguido de uma redução gradativa da taxa de aumento até alcançar um estado estacionário próximo a 200 min.

As diferentes variações de potencial em função da concentração indicam que o consumo de H_2S não foi limitado pela quantidade de oxigênio presente no sistema. Ao final dos experimentos não foi percebido odor de H_2S ao abrir o reator.

O sistema de reação contendo 70 $mg.L^{-1}$ de H_2S mostrou um perfil de crescimento análogo ao encontrado para as demais concentrações testadas. A faixa linear de aumento de potencial se estendeu por um período de aproximadamente 500min até o início da estabilização do potencial e do pH. A oxidação do H_2S foi efetiva, causando uma redução de pH de 3,46 para 2,90. Entretanto, o tempo de resposta para esta concentração foi consideravelmente elevado, sendo aproximadamente 2,8 vezes maior que o encontrado para 50 $mg.L^{-1}$ de H_2S (Figura 49).

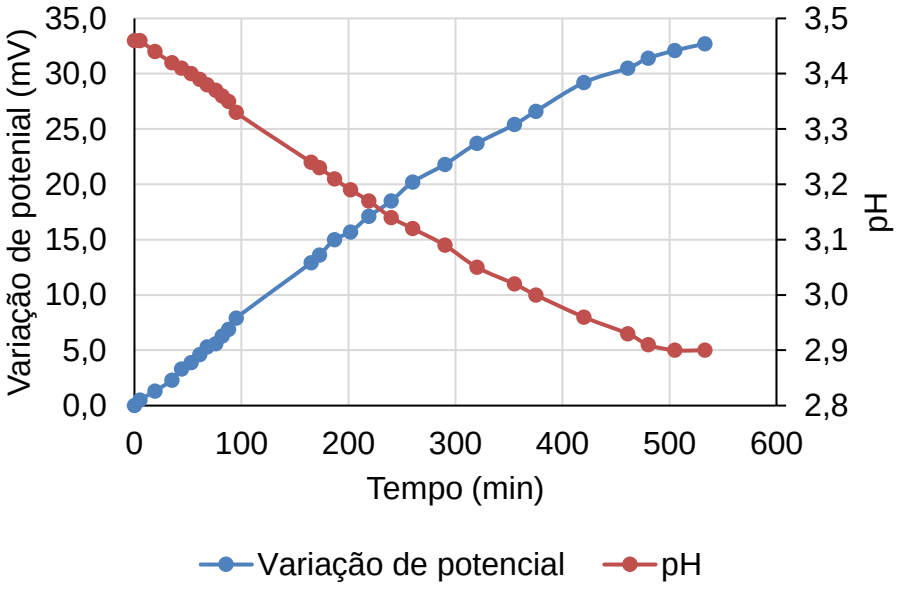


Figura 49 – Resposta potenciométrica para solução de H_2S de concentração 70 $mg.L^{-1}$ utilizando reator fechado com tampa de teflon em configuração 3.

Considerando que a variação de potencial foi decorrente da formação de ácido sulfúrico, um ácido forte, e considerando-o completamente ionizado por se tratar de uma solução diluída, a taxa de aumento de potencial pode ser considerada uma medida da rapidez da reação de oxidação completa de H_2S por *A. thiooxidans*. As soluções de concentrações mais baixas, de 5 e 15 mg.L^{-1} apresentaram as mais altas taxas de reação nos primeiros 15 minutos, seguida por sua rápida redução em função da baixa concentração de H_2S remanescente. A partir de 30 minutos a taxa de reação foi diretamente relacionada à razão entre a concentração inicial de H_2S e de células, reduzindo à medida que diminuiu a disponibilidade de H_2S no sistema, exceto para a solução contendo 70 mg.L^{-1} de H_2S. O sistema contendo 70 mg.L^{-1} de H_2S apresentou uma baixa taxa inicial de reação comparado aos demais, mantendo a taxa entre 4 e 5,4 mV.h^{-1} ao longo das primeiras 3 horas de reação (Figura 50), indicando que para a maior concentração testada a rapidez de reação foi limitada pelo equilíbrio de absorção e dissolução do H_2S entre as fases gasosa e aquosa.

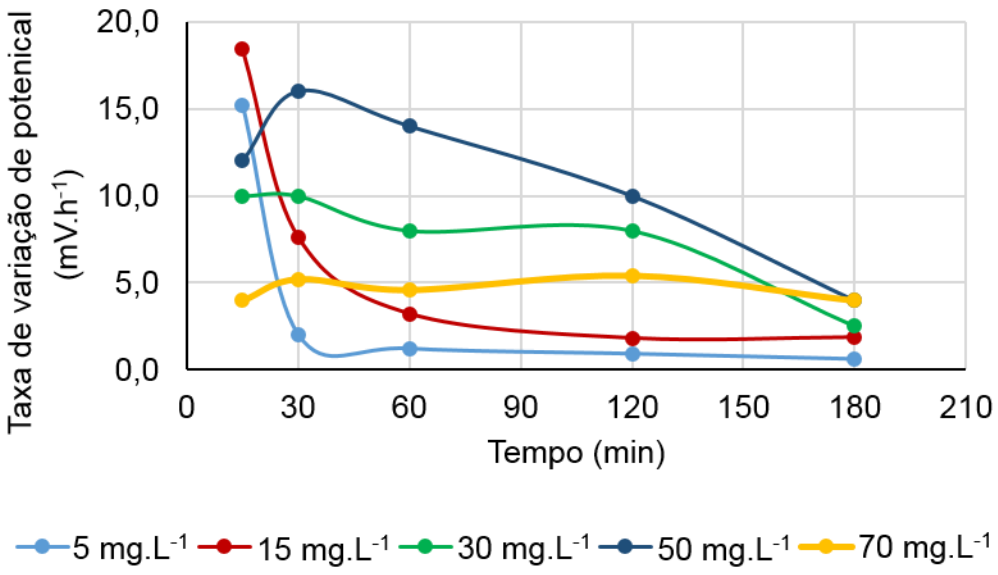


Figura 50 – Variação na taxa de reação para soluções de H_2S entre 5 e 70 mg.L^{-1} empregando o reator fechado com tampa de teflon em configuração 3.

Resultados semelhantes foram relatados por Shinabe et al. (1995) estudando a remoção de sulfeto de hidrogênio por *A. thiooxidans* KS1 em sistema biológico de desodorização. O reator utilizado consistiu em um sistema com fase líquida contendo

suspensão celular e fase gasosa à qual o sulfeto de hidrogênio foi adicionado. A concentração de sulfeto de hidrogênio na fase gasosa foi acompanhada por cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama. Na ausência de células e em pH 2,5 a concentração de H_2S na fase gasosa foi reduzida de 2,1 µmol.L^{-1} para cerca de 1 µmol.L^{-1} em 8 minutos, indicando que aproximadamente 50 % do H_2S adicionado sofreu absorção física. Após a absorção a concentração de H_2S se manteve constante por 40 min, indicando que a oxidação química neste intervalo foi desprezível. Com a adição de células ao sistema, com quantidade de inóculo entre 0,1 e 0,5 %, o H_2S foi completamente eliminado entre 40 e 13 minutos de reação, respectivamente. Os resultados mostraram que o equilíbrio de solubilização do H_2S é deslocado à medida que este é consumido biologicamente favorecendo o aumento de sua quantidade na fase aquosa, tornando-o disponível para o consumo metabólico. De forma semelhante aos resultados obtidos neste estudo, para baixas concentrações de H_2S, quanto menor a concentração de H_2S e maior a concentração celular, maior a taxa de reação. Para o experimento contando com a menor razão entre concentração de H_2S e concentração celular houve uma rápida diminuição na concentração de H_2S nos primeiros 5min de reação, também percebida para o experimento com a maior razão. Para o último, entretanto, a partir de 5 min a taxa de redução da concentração se tornou constante, indicando que após atingido o equilíbrio de solubilidade a taxa de consumo de H_2S foi limitada pela difusão do H_2S da fase gasosa para a fase aquosa, apresentando um comportamento semelhante ao obtido no experimento empregando solução de H_2S de concentração 70 mg.L^{-1}. Ainda segundo SHINABE et al. (1995), a taxa de remoção de H_2S em pH 2,5 para concentrações próximas a 11 µmol.L^{-1} foi lenta comparada à observada para a faixa de concentração mais baixa, indicando inibição por substrato da cepa KS1. O H_2S foi completamente eliminado na mais alta concentração entre 500 e 600 min de reação, indicando uma baixa taxa de reação para a maior concentração, em conformidade com os resultados obtidos para 70 mg.L^{-1} de H_2S.

Um maior tempo de contato permite uma maior absorção de H_2S e de oxigênio da fase gasosa e dissolução na fase líquida, fornecendo ao micro-organismo condições de metabolizar o substrato (CHAIPRAPAT et al, 2011). Lee et al. (2006) relataram que a eficiência de biofiltros para remoção de H_2S empregando *A.*

thiooxidans AZ11 foi reduzida quando o tempo de retenção de H_2S variou de 9 para 6s, sendo a capacidade de eliminação de H_2S limitada não pela atividade microbiana, mas pela difusão de O_2 e H_2S da fase gasosa para a fase líquida.

5.8.5.2 Resposta potenciométrica em pH 5,0

A característica acidófila de *A. thiooxidans* determina que a faixa de máxima atividade metabólica seja estabelecida em pH menor que 5. As cepas de *A. thiooxidans* TAS, MET e AZ11, por exemplo, apresentaram taxa máxima de oxidação de enxofre em pH 1,3, 2,6 e 1,5, respectivamente (LEE et al, 2006). Entretanto, o aumento de pH favoreceu a sensibilidade do sistema de detecção de H_2S. Para avaliar o comportamento do biossensor frente a um aumento ainda maior de pH foi realizado um experimento de consumo de H_2S em pH 5,0. O analito continha 50 $mg.L^{-1}$ de sulfeto de hidrogênio e a resposta potenciométrica foi comparada ao resultado obtido em pH 3,5 (Figura 51).

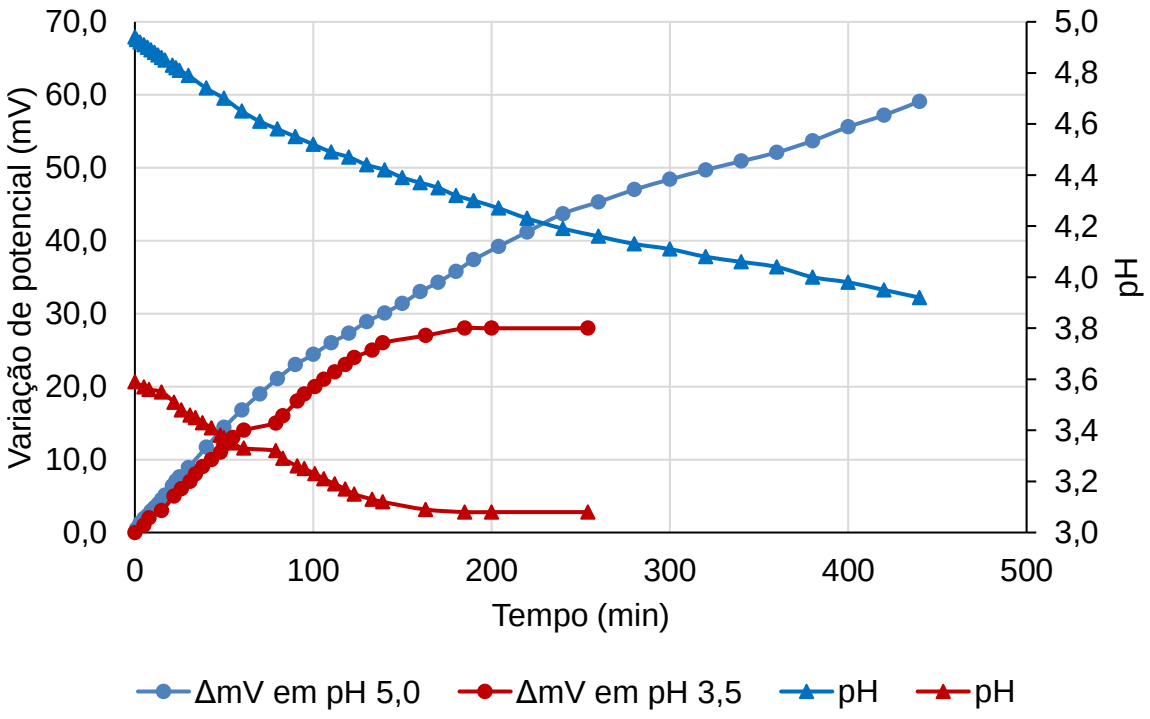


Figura 51 – Resposta potenciométrica para soluções de H_2S de concentração 50 $mg.L^{-1}$ em pH 3,5 e em pH 5,0 utilizando o reator em configuração 3.

A resposta potenciométrica foi efetiva em pH 5,0, apresentando maior taxa de aumento de potencial e alcançando ao final de 440 min de reação aproximadamente o dobro do aumento de potencial observado em pH 3,5. Entretanto, mesmo após 7 h de reação não foi atingido um estado estacionário. O longo tempo de resposta pode ser atribuído à baixa taxa metabólica em pH mais alto e, consequentemente, uma menor taxa de reação. Segundo Lee et al. (2000) a espécie *A. thiooxidans* ASWW-2 foi capaz de oxidar enxofre mesmo em pH 8. Entretanto, a taxa de oxidação de enxofre atingiu um máximo em pH 4 e reduziu 20 % em pH 5,0, continuando a diminuir com o aumento de pH. Shinabe et al. (1995) também relataram que a taxa específica de consumo de H_2S para *A. thiooxidans* KS1 reduziu aproximadamente 30 % quando o pH foi aumentado de 2,5 para 5,0 e diminuiu 50 % quando o pH foi elevado para 6,0.

Em pH 5,0 e abaixo deste, o sulfeto de hidrogênio existe quase exclusivamente em sua forma não ionizada, obedecendo em solução diluída o comportamento previsto pela lei de Henry. Shinabe et al. (1995) determinaram que o coeficiente volumétrico de transferência de massa (K_La) entre H_2S gasoso e solução aquosa contendo suspensão celular de *A. thiooxidans* KS1 foi independente do pH para a faixa estudada, entre pH 1 e 6. O valor de K_La foi obtido em condição limite de difusão, empregando suspensões celulares em concentração tal que a quantidade de H_2S na fase líquida fosse mantida em zero. Considerando que os experimentos com o reator em pH 3,5 e 5,0 foram mantidos em igual temperatura e pressão e que os volumes de fase líquida e gasosa, assim como a quantidade inicial de H_2S e a área superficial de interface entre as fases foram mantidas constantes, os diferentes aumentos de potencial observados não podem ser atribuídos a limitações de transferência de massa decorrentes da modificação de pH, mas por diferenças na taxa de consumo metabólico de H_2S.

A taxa de oxidação completa de H_2S por *A. thiooxidans* FG-01 pode ser comparada em função das modificações de acidez observadas. A Figura 52 expressa a modificação na concentração hidrogeniônica observada nos dois experimentos em função do tempo.

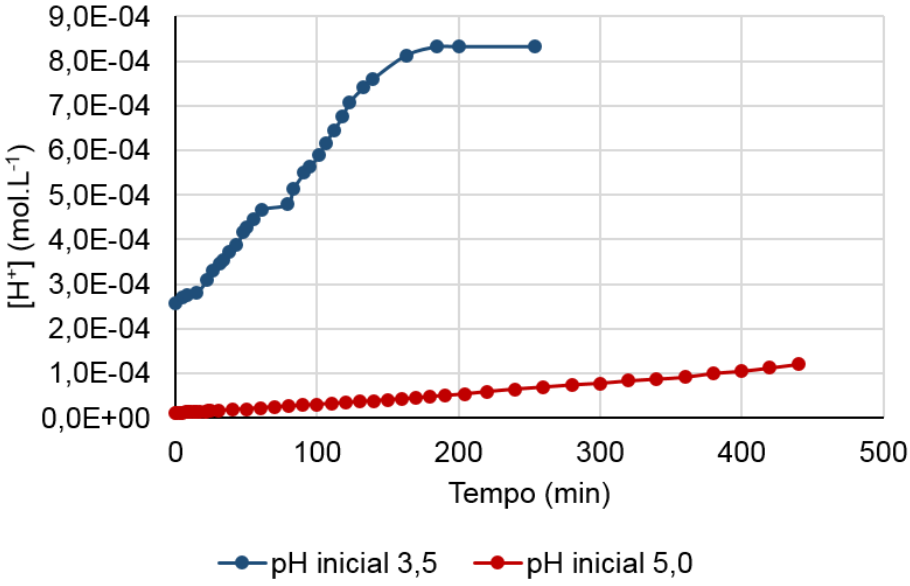


Figura 52 – Variação na concentração hidrogeniônica em função do pH inicial para sistema de análise contendo 50 mg.L^{-1} de H_2S empregando o reator em configuração 3.

Embora o aumento de potencial tenha sido mais expressivo para o sistema inicialmente em pH 5,0, o aumento na concentração de íons H_3O^+ foi notoriamente maior em pH 3,5. No experimento em maior pH houve redução do pH de 4,94 para 3,92, enquanto em pH 3,5 houve uma redução de pH de 3,59 para 3,08. O resultado indica que embora em pH 3,5 tenha ocorrido uma redução de pH menor, a quantidade de íons H_3O^+ gerada foi aproximadamente 5 vezes maior, indicando uma maior atividade metabólica neste pH. Uma vez que a resposta do biossensor foi estabelecida em estado estacionário o pH 3,5 foi definido como condição de sistema para determinação da curva de calibração. Em trabalhos futuros a maior variação de potencial obtida em pH 5 será explorada para aplicação em concentrações de H_2S menores que 5 mg.L^{-1}, possivelmente reduzindo o tempo de resposta e o limite de detecção do biossensor neste pH.

5.8.5.3 Brancos reacionais na ausência de células e de sulfeto de hidrogênio

Foram realizados dois testes controle para avaliar o comportamento da resposta potenciométrica na ausência de células e na ausência de H_2S. O primeiro teste, na ausência de células, visou avaliar a possível produção de sinal pela oxidação química do H_2S. O segundo teste controle foi realizado na ausência de H_2S, substituindo a solução do analito por igual volume de água destilada. Os resultados são apresentados na Figura 53.

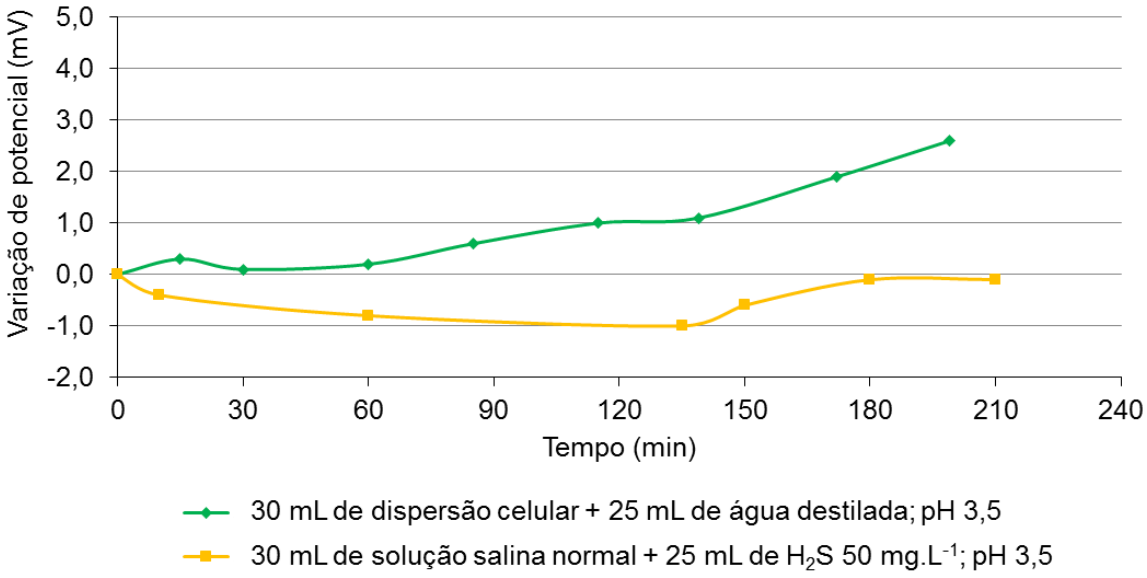


Figura 53 – Brancos reacionais para o sistema de detecção de H_2S em configuração 3.

O H_2S em água produz uma solução de pH 4 que em condições de saturação em temperatura ambiente contém aproximadamente 0,11 mol.L^{-1} de H_2S (HUGHES; CENTELLES; MOORE, 2009). O H_2S em solução pode ser oxidado quimicamente pelo oxigênio, mas esta reação em pH menor que 6 é bastante lenta. A partir de pH 6 a dissociação do H_2S não pode ser desconsiderada, existindo neste pH aproximadamente 10 % na forma de bissulfeto. O íon HS^- é instável e prontamente reage com oxigênio. Entretanto, o principal produto desta oxidação é enxofre elementar. Outras espécies em menor quantidade podem ser formadas, como polissulfetos, tetrationatos e tiossulfato, principal produto em pH maior que 8,5 (HUGHES; CENTELLES; MOORE, 2009). O H_2SO_4 não é esperado como produto de

oxidação química do H_2S em meio ácido. De fato, não foi observado aumento de potencial, embora tenha apresentado uma pequena oscilação durante o tempo de reação, entre 204,9 e 205,9 mV, sendo o pH mantido entre 3,50 e 3,52, não havendo resposta considerável.

O ensaio na ausência de H_2S apresentou uma pequena resposta. A variação de potencial oscilou próximo a zero durante a primeira hora de reação e aumentou lentamente até uma variação de potencial de 2,6 mV. Este resultado correspondeu ao branco na curva de calibração.

5.8.5.4 Curva de calibração do biossensor potenciométrico

Os resultados obtidos no item 5.9.5.1, avaliando a influência da concentração de H_2S na resposta potenciométrica foram utilizados na construção de uma curva de calibração. Foram utilizadas como respostas do biossensor as variações de potencial alcançadas em estado estacionário. Este correspondeu a 200 minutos de reação, excetuando a concentração 70 $mg.L^{-1}$. Esta concentração envolveu maior tempo de reação e foi utilizada na construção da curva da variação de potencial em 530 minutos, correspondendo ao início da estabilização do sinal. Os resultados obtidos para concentrações entre 1 e 70 $mg.L^{-1}$ são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Resposta do biossensor potenciométrico empregado *A. thiooxidans* FG-01 em função da concentração de H_2S até 70 $mg.L^{-1}$.

Concentração de H_2S ($mg.L^{-1}$)	Variação de potencial (mV)		Média (mV)	Desvio Padrão (mV)	Desvio Padrão Relativo (%)
0	2,6	1,8	2,2	0,6	25,71
1	2,1		2,1	-	-
5	6,4	6,2	6,3	0,1	2,24
15	12,4	11,8	12,1	0,4	3,51
30	20	20	20	0	0
50	28	28,8	28,4	0,6	1,99
70	32,7		32,7	-	-

A curva de calibração considerando a faixa estudada apresentou forte correlação positiva entre a variação de potencial e a concentração de H_2S com um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,97. Entretanto, a maior e a menor concentração H_2S estudada apresentaram notórios desvios em relação à linha de tendência linear (Figura 54).

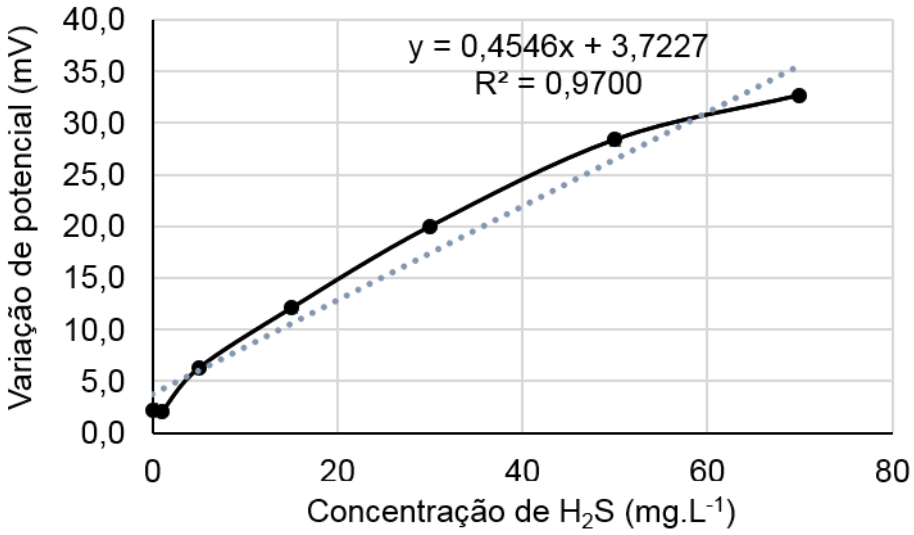


Figura 54 – Curva de calibração para o biossensor potenciométrico considerando concentrações de H_2S até 70 $mg.L^{-1}$. A linha azul representa o ajuste da linha de tendência linear.

A resposta potenciométrica para concentração de H_2S igual a 1 $mg.L^{-1}$ mostrou um pequeno aumento de potencial estabilizando em um valor máximo comparável ao ensaio em branco (Figura 55). A resposta para 70 $mg.L^{-1}$ de H_2S apresentou um desvio da linearidade em relação às menores concentrações, além de iniciar a estabilização do sinal em um tempo que excede o dobro do necessário para as demais concentrações. Assim, considerando a faixa de linearidade com concentrações entre 5 $mg.L^{-1}$ e 50 $mg.L^{-1}$, a nova curva de calibração assume o perfil representado na Figura 56.

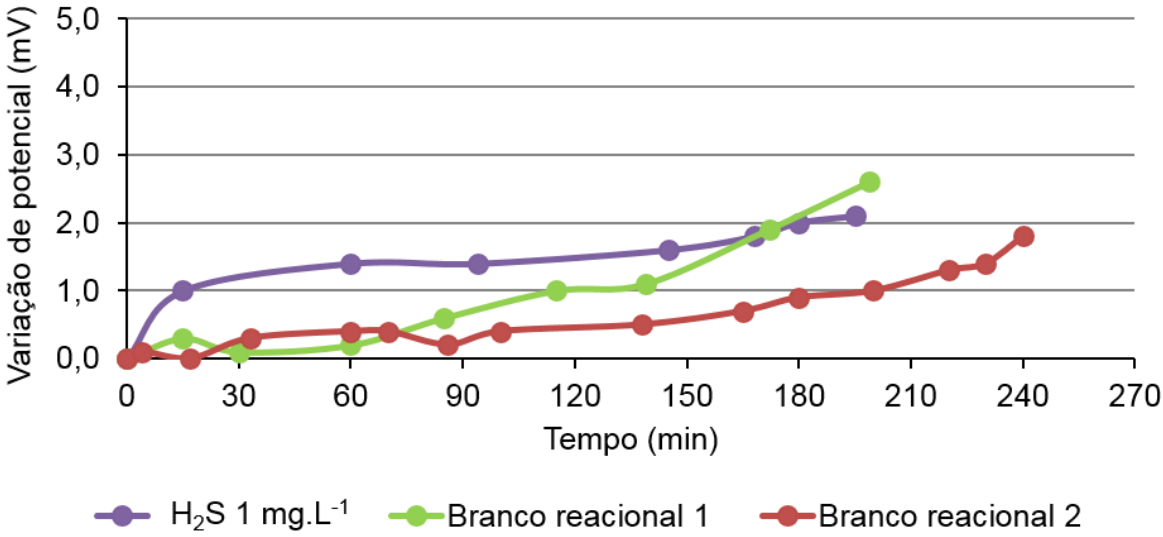


Figura 55 – Comparação da resposta potenciométrica obtida para o branco reacional e para 1 mg.L^{-1} de H_2S empregando o reator em configuração 3.

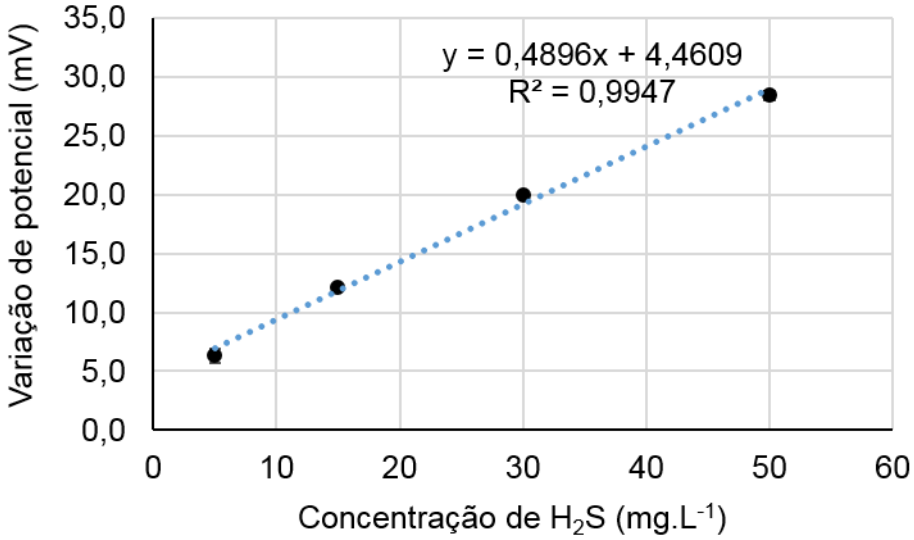


Figura 56 – Curva de calibração para o biossensor potenciométrico considerando concentrações de H_2S entre 5 e 50 mg.L^{-1}. A linha azul representa o ajuste da linha de tendência linear.

A curva de calibração determinada para concentrações entre 5 e 50 mg.L^{-1} apresentou uma forte linearidade para a resposta potenciométrica em função da concentração de H_2S, com coeficiente de determinação (R^2 = 0,9947). A equação de regressão linear (Equação 28) descreve a relação entre as duas variáveis.

$$\text{Concentração de } H_2S \text{ (mg.L}^{-1}) = \frac{\text{Variação de potencial (mV)} - 4{,}4609}{0{,}4896} \qquad \text{Equação 28}$$

Para avaliar o ajuste da resposta potenciométrica à Equação de Regressão Linear foi realizado um ensaio com solução de H_2S com concentração 40 mg.L^{-1} preparada por dissolução de quantidade apropriada de sulfeto de sódio em 50 mL de água destilada.

O comportamento da resposta do biossensor potenciométrico, apresentada na Figura 57, mostrou um perfil de aumento de potencial semelhante ao desenvolvido para as demais concentrações de H_2S. Em aproximadamente 180 minutos de reação houve estabilização do sinal do biossensor em 23 mV. Esta variação de potencial determina, empregando a equação de regressão linear, uma concentração de H_2S igual a 37,8 mg.L^{-1}. A concentração de H_2S obtida por titulação iodométrica foi determinada como 36,7 mg.L^{-1}. Os resultados indicaram boa acurácia apresentando um erro relativo de 2,99 %.

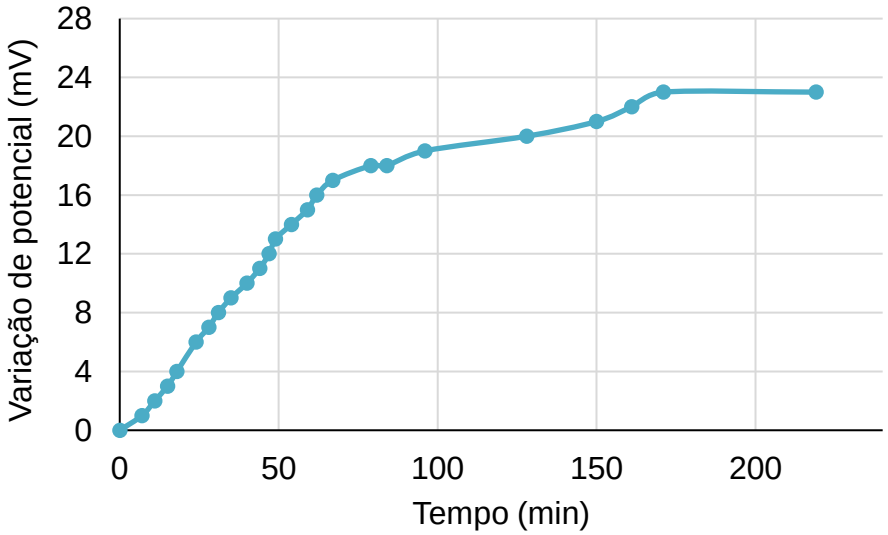


Figura 57 – Resposta potenciométrica para solução de H_2S de concentração 37 mg.L^{-1} empregando o reator em configuração 3.

5.8.5.5 Influência de possíveis espécies químicas interferentes

A seletividade é possivelmente a mais importante característica de um biossensor, sendo definida como a habilidade de um biossensor em detectar um analito específico em uma amostra contendo outros componentes e contaminantes (BHALLA et al, 2016). A seletividade do biossensor potenciométrico desenvolvido neste trabalho foi avaliada a partir da análise de soluções contendo 30 $mg.L^{-1}$ de H_2S e íons tipicamente encontrados em água de produção, em concentração determinada por Andrade (2009). Os resultados obtidos foram comparados aos ensaios realizados na ausência dos íons possivelmente interferentes estudados.

Alguns dos íons presentes na solução salina analisada, como Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+, SO_4^{2-} e PO_4^{3-} são também encontrados no meio de cultivo ATCC 125 em concentrações relativamente altas, de forma que o micro-organismo foi adaptado à presença desses íons. Entretanto, são relevantes as altas concentrações dos íons sódio e cloreto características da água produzida.

Kamimura et al. (2005) estudaram o efeito de altas concentrações de cloreto de sódio no metabolismo de compostos reduzidos de enxofre por *A. thiooxidans* SH. Os resultados obtidos indicaram que a oxidação de sulfeto ocorreu em duas etapas. Em uma primeira etapa o sulfeto foi oxidado no lado periplasmático da membrana citoplasmática gerando um acúmulo de enxofre elementar. Este foi então oxidado em uma etapa seguinte, dependente de um gradiente de íons Na^+. A oxidação de sulfeto foi estimulada por concentrações de NaCl entre 10.000 e 30.000 $mg.L^{-1}$, especialmente na segunda etapa (KAMIMURA et al, 2005). Quatrini et al. (2017) relataram que a cepa *A. thiooxidans* CLST foi cultivada em meio contendo 15 $g.L^{-1}$ de cloreto, sendo encontrada em regiões cuja salinidade da água varia entre 1,7 e 76,9 $g.L^{-1}$ de cloreto de sódio, enquanto a cepa *A. thiooxidans* ON106 apresentou taxa máxima de oxidação de enxofre em meio contendo aproximadamente 30.000 $mg.L^{-1}$ de NaCl (KAMIMURA, 2003).

As análises foram realizadas com soluções de sulfeto de hidrogênio preparadas em dias diferentes. Os resultados, representados na Figura 58, indicaram que não houve interferência dos íons testados na resposta potenciométrica nas concentrações e condições experimentais empregadas. A resposta na presença de íons característicos de água de produção apresentou o mesmo perfil de variação de potencial que as análises na ausência destes íons. Houve estabilização do sinal com 200min de reação em 19,8 e 19,9 mV. O desvio padrão encontrado para estas análises foi de 0,070 mV e a comparação com a resposta na ausência de íons interferentes mostrou um erro relativo de 0,25 %.

O ensaio em branco, realizado na ausência de H_2S e na presença dos íons interferentes testados, indicou um pequeno aumento de potencial a partir de meia hora de reação, estabilizando com um aumento de 2,8 mV. Houve um pequeno aumento ao longo do tempo em relação ao branco reacional realizado na ausência de íons interferentes. Valores semelhantes foram alcançados após 180 min de reação, indicando não haver interferência importante na resposta para o consumo de H_2S.

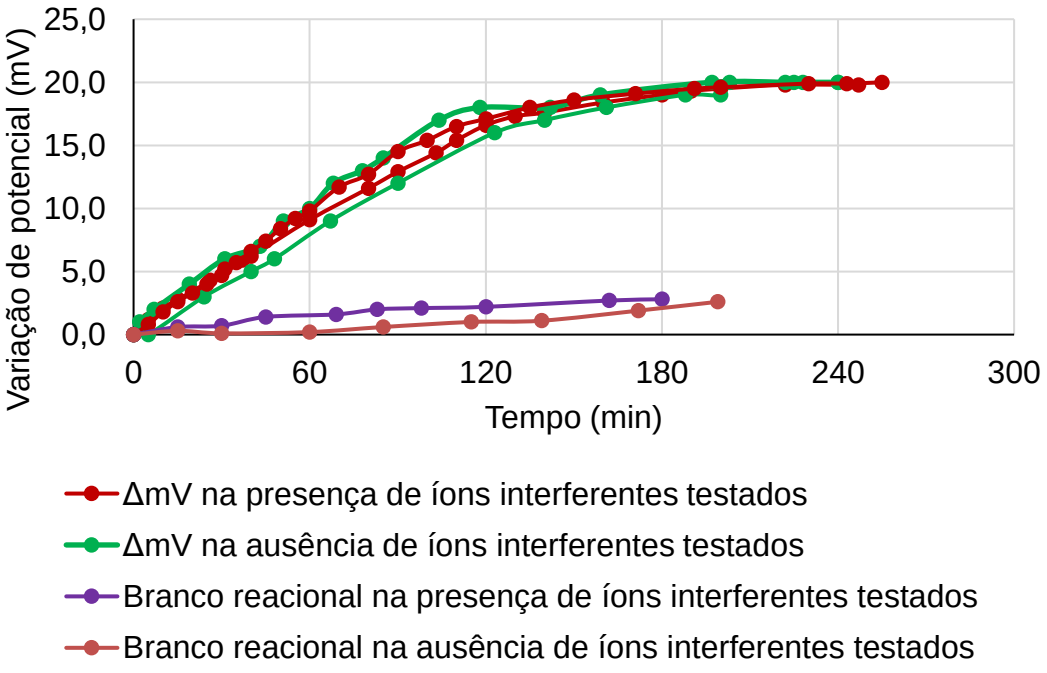


Figura 58 – Comparação da resposta potenciométrica obtida na presença de na ausência de potenciais espécies químicas interferentes.

5.9 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação entre resposta potenciométrica e titulação iodométrica

O produto principal de oxidação de sulfeto de hidrogênio por *A. thiooxidans* é variável em função das condições de sistema empregadas, especialmente a disponibilidade de oxigênio (MONTEBELLO et al, 2010). O objetivo deste experimento foi avaliar a extensão do consumo de H_2S e o produto principal formado em sistema fechado e com pequeno *headspace*.

Os sistemas foram monitorados através de medidas potenciométricas de pH e ao final do tempo de reação estes foram titulados por iodometria. Os resultados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Respostas potenciométrica e iodométrica ao consumo de H_2S por *A. thiooxidans* em sistema fechado.

Sistema	Volume de solução de H_2S (mL)	Volume de suspensão celular (mL)	Volume de água destilada (mL)	Tempo de reação (h)	Volume de titulante (mL)	Variação de pH
A	0	0	80	-	19,15	-
B	50	0	30	-	7,65	-
C	50	30	0	1	16,15	0,05
D	50	30	0	2	17,25	0,03

A oxidação completa de H_2S leva à formação de ácido sulfúrico, provocando um aumento na concentração de íons H_3O^+ e uma redução no pH que pode ser acompanhada pela resposta potenciométrica. Através da titulação iodométrica é possível avaliar a extensão do consumo de H_2S, mas não o produto formado.

Em pH próximo a 2,0 pode-se considerar que estão presentes no sistema aquoso apenas as espécies químicas H_2S, Na^+ e Cl^- e as células de *A. thiooxidans*. Os íons Na^+ e Cl^- são inertes nas condições empregadas e, portanto, qualquer espécie que modifique as propriedades do sistema deve ser produto da interação entre células e H_2S. Quando a disponibilidade de oxigênio para a biorreação é limitada, a oxidação do H_2S é incompleta e prevalece a formação de enxofre elementar, sendo observado como partículas amarelas (CHAIPRAPAT et al, 2011). De fato, foi observado um aumento na turbidez dos sistemas ao longo do tempo, que pode ser atribuído à formação desse enxofre.

O sistema A representa o sistema em branco, na ausência de células e H_2S. O volume de solução de $Na_2S_2O_3$ utilizado na titulação do sistema A representa o volume máximo de titulante que pode ser obtido, uma vez que não houve consumo do iodo por nenhuma outra espécie.

O volume de solução de $Na_2S_2O_3$ utilizado para o sistema B representa o menor volume de titulante possivelmente obtido no experimento. Na ausência de células o H_2S está em sua máxima concentração. O sulfeto de hidrogênio reage com o iodo, restando menos I_2 disponível para consumo na titulação. Para os sistemas contendo células e H_2S, quanto maior o volume de titulante utilizado, menor foi o consumo de I_2 pelo H_2S e menor a quantidade de H_2S ao fim do tempo de reação. Ou seja, para os sistemas C e D, quanto mais próximo do volume de titulante gasto no sistema A, maior o consumo de H_2S pelas bactérias.

A diferença de volume de titulante gasto entre o sistema A e os outros sistemas permite avaliar a extensão do consumo de H_2S e calcular a concentração H_2S ao final da reação. Após uma hora de reação houve consumo de 74 % do sulfeto de hidrogênio originalmente presente no sistema e um aumento no valor de pH de 0,05 unidades. Após duas horas de reação a concentração inicial de H_2S, de 19,6 $mg.L^{-1}$, foi reduzida a 3,2 $mg.L^{-1}$ e houve um leve aumento de pH de 0,03 unidades.

A produção de H_2SO_4 provocaria uma redução no pH, mas a medida de pH oscilou 0,06 unidades ao longo do experimento. Assim, é possível inferir que as condições de baixa oxigenação e baixa concentração celular não foram limitantes para o consumo de H_2S, sendo obtida uma conversão de cerca de 84 % do H_2S. Nestas condições quase todo o sulfeto de hidrogênio consumido foi convertido em espécies sulfuradas parcialmente oxidadas, entre elas enxofre elementar uma vez que houve aumento na turbidez do sistema e que as espécies $S_2O_3^=$ e $SO_3^=$ são incolores e solúveis em água.

5.10 Avaliação do consumo de H_2S por *A. thiooxidans* pela comparação entre resposta potenciométrica e por espectrofotometria

O aumento de turbidez observado no experimento de consumo de H_2S por *A. thiooxidans* em sistema fechado (item 5.10) evidenciou a formação de enxofre elementar como produto de oxidação do H_2S. Os dados obtidos no experimento não permitiram caracterizá-lo. Entretanto, sua presença pode ser detectada espectrofotometricamente em comprimento de onda determinado. Foi escolhido 620nm, mesmo comprimento de onda utilizado para determinação da suspensão celular, uma vez que o enxofre é formado em meio às células. A absorbância da suspensão celular pode ser descontada ao zerar a leitura do espectrofotômetro e qualquer aumento de absorbância deve-se à formação de enxofre da biorreação.

Os valores de pH e de absorbância em 620 nm foram obtidos para sistemas independentes, mas em mesmas condições e a partir das mesmas soluções, de forma que os resultados estão relacionados. Houve necessidade de abrir momentaneamente o sistema acompanhado por espectrofotometria a cada medida de absorbância. Assim, optou-se por sistemas independentes para minimizar a influência da perda de H_2S no sistema acompanhado por potenciometria.

A formação de H_2SO_4 foi comprometida pela limitação de oxigênio experimentada em sistema fechado (item 5.9.1). Assim, os sistemas foram fechados neste experimento com tampa porosa buscando permitir a difusão do oxigênio para

dentro do sistema a partir do gradiente de concentração de O_2 formado entre o meio externo e o meio interno onde o oxigênio fora consumido.

Os resultados são apresentados na Figura 59. A mistura reacional provocou uma diluição da suspensão celular reduzindo a absorbância inicial para 1,238 e um aumento do pH que estabilizou em 2,41. A partir deste momento pH e absorbância em 620 nm foram monitorados em intervalos de 15 minutos.

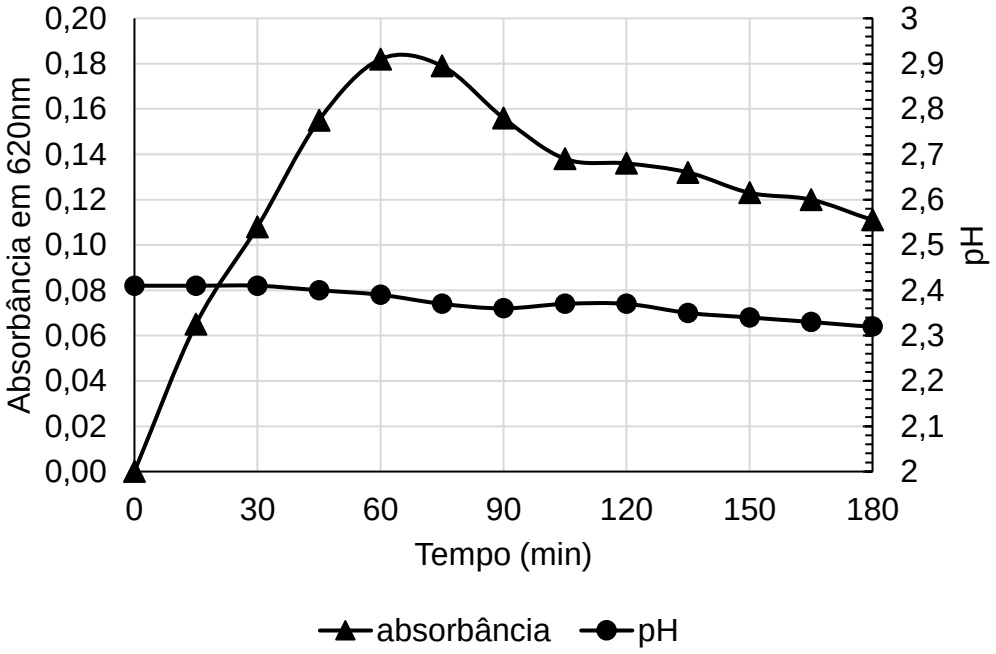


Figura 59 – Evolução da absorbância em 620nm e do perfil de pH para o sistema de consumo de H_2S por *A. thiooxidans* em sistema fechado com tampa porosa.

Foi observado um aumento acentuado e aproximadamente linear de absorbância (R^2 = 0,98) atingindo um valor máximo ao fim da primeira hora de interação entre células e H_2S. Durante a primeira meia hora de reação o pH se manteve constante, reduzindo gradativamente a medida que a absorbância do sistema também diminuía. O sistema apresentou um aspecto turvo, mas homogêneo ao longo do experimento. O sistema foi mantido sob agitação constante, de forma que a diminuição de absorbância observada não foi devido à precipitação de enxofre.

Estes resultados indicam que a oxidação de H_2S por *A. thiooxidans* nas condições do experimento ocorreu em dois estágios. Em um primeiro estágio o H_2S foi convertido em enxofre elementar e em um estágio subsequente o enxofre formado foi oxidado a H_2SO_4 (JENSEN et al, 2011).

Inicialmente houve uma competição entre enxofre e ácido sulfúrico como produto principal de oxidação de H_2S. Entretanto, há uma razão estequiométrica de 1:4 na proporção de oxigênio necessário para formação de enxofre elementar e ácido sulfúrico, respectivamente. A constante de Henry para o H_2S e para o O_2 são 483atm e 41.100atm a 298 K, respectivamente. Estes valores indicam que a solubilidade do oxigênio é cerca de 85 vezes menor que do H_2S (AITA et al, 2016). Dessa forma, deve haver uma alta vazão de oxigênio para compensar sua baixa solubilidade. Sendo a disponibilidade de O_2 para biorreação limitada neste sistema, a oxidação do H_2S é incompleta e a formação de enxofre elementar prevalece.

Em um segundo momento há uma competição entre H_2S e enxofre elementar, formado ao longo da primeira etapa de oxidação, pela espécie química preferencialmente metabolizada. A oxidação bacteriana de H_2S é facilitada em relação à oxidação de enxofre elementar uma vez que a estrutura do ciclooctasulfano precisa ser aberta e ativada antes de seu transporte através da membrana celular para o espaço periplasmático (YIN et al, 2014). Assim, o sulfeto de hidrogênio foi oxidado preferencialmente.

Ao final de 1 hora de reação o pH foi reduzido de 2,41 para 2,39. O ácido sulfuroso é um possível produto intermediário de oxidação de enxofre a ácido sulfúrico (SUZUKI et al, 1992). Entretanto, é um ácido fraco, possuindo constantes de acidez $1,7.10^{-2}$ e $6,8.10^{-8}$ (SIMÕES et al, 2004). Mesmo considerando, neste intervalo de tempo, que a variação de pH se deveu à formação de ácido sulfúrico como produto de oxidação completa e considerando-o completamente ionizado uma variação de 0,02 unidades de pH representaria um consumo de aproximadamente $4,60.10^{-6}$ mol de H_2S.

O sulfeto de sódio foi pesado para o preparo de solução contendo 50 $mg.L^{-1}$ de H_2S. Entretanto, em função de sua alta higroscopicidade, parte desta massa era composta de água e a concentração da solução de H_2S utilizada no experimento continha 44 $mg.L^{-1}$ de H_2S, determinada por titulação iodométrica, havendo inicialmente no sistema $3,24.10^{-5}$ mol de H_2S disponível para consumo. Este resultado indica que ao final de 1 h de reação aproximadamente 14,2 % do H_2S inicialmente presente fora oxidado completamente a H_2SO_4.

A partir de 1 h de reação houve uma redução na absorbância em 620 nm acompanhada por um mesmo perfil de redução de pH, indicando a conversão de enxofre elementar em ácido sulfúrico. Considerando o ácido sulfúrico como espécie responsável pela variação de pH e considerando-o completamente ionizado, a redução do pH inicial para 2,32 ao final de 3 h de reação representou uma conversão de H_2S em H_2SO_4 de aproximadamente $2{,}24.10^{-5}$ mol, equivalendo a 69,1 % da quantidade inicialmente disponível de H_2S. O sistema apresentou absorbância em 620 nm igual a 0,111 ao final de 3 h indicando que não houve consumo total do enxofre formado, permanecendo disperso no sistema. Não foi detectado odor característico do sulfeto de hidrogênio ao final do experimento. Os resultados dos experimentos realizados nos itens 5.10 e 5.11 mostraram que em condições de baixa oxigenação a formação de ácido sulfúrico é limitada, mas não o consumo metabólico de H_2S. Nestas condições prevalece a oxidação incompleta do sulfeto de hidrogênio, com efetiva formação de um produto que pode ser detectado por espectrofotometria, permitindo o desenvolvimento de um biossensor óptico.

5.11 Desenvolvimento do biossensor óptico

A perspectiva de controle do produto metabólico de *A. thiooxidans* em função das condições do sistema reacional, permite o estudo e desenvolvimento de um novo biossensor para H_2S, através de um método de transdução óptico. O método de transdução potenciométrico buscou condições que superassem a limitação de oxigênio e favorecessem a oxidação completa de H_2S. Para o método de transdução óptico, ao contrário, são almejadas as condições de sistema que maximizem a natural formação de enxofre elementar, produto da primeira etapa de oxidação de H_2S.

A formação de enxofre elementar é favorecida pela limitação de oxigênio dissolvido, disponível para a biorreação. O enxofre é insolúvel em água e aparece na forma coloidal, modificando a absorbância do meio reacional e sua formação pode ser detectada pelo método espectrofotométrico.

Experimentos preliminares determinaram o procedimento geral de análise, descrito no item 4.8. A concentração celular e a razão entre a quantidade de células

e H_2S exerceram importante influência na resposta obtida. Há uma limitação no volume que pode ser utilizado na cubeta de quartzo (4 mL) e na absorbância máxima permitida pelo espectrofotômetro. Próximo de absorbância 3,0 há grande oscilação do sinal. Assim, foi definida uma razão 1:1 entre os volumes de suspensão celular e solução de H_2S e uma densidade óptica padrão para a suspensão celular (DO_{620}) igual a 2,0, mantendo assim constante a concentração celular em 2,2 $g.L^{-1}$.

5.11.1 Resposta do biossensor para diferentes concentrações de sulfeto de hidrogênio, à ausência de células e à ausência de H_2S

A caracterização da resposta espectrofotométrica é condição primária para validação do biossensor. Para determinação de sua origem foram realizados experimentos com sistemas ilustrados na Figura 60.

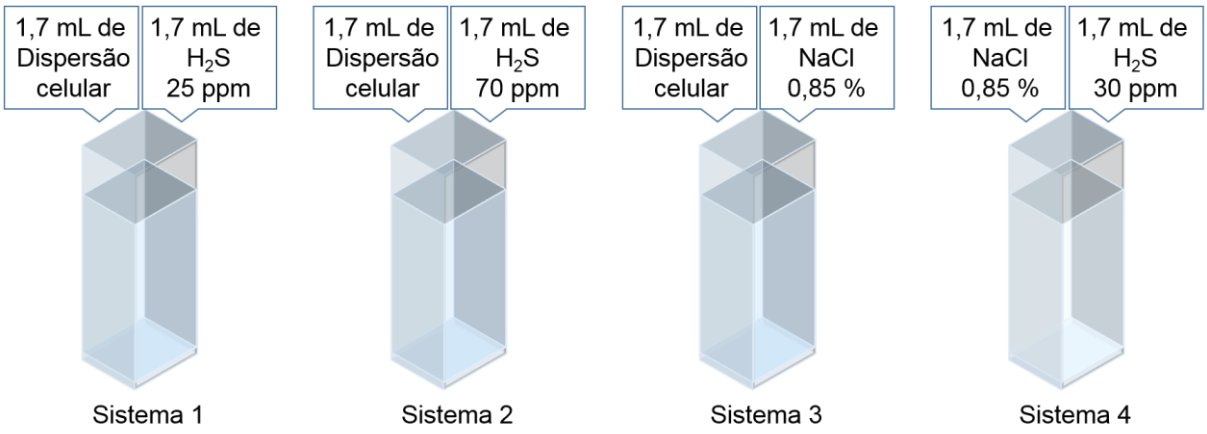


Figura 60 – Representação dos sistemas para avaliação da resposta do biossensor à presença ou ausência de H_2S e suspensão celular.

A leitura espectrofotométrica não pode ser zerada a partir de um ensaio em branco, contendo apenas células. A solução de H_2S é incolor e a diluição decorrente da mistura reacional provoca uma diminuição da absorbância a valores fora da faixa de leitura do equipamento. A formação de enxofre torna-se indetectável. Assim, a

zeragem da leitura espectrofotométrica foi realizada imediatamente após a mistura reacional. A zeragem do equipamento em 620 nm desconta a absorbância relativa à suspensão celular e qualquer aumento de absorbância detectado deve-se a formação de enxofre.

Os resultados obtidos para os sistemas 1 e 2 são representados na Figura 61. A partir destes sistemas é possível observar o perfil de resposta do biossensor para as diferentes concentrações de H_2S.

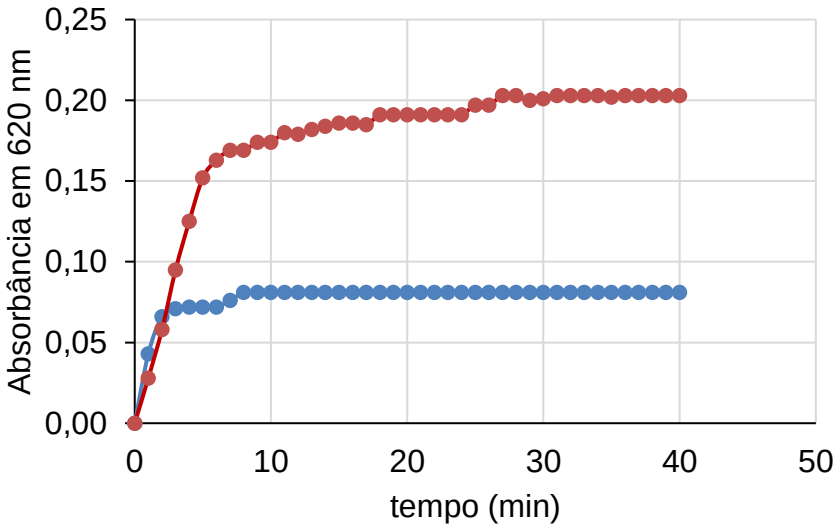


Figura 61 – Resposta do biossensor para misturas de suspensão celular e soluções de H_2S em concentrações 25 $mg.L^{-1}$ (linha azul) e 70 $mg.L^{-1}$ (linha vermelha).

A oxidação biológica do sulfeto de hidrogênio leva apenas alguns segundos (LEE et al, 2006). De fato, o aumento de absorbância foi detectado imediatamente após iniciada a leitura. As respostas para as diferentes concentrações apresentaram um mesmo perfil. Houve um aumento acentuado e linear de absorbância nos primeiros minutos de reação seguido de um patamar indicando a estagnação da reação.

A estabilização do sinal ocorreu em maior valor de absorbância para a maior concentração de H_2S testada, enquanto o tempo para estabilização do sinal foi menor para a menor concentração. Os resultados indicam que o biossensor foi capaz de

diferenciar as soluções dos sistemas 1 e 2, e que houve uma relação direta entre sua resposta e a concentração de H_2S.

O desenvolvimento do biossensor óptico foi baseado na geração de uma resposta espectrofotométrica à formação de enxofre decorrente exclusivamente do consumo de H_2S por *A. thiooxidans*. Assim, outras fontes de origem do sinal foram investigadas. O sistema 3 foi analisado para verificar a resposta do biossensor na ausência de H_2S. Em um sistema contendo apenas células e solução de NaCl o consumo de algum enxofre residual após centrifugação, a precipitação de células ou a excreção de algum produto metabólico poderia gerar variações no sinal observado.

A análise do sistema 4 permitiu avaliar a resposta do biossensor na ausência de células, ou seja, em um sistema contendo apenas H_2S e solução de NaCl. Os íons Na^+ e Cl^- são espécies estáveis, não sendo esperada reação com o sulfeto de hidrogênio. Entretanto, a mudança de pH, a presença de oxigênio dissolvido e a exposição do sistema ao ar durante o experimento podem influenciar a resposta do biossensor. Os resultados obtidos para os sistemas 3 e 4 estão representados na Figura 62.

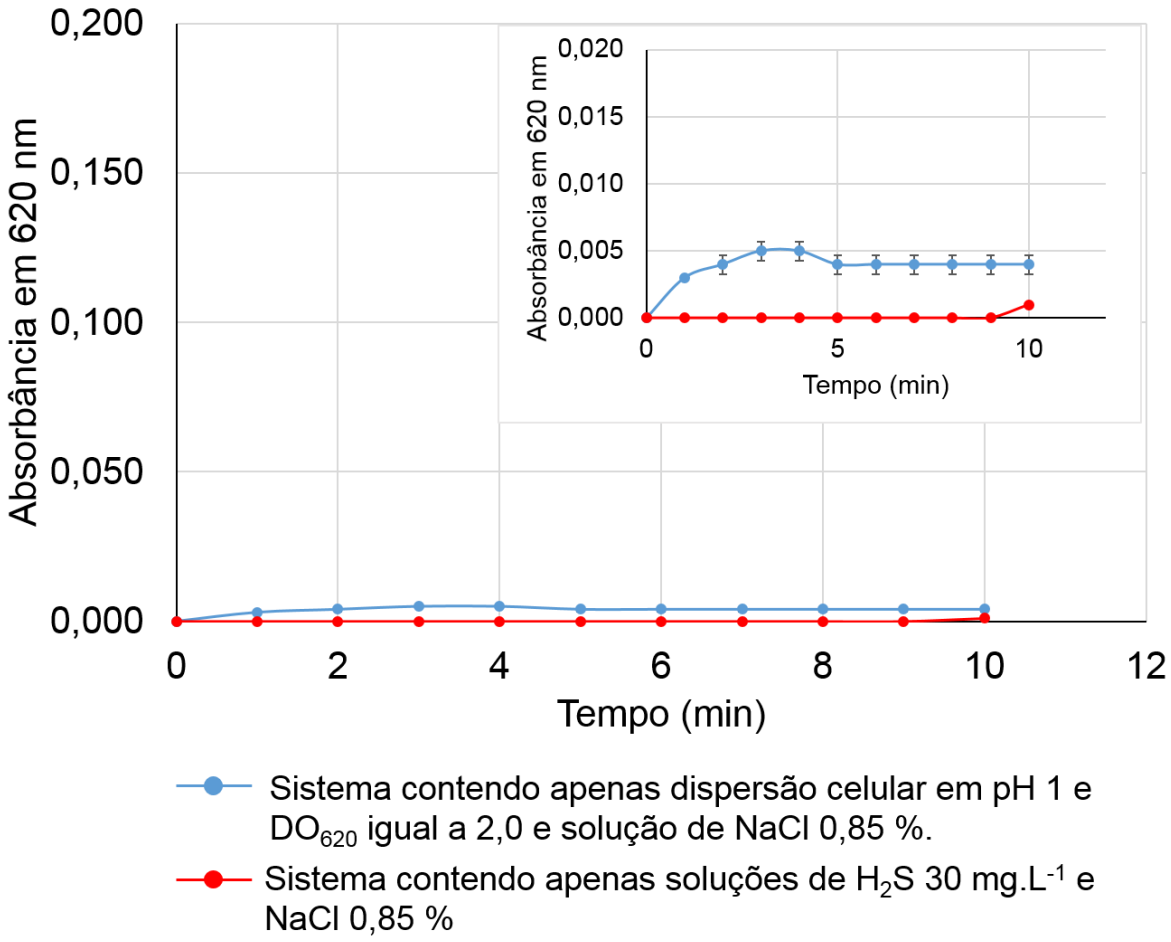


Figura 62 – Ensaios de controle para determinação da origem da resposta do biossensor. As barras de erro representam os desvios padrão (n=2).

Não houve variação de resposta considerável para o sistema 4, havendo um pequeno aumento aos 10 min para 0,001. O resultado indica que a resposta na ausência de células é desprezível. Segundo Chen e Morris (1972), a taxa de oxidação química do sulfeto de hidrogênio em meio alcalino é considerável, mas sua oxidação pelo oxigênio em pH abaixo de 6 é muito lenta. É possível concluir que nas condições do experimento a oxidação química do H_2S foi negligenciável, não afetando a resposta do biossensor. Como resultado do sistema 3 houve um pequeno aumento de absorbância estabilizado em valor médio de 0,005. A resposta correspondeu ao branco reacional utilizado na construção da curva de calibração apresentada no item 5.12.8.

5.11.2 Espectro de absorção das espécies químicas H_2S, $SO_4^=$, $S_2O_3^=$ e NaCl

O aumento de absorbância observado como resposta do biossensor foi atribuído exclusivamente à formação de enxofre elementar na biorreação. Entretanto, outras espécies presentes no início da reação, ou formadas ao longo desta podem apresentar absorbância em 620 nm e contribuir para o sinal observado.

A oxidação biológica de H_2S pode produzir outras espécies sulfuradas além de enxofre elementar, como sulfato e tiossulfato além de outros produtos intermediários de reação como sulfito e tetrationato. Assim, foram obtidos experimentalmente os espectros de absorção de soluções contendo H_2S e NaCl, presentes no início da reação, além das espécies SO_4^{2-} e $S_2O_3^{2-}$, possivelmente formados ao longo da reação. Os resultados são apresentados na Figura 63.

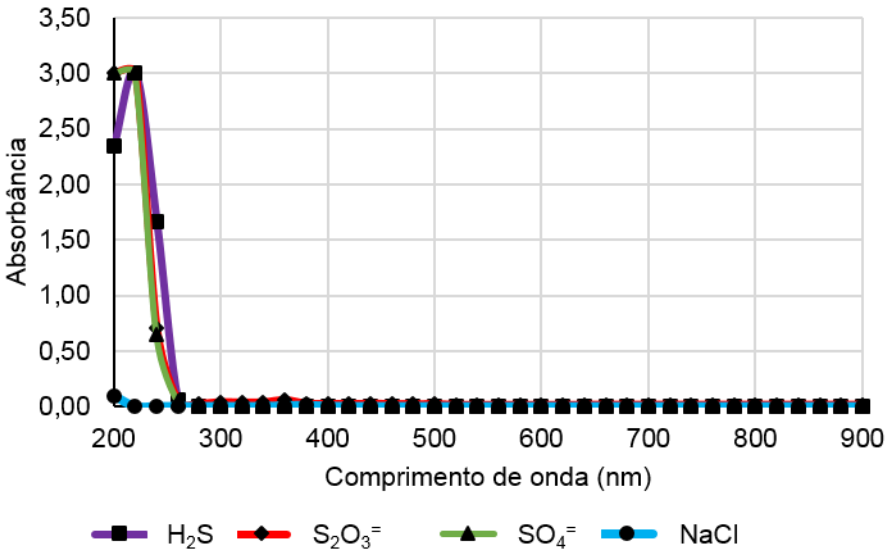


Figura 63 – Espectro de absorção UV-Vis de soluções contendo as espécies químicas H_2S, $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} e NaCl.

Os espectros de absorção do sulfato de sódio e do tiossulfato de sódio se sobrepõem com pico de absorção próximo a 230 nm e nenhuma espécie sulfurada apresentou absorbância em comprimento de onda maior que 400 nm. O cloreto de sódio não absorveu radiação em comprimento de onda maior que 220 nm.

O sulfito de sódio e o tetrationato de sódio apresentam espectros de absorção com perfil semelhante ao encontrado para as espécies sulfuradas testadas, com um máximo de absorbância em região próxima a 200 nm e absorção de radiação desprezível acima de 300nm (PAPPOE; BOTTARO, 2014).

Estes resultados indicam que, exceto pelo enxofre, quaisquer espécies sulfuradas possivelmente formadas são incapazes de influenciar a resposta de absorbância em 620 nm. Assim, qualquer aumento observado neste comprimento de onda é atribuído a formação de enxofre elementar.

5.11.3 Influência do tempo de cultivo celular na resposta espectrofotométrica

O uso de micro-organismos íntegros como biorreceptores em biossensores está suscetível à influência de fatores intrínsecos às condições metabólicas e de crescimento celular. Variáveis como temperatura, condições de aeração e o tempo de vida da célula podem provocar maiores tempos de resposta e afetar significativamente a resposta e a reprodutibilidade dos biossensores celulares, devendo haver um controle cuidadoso das condições de cultivo (BARROCAS et al, 2008).

O crescimento bacteriano avaliado a partir de um cultivo recém-inoculado pode ser dividido em fases, iniciada por uma fase de latência. Caracteriza-se pela síntese de enzimas buscando se adaptar ao novo meio, podendo haver uma alta taxa metabólica mas pouca divisão celular. Este comportamento pode ser observado a partir das curvas de crescimento apresentadas nos itens 5.4 e 5.5. A fase de latência durou cerca de 3 dias. Neste período pH do sistema foi reduzido aproximadamente pela metade, indicando uma alta taxa de oxidação do enxofre, enquanto houve um pequeno aumento de densidade óptica.

Uma alta taxa metabólica é uma característica desejável para o biossensor, uma vez que esta influencia em seu tempo de resposta e, possivelmente, na intensidade do sinal. Entretanto, de forma prática, a fase de latência não é uma fase de crescimento interessante para coleta de bactérias e aplicação no biossensor. Em função do baixo crescimento celular neste período seria necessário um grande volume

de cultivo para obtenção de uma densidade óptica apropriada para aplicação. Para o experimento utilizando cultivos com 4 dias de crescimento, por exemplo, foi obtido um volume de suspensão celular de DO_{620} igual a 2,0 quatro vezes menor que o volume obtido para cultivos com 6 dias de crescimento.

A fase de latência é seguida por uma fase de crescimento exponencial caracterizada pela máxima atividade biossintética e de divisão celular. Neste período há uma alta taxa de formação de células novas e estas apresentam uma alta taxa de oxidação de enxofre e de absorção de CO_2 (VOGLER, 1942).

Os experimentos realizados com células na fase exponencial foram colhidas entre 4 e 9 dias de crescimento, marcando seu início e fim. Os resultados estão representados na Figura 64.

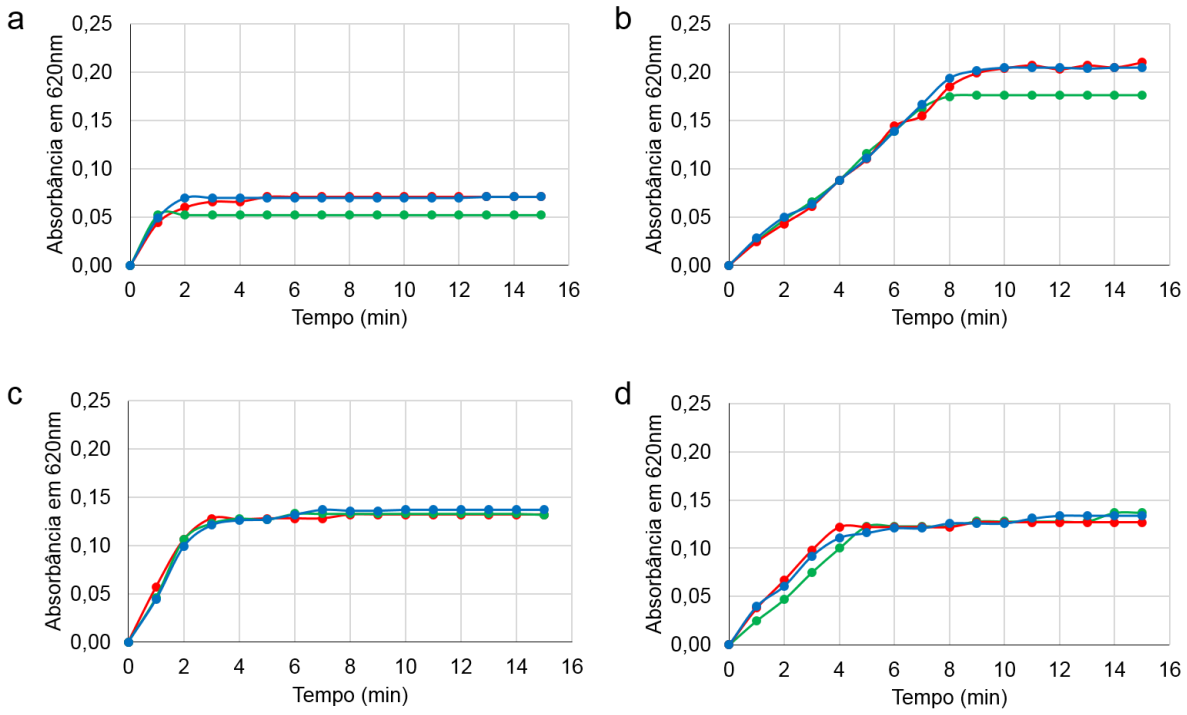


Figura 64 – Resposta do biossensor para soluções de H_2S 50 $mg.L^{-1}$ utilizando cultivos de *A. thiooxidans* com diferentes tempos de crescimento. (a) 4 dias; (b) 6 dias; (c) 7 dias e (d) 9 dias.

O aumento de absorbância observado em todas as curvas de resposta do biossensor na Figura 68 apresenta um mesmo perfil. Entretanto, foram observadas

diferentes taxas iniciais de reação, intensidades máximas e tempos de estabilização do sinal.

Não foi possível afirmar que para o sistema com 6 dias de crescimento (Figura 68b) houve consumo total do sulfeto de hidrogênio, embora não tenha sido observado odor característico de H_2S ao final do experimento. Entretanto, pode-se concluir que a estabilização do sinal não está relacionada ao consumo total do substrato. Neste caso, seriam esperadas diferentes taxas de aumento da absorbância, uma vez que as dispersões obtidas a partir de cultivos com diferentes tempos de crescimento apresentam diferentes características metabólicas, mas alcançariam um patamar em um valor aproximadamente igual de absorbância. Nos gráficos da Figura 68 observa-se uma estabilização do sinal do biossensor em diferentes valores de absorbância indicando que esta se deve não ao consumo total de H_2S, mas à saturação da reação bioquímica.

O gráfico da Figura 65 apresenta a média aritmética dos valores máximos de absorbância obtidos pela análise de soluções de H_2S utilizando sistemas com diferentes tempos de cultivo (absorbância da amostra), incluindo o sistema com células com 11 dias de cultivo. Neste gráfico foi incluída a curva de crescimento para *A. thiooxidans* FG-01. As células deste último sistema encontram-se na fase estacionária de crescimento, caracterizada por uma menor taxa metabólica, em comparação com a fase exponencial, e por uma taxa de crescimento igual a zero. Há um equilíbrio dinâmico entre o número de nascimentos e mortes celulares.

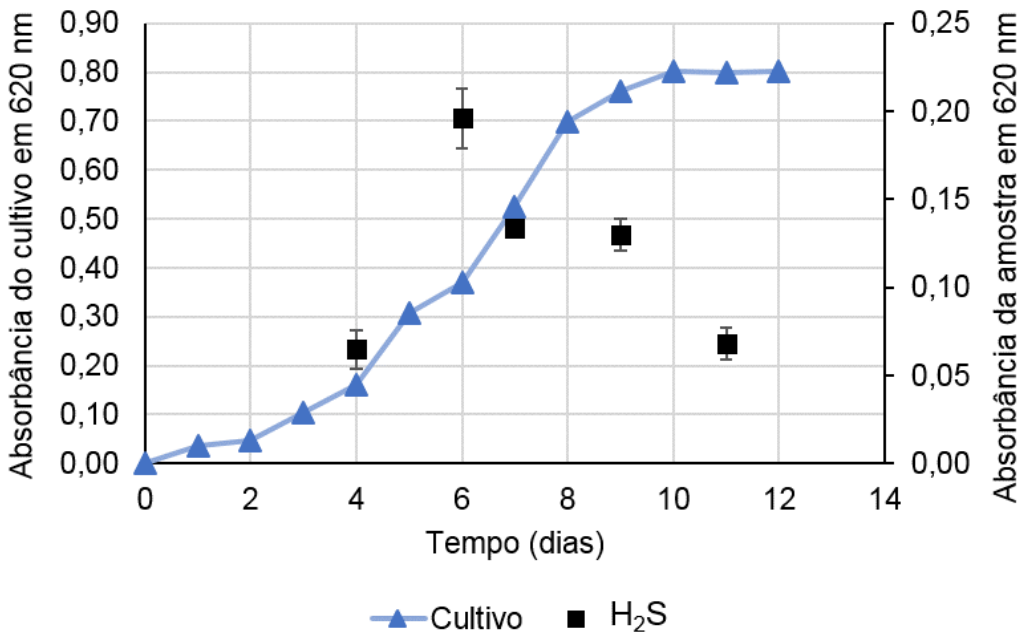


Figura 65 – Curva de crescimento para *A. thiooxidans* e influência do tempo de cultivo na resposta do biossensor para soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} e dispersões celulares de DO_{620} igual a 2,0 e pH 2. As barras de erro representam os desvios padrão correspondentes.

Uma vez que as dispersões celulares utilizadas apresentavam densidade óptica e volumes iguais, a quantidade de células nos sistemas eram aproximadamente as mesmas. Entretanto, a quantidade de células viáveis e saudáveis eram diferentes. O sistema com 4 dias de cultivo encontrava-se no final da fase de adaptação e no início da fase exponencial. Embora a densidade óptica tenha sido ajustada por centrifugação e ressuspensão, havia provavelmente uma alta proporção de células inviáveis ou com baixa atividade, provenientes do inóculo. Como resultado, houve um rápido aumento de absorbância seguido de uma estabilização do sinal após 2 min em absorbância próxima a 0,065.

A partir de 6 dias de cultivo as células se aproximam do fim da fase exponencial, havendo uma redução da taxa metabólica, e alcançam a fase estacionária. Há o acúmulo de metabólitos como sulfato, ceto-ácidos e piruvato que acumulam no interior da célula e afetam o metabolismo (AMEMIYA, 1974), perdendo gradativamente a capacidade de duplicação celular. É importante observar que as células não foram submetidas a um período de estarvação. Estas foram retiradas de um meio rico em

nutrientes, uma vez que ainda havia nos frascos de crescimento enxofre elementar disperso. A quantidade de células era semelhante entre os sistemas, mas com uma taxa metabólica menor do conjunto de células e uma menor demanda por nutrientes, houve uma saturação da reação bioquímica, refletindo em uma redução do valor máximo de absorbância entre 6 e 11 dias de cultivo.

As células com 6 dias de crescimento encontram-se no meio da fase exponencial de crescimento (Figura 65). Nesta fase de crescimento a taxa metabólica e de consumo de nutrientes alcança sua velocidade máxima (HECKER; VOLKER, 2001). A maior multiplicação celular acarreta um maior número de células viáveis e com alta atividade metabólica, sendo a estabilização do sinal alcançada no maior valor de absorbância. Embora demande um tempo maior para estabilização do sinal (Figura 64b), uma maior absorbância máxima favorece uma maior sensibilidade do biossensor, de forma que os experimentos subsequentes foram realizados a partir de cultivos celulares com 6 dias de crescimento.

5.11.4 Influência da variação de pH na resposta espectrofotométrica

Os estudos preliminares de consumo de H_2S por *A. thiooxidans* evidenciaram um comportamento metabólico dependente do pH. Em função do caráter acidófilo do micro-organismo os testes com o biossensor foram realizados em meio ácido. As análises com dispersões celulares que alcançavam pH básico durante a etapa de ajuste de pH, mesmo momentaneamente, apresentaram resposta desprezível ou bastante abaixo do valor esperado. Na Figura 66 estão representados os resultados de experimentos realizados com suspensão celular de concentração 2,2 $g.L^{-1}$ na análise de solução de H_2S de concentração 50 $mg.L^{-1}$. A curva “A” representa o a resposta do biossensor para a análise realizada imediatamente após o ajuste do pH da suspensão de 1 para 3. Houve um aumento rápido da absorbância seguido de uma redução gradativa até a estabilização em 0,029. O valor é cerca de 5 vezes menor que o esperado para esta concentração de H_2S.

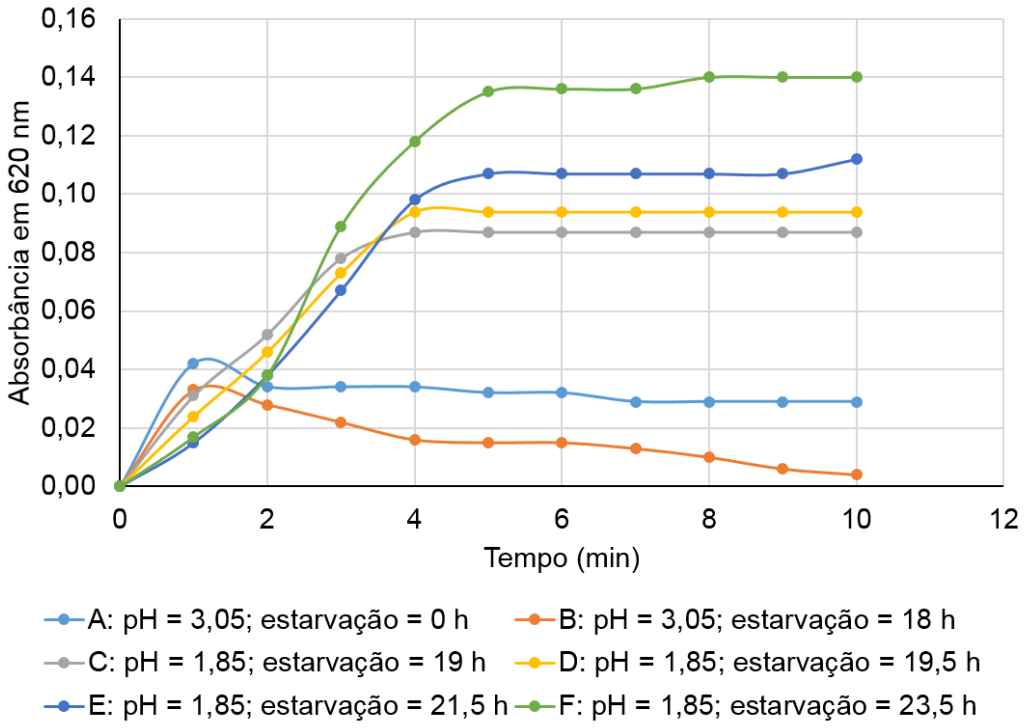


Figura 66 – Influência da redução do valor de pH de 3,05 para 1,85 na resposta espectrofotométrica de suspensão celular submetida a estarvação. Suspensão celular 2,2 $g.L^{-1}$ e solução de H_2S 50 $mg.L^{-1}$.

A suspensão celular restante (cerca de 30 mL) foi armazenada em tubo falcon de 50 mL, fechado com tampa de rosca e guardado em temperatura ambiente por 18h, sendo então realizada uma nova análise cujo resultado é representado na curva “B”. O perfil desta curva apresentou um padrão diferente do obtido em outras análises. O baixo sinal obtido indicou que o sistema celular encontrava-se em uma nova condição metabólica. As células entraram, possivelmente, em estado de latência para auto preservação ou sofreram danos metabólicos provocados pela falta de nutrientes, pela nova condição de pH ou por efeito de ambos.

Após a análise, o pH deste sistema foi ajustado em 1,85 e o sistema foi mantido em repouso por cerca de 0,5h, até a próxima análise representada pela curva “C”. O perfil padrão de aumento de absorbância foi recuperado, estabilizando em 0,087. Novas medidas foram realizadas após períodos de repouso em pH 1,85. Os resultados são representados pelas curvas “D”, “E” e “F”. Houve um aumento do valor máximo de absorbância após o ajuste de pH para 1,85. O aumento gradativo indicou que foi necessário um período de adaptação à nova condição de acidez e que a variação do

pH exerceu uma forte influência na condição metabólica celular. Mesmo após um período de estarvação de quase 24 h foi alcançado um valor máximo de absorbância compatível com o obtido para células com seis dias de cultivo e que não foram submetidas ao período de estarvação.

Embora o consumo de H_2S por *A. thiooxidans* possa ser simplificadamente representado por uma equação de reação química, seu metabolismo é formado por complexos processos bioquímicos dependentes do pH interno e externo. O sulfeto de hidrogênio é transportado para o espaço periplasmático e convertido a persulfeto de hidrogênio (H_2S_2) pela enzima sulfeto:quinona oxidoredutase (SQR), localizada na superfície periplasmática da membrana citoplásmica (YIN et al, 2014). Após uma sequência de reações de desproporcionamento a partir dos ânions dissulfeto e trissulfeto longas cadeias de polissulfeto ($H\text{-}S_n^-$) são formadas (GRIESBECK et al, 2002). Entretanto, os polissulfetos não são estáveis nas condições ácidas do periplasma e se decompõem para formar enxofre (S_8) e sulfeto. As moléculas de enxofre reagem formando ligações de persulfeto com grupos mercaptana de resíduos de cisteína em proteínas integrais da membrana celular e são transportadas para o exterior da célula (ROHWERDER; SAND, 2003).

As Alterações no pH externo exercem influência no metabolismo celular e, consequentemente, no consumo de sulfeto de hidrogênio e na resposta do biossensor. Este efeito foi estudado a partir da análise de soluções de sulfeto de hidrogênio em concentração de 30 $mg.L^{-1}$ mantendo constante a concentração celular. Os resultados são apresentados na Figura 67.

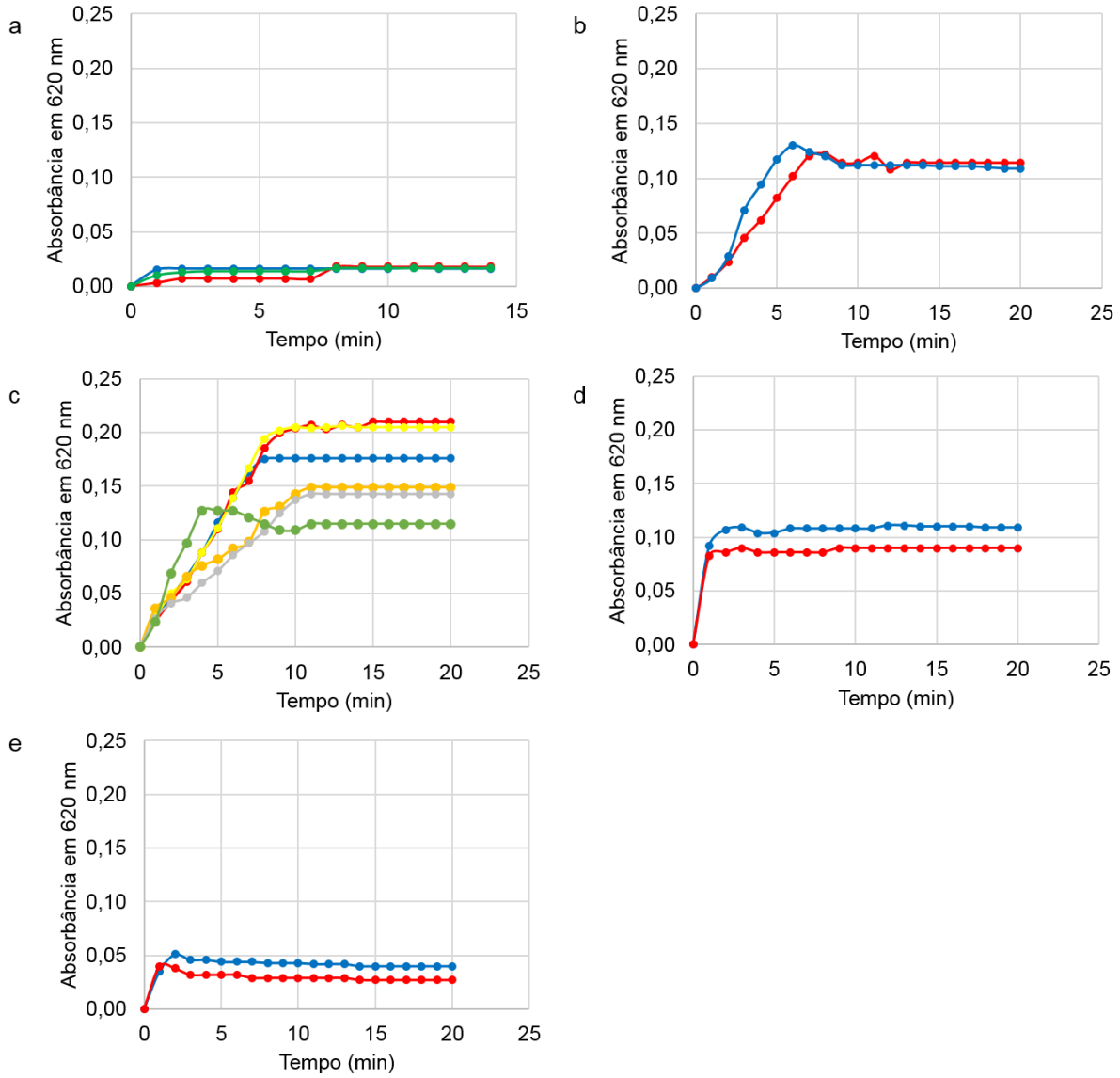


Figura 67 – Influência da variação de pH no perfil de aumento de absorbância em 620 nm para análise de soluções de H_2S 30 mg.L^{-1} a partir de dispersões celulares de concentração 2,2 g.L^{-1}. As curvas de cada gráfico são repetições em mesmas condições. Gráficos: a, pH = 0,5; b, pH = 1,0; c: pH = 2,0; d, pH = 3,0; e, pH = 4,0.

Os resultados mostraram um mesmo perfil de crescimento da absorbância em 620nm. Entretanto, o tempo de estabilização do sinal e o valor máximo de absorbância mostraram dependência em relação ao pH, indicando que o nível de acidez do sistema teve forte influência no metabolismo celular. Para bactérias acidófilas o meio extracelular e o periplasma estão normalmente em cerca de pH 2, enquanto o pH citosólico está próximo da neutralidade (ROHWERDER; SAND, 2003). A homeostase do meio intracelular contra este gradiente de pH acentuado ocorre pela geração de

um alto potencial de membrana (positivo no interior da célula) para prevenir a entrada de íons H^+ (SUZUKI et al, 1999). Os íons H^+ gerados a partir da oxidação de compostos sulfurados são liberados para fora da célula ou consumidos pela enzima citocromo oxidase, entre outros processos envolvendo enzimas oxidativas solúveis e cadeias respiratórias próximas à membrana (COBLEY; COX, 1983).

Bactérias da espécie *A. thiooxidans* são resistentes a pH tão baixo quanto 0,2 (LEE et al, 2006), e podem ser cultivadas em pH até 5, enquanto são capazes de oxidar enxofre em uma ampla faixa de pH entre 1 e 9 (SUZUKI et al, 1999). Entretanto, as maiores respostas do biossensor foram obtidas em pH 2, indicando que o processo de oxidação biológica de sulfeto é favorecido por baixos valores de pH (GABRIEL; DESHUSSES, 2003).

Os trabalhos encontrados na literatura que abordam a influência do pH no metabolismo de *A. thiooxidans* não utilizaram sulfeto de hidrogênio como fonte de energia, mas enxofre ou tiossulfato. Entretanto, os resultados deste experimento podem ser comparados observando a taxa de oxidação de sulfeto e a eficiência de biofiltros desenvolvidos para remoção de H_2S. Alguns destes resultados são apresentados no Quadro 5, destacando a cepa empregada e o pH de maior eficiência do biofiltro.

Quadro 5 – Eficiência e pH ótimo de operação de biofiltros para remoção de H_2S empregando bactérias *A. thiooxidans*.

Cepa	**pH**	**TOS ($g.m^{-3}.h^{-1}$)**	**Eficiência (%)**	**Concentração (ppm)**	**Fonte**
DSM	2,0	130	97	10000	AITA et al, 2016
AZ11	1,5	428	99,9	2200	LEE et al, 2006
KS1	2,5	54,06**	99	8,93*	SHINABE et al, 1995
ATCC 19377	1,8-2,5	370	100	4600	AROCA et al, 2007
N.E.	2,0	150,3	97,3	6000	CHARNNOK et al, 2012
N.E.	1,0-2,0	181	94	87	DUAN et al, 2006

TOS: Taxa de oxidação de sulfeto.

N.E.: cepa não especificada pelo autor.

*: Biofiltro para remoção de H_2S de meio líquido. Concentração em $\mu mol.L^{-1}$.

**: Taxa de remoção de H_2S convertida de $mmol.m^{-3}.min^{-1}$.

O Quadro 5 apresenta uma faixa de valores ótimos de pH para eliminação de H_2S entre pH 1 e 2,5, concordando com os resultados obtidos com o biossensor. Eficiências próximas a 100 % foram obtidas mesmo para altas concentrações de H_2S. Lee et al. (2006) relatam um tempo de residência de 6s para eliminação de H_2S, limitado não pela atividade do micro-organismo, mas pela difusão do H_2S da fase gasosa para a fase líquida.

Embora os maiores valores de resultado do biossensor tenham sido alcançados em pH 2 houve dificuldade de reprodutibilidade do valor máximo de absorbância neste pH. Os cultivos de *A. thiooxidans* crescidos por 6 dias apresentaram comumente pH próximo a 0,5. Após o processo de remoção das células do meio de cultivo por centrifugação e ressuspensão em cerca de 20 mL de solução salina normal o pH da suspensão celular era aumentado para cerca de 1. Os sistemas celulares mostraram-se sensíveis à variação de acidez provocada pelo ajuste de pH. Não foi realizado um estudo sistemático da influência o tempo de adaptação celular na resposta do biossensor. Entretanto, foi observado que quanto maior a variação de pH, maior o tempo necessário para adaptação ao novo pH.

Nos testes preliminares de resposta do biossensor em pH 3 foi comum a obtenção de resultados desprezíveis ou bastante abaixo do esperado utilizando dispersões celulares com pH recém ajustado. Os resultados apresentados em pH 2 indicam que houve dificuldade de reprodutibilidade de resposta utilizando dispersões celulares com diferentes tempos entre o ajuste de pH e sua utilização no biossensor, apresentando um coeficiente de variação de 0,232.

Houve uma forte redução da absorbância máxima em pH 0,5. Kempner (1966) descreveu este nível de acidez como não deletério para as células de *A. thiooxidans,* embora a atividade celular seja reduzida em pH abaixo de 0,9. Segundo Feng et al. (2015) uma redução de pH extracelular de 1,2 para 0,4 provoca uma redução na taxa de oxidação de enxofre de 48,2 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ para 16,1 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ em bactérias *A. thiooxidans* ZJJN-3 e um aumento de consumo de energia para manutenção do pH intracelular. Nestas condições hostis de sobrevivência apenas as funções fisiológicas básicas são mantidas (SLONCZEWSKI et al, 2009).

A resposta do biossensor reduziu em pH 4,0 em relação às obtidas em pH 1,0, 2,0 e 3,0 uma vez que o primeiro se encontra fora da faixa ótima de pH para seu metabolismo (ISLANDER et al, 1991). As análises em pH 1,0 evidenciaram máximos de absorbância em valores mais próximos entre si, e foi necessário um menor tempo de adaptação dos micro-organismos neste pH em função de sua proximidade com o obtido na ressuspensão celular. Estes resultados foram evidenciados também nos ensaios preliminares e nos testes de repetitividade do biossensor. Houve também uma

diminuição do tempo de ajuste de pH, que é realizado concomitantemente ao ajuste de densidade óptica celular. Assim, os ensaios subsequentes de caracterização da resposta do biossensor foram realizados em pH 1,0.

5.11.5 Repetitividade da resposta espectrofotométrica

A repetitividade e a reprodutibilidade são parâmetros fundamentais de caracterização de um instrumento de medida. Neste estudo, o primeiro representa a capacidade do biossensor de retornar sinais de resposta com a menor variabilidade em medições sucessivas, nas mesmas condições operacionais e de sistema.

A repetitividade foi avaliada a partir de 13 medidas sucessivas de uma mesma solução de sulfeto de hidrogênio e a partir da mesma suspensão celular. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Resultados de absorbância para 13 medições sucessivas utilizando o biossensor óptico com dispersões celulares em pH 1 e de concentração 2,2 $g.L^{-1}$.

Medição	Absorbância em 620 nm	Medição	Absorbância em 620 nm
1	0,131	8	0,114
2	0,110	9	0,110
3	0,118	10	0,103
4	0,110	11	0,113
5	0,110	12	0,114
6	0,110	13	0,114
7	0,100		
Média		0,112	
Desvio padrão		0,00738	
Desvio padrão relativo (%)		6,59	

Os resultados indicaram uma boa repetitividade da resposta espectrofotométrica, com um desvio padrão relativo (DPR) de 6,59 %. Entretanto, o resultado da primeira análise é cerca de 17 % acima do valor da média, sendo aparentemente discrepante dos demais. Para avaliar o resultado desta análise em relação ao conjunto da população foi realizado um teste score-Z ou escore padronizado. O valor de Z-score é calculado pela diferença de um resultado e a média amostral dividido pelo desvio padrão da amostra. A Figura 68 representa graficamente as distâncias entre as medidas e a média da amostra e seus respectivos valores de Z-score.

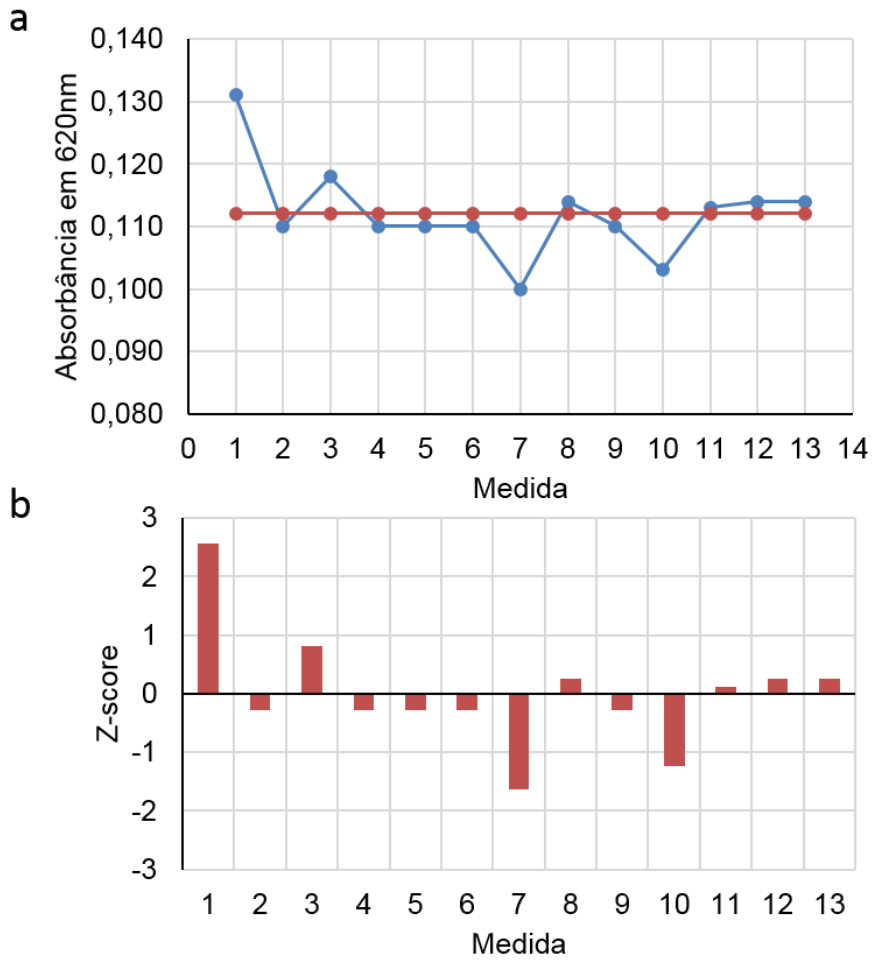


Figura 68 – Análise gráfica dos resultados obtidos para repetitividade de respostas do biossensor óptico. Gráfico a: distância entre os valores de absorbância de cada análise (azul) e a média amostral (vermelho); Gráfico B: valor de Z-score para cada análise.

O valor de Z-score representa uma medida relativa da distância de um resultado em relação a um valor de referência ou à média de uma amostra ou população em termos de desvios padrão. Um índice de Z-score até 2 para um resultado é considerável satisfatório, entre 2 e 3 é considerado um resultado questionável e um valor maior ou igual a 3 indica que a resposta está a 3 ou mais desvios padrão em relação à média e representa um resultado insatisfatório (INMETRO, 2011).

Os resultados indicaram que 10 dos resultados obtidos estão a menos de um desvio padrão em relação à média. Foi obtido um valor de Z-score igual a 2,56 para a primeira análise, indicando um resultado questionável.

Para verificar se a primeira análise deve ser excluída do conjunto foi realizado o Teste Tau Modificado de Thompson, que pode ser aplicado para identificação de *outliers* ponto a ponto (VIEIRA et al, 2015). O teste consiste em calcular a diferença absoluta entre a resposta de uma análise e a média amostral (Δ) e compará-lo ao produto entre o valor de Tau (τ) e o desvio padrão (s). O valor de Tau é derivado do valor t de Student. É dependente do tamanho da amostra e pode ser obtido através de uma Tabela de Thompson Modificada. Para uma amostra com 13 medidas o valor tabelado de τ para um intervalo de confiança de 95 % (α = 0,05) é 1,8403. Uma observação é considerada um *outlier* através deste método quando $\Delta > \tau \cdot s$. Os parâmetros e o resultado da análise de *outlier* para a primeira medida com o biossensor são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 – Análise de possível *outlier* através do Teste Tau Modificado de Thompson.

Resposta	Média	Valor de Delta (Δ)	Desvio padrão (s)	Valor de Tau (τ)	Valor do Produto $\tau \cdot s$	Conclusão
0,131	0,112	**0,019**	0,0073	1,8403	**0,013**	$\Delta > \tau \cdot s$ **outlier**

Os valores dos resultados apresentados na Tabela 25 indicam que o resultado da primeira medida pode ser considerado um *outlier* e deve ser retirado do conjunto de respostas para evitar uma análise tendenciosa dos parâmetros de repetitividade do biossensor. Uma possível causa da discrepância entre a primeira medida e as demais é a ausência do período de adaptação às novas condições de acidez após ajuste de pH discutidas no item 5.12.4. A influência deste fator, embora evidenciada, necessita de um conjunto maior de medidas para sua avaliação. Assim, sua discussão foi retomada na análise de reprodutibilidade. Desconsiderando o resultado da primeira análise na avaliação da repetitividade houve uma redução do desvio padrão de 0,0073 para 0,0049 e uma redução do desvio padrão relativo (DPR) para 4,46 %.

5.11.6 Reprodutibilidade da resposta espectrofotométrica

A reprodutibilidade é uma medida da suspensão em uma série de observações ou resultados realizados ao longo de um período de tempo. Geralmente, é determinado para a concentração do analito dentro de uma faixa de concentração determinada (TRIVEDI et al, 2009). Tipicamente, um ou mais dos itens a seguir são variados em um estudo de reprodutibilidade: instrumento, analista, laboratório ou dia (APHA, 2005).

A reprodutibilidade do biossensor foi avaliada através de medidas de suspensão da resposta espectrofotométrica para determinações de soluções de H_2S nas mesmas condições experimentais, mas realizadas em dias diferentes e utilizando dispersões celulares obtidas de cultivos originais diferentes. Os resultados são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 – Resposta do biossensor óptico para soluções de H_2S de concentração 30 mg.L^{-1} em pH 1 e concentração celular 2,2 g.L^{-1} obtidos em diferentes dias.

	dia			
Medida	1	2	3	4
1	0,115	0,115	0,101	0,105
2	0,099	0,105	0,108	0,100
3	0,103	0,096	0,102	0,101
4	0,093	0,097	0,106	0,104
5	0,097	0,101	0,108	0,098
6	0,103			

Os resultados obtidos para os experimentos realizados no estudo da repetitividade do biossensor, evidenciaram a necessidade de um período de adaptação celular às novas condições de acidez após ressuspensão e ajuste do pH. O valor encontrado para a primeira medida foi destoante dos demais, sendo considerado um *outlier*. O mesmo comportamento foi observado nos resultados obtidos nos experimentos dos dias 1 e 2 de análise, que foram iniciados imediatamente após o ajuste de pH. Os resultados são aparentemente anômalos, de forma que as primeiras medidas de cada dia foram avaliadas pelo Teste Tau Modificado de Thompson para identificação de *outliers*. Os resultados apresentados na Tabela 27 determinam que os valores obtidos para a primeira medida são realmente *outliers* e devem ser removidos pois a média e o desvio padrão são fortemente impactados pela presença de *outliers* (LEYS et al, 2013).

Tabela 27 – Análise da existência de *outliers* para as medidas de reprodutibilidade.

Dia	Resposta	Média	Valor de Delta (Δ)	Desvio padrão (s)	Valor de Tau (τ)	Valor do Produto τ . s	Conclusão
1	0,115	0,102	**0,0133**	0,0075	1,6563	**0,0125**	Δ > τ . s **outlier**
2	0,115	0,103	**0,0122**	0,0077	1,5712	**0,0121**	Δ > τ . s **outlier**
3	0,101	0,105	**0,0040**	0,0033	1,5712	**0,0052**	Δ < τ . s **não outlier**
4	0,105	0,102	**0,0034**	0,0029	1,5712	**0,0045**	Δ < τ . s **não outlier**

Os resultados desconsiderando os *outliers* estão graficamente representados na Figura 69. Houve uma baixa variabilidade das respostas obtidas em cada dia de análise, com um desvio padrão relativo variando entre 2,8 % e 4,3 %. Considerando as respostas obtidas entre os diferentes dias foi verificada uma média de absorbância em 620 nm igual a 0,102 ± 0,003, com um desvio padrão relativo entre as médias dos diferentes dias de análise de 2,61 %.

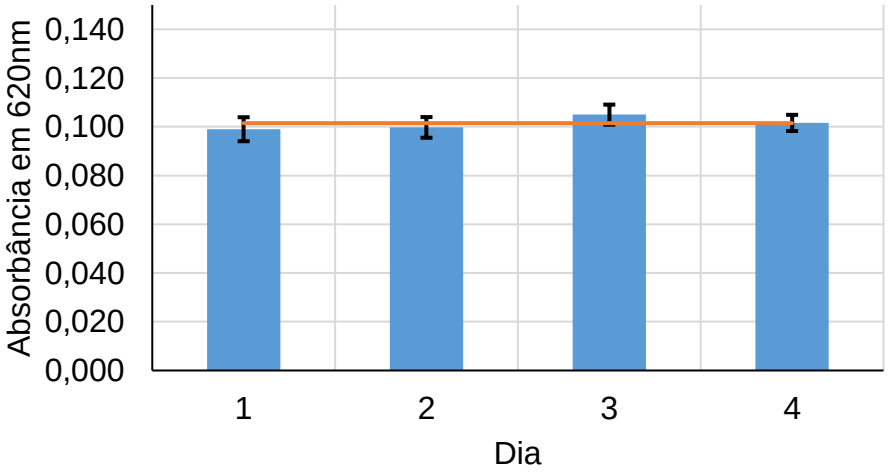


Figura 69 – Avaliação da reprodutibilidade do biossensor óptico. As barras azuis representam os valores médios de resposta obtidos em cada dia de análise. As barras verticais são o desvio padrão das respostas em cada dia. A linha horizontal representa a média de resposta entre os diferentes dias de análise.

5.11.7 Influência da concentração de H_2S na resposta espectrofotométrica

Os resultados de caracterização do biossensor quanto à repetitividade e reprodutibilidade evidenciaram a necessidade de um tempo de adaptação às novas condições de pH. Assim, os experimentos utilizando soluções de H_2S em diferentes concentrações foram realizados após uma hora do ajuste de pH e da densidade óptica, sendo as dispersões celulares mantidas em frascos Falcon abertos.

Os experimentos foram realizados com células obtidas de um mesmo cultivo, exceto para as soluções de concentração 30 e 70 $mg.L^{-1}$, que foram obtidas de dois cultivos para cada concentração, em dias diferentes, para avaliar a reprodutibilidade nas condições do experimento.

Foram realizados brancos reacionais para avaliar o limite de detecção e o limite de quantificação do biossensor. As soluções de H_2S foram analisadas nas concentrações 5, 10, 15, 25, 30, 50, 70 e 100 $mg.L^{-1}$. Os resultados obtidos para o branco e para concentrações até 10 $mg.L^{-1}$ estão representados na Figura 70.

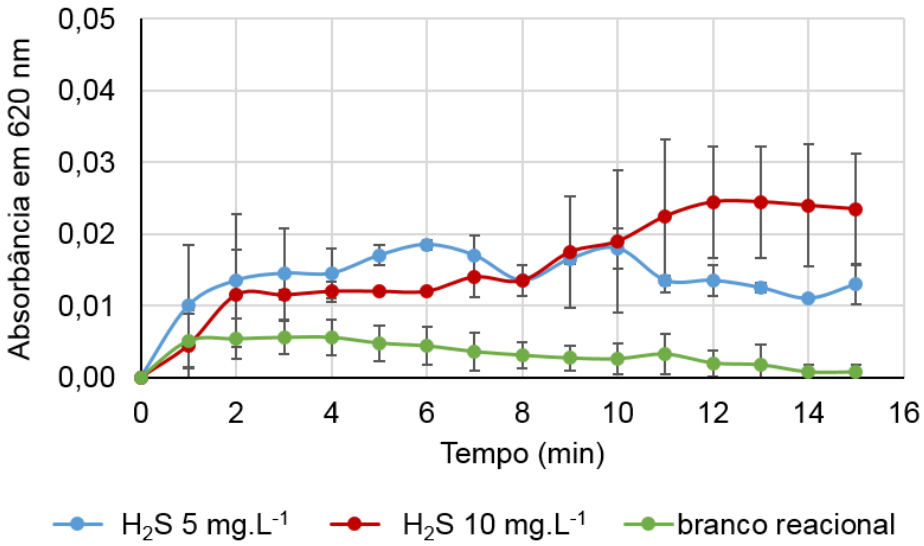


Figura 70 – Resposta do biossensor óptico para concentrações de H_2S até 10 $mg.L^{-1}$. As barras verticais representam o desvios padrão para medidas na ausência de H_2S (n=10) e para soluções de H_2S de concentração 5 $mg.L^{-1}$ e 10 $mg.L^{-1}$ realizadas em duplicata.

A medida espectrofotométrica foi zerada imediatamente após a adição da solução analisada. Para os ensaios em branco, a turbulência momentânea gerada promove uma pequena oscilação no sinal, entre 0,004 e 0,008, que diminui ao longo do tempo. A resposta para os brancos reacionais é visualmente distinguível, na Figura 74, das respostas obtidas para soluções contendo H_2S. Entretanto, as baixas concentrações e a perda de H_2S por volatilização tornam os resultados quase indistinguíveis para as concentrações de 5 $mg.L^{-1}$ e 10 $mg.L^{-1}$. Foram observadas oscilações no sinal ao longo do tempo, havendo uma resposta ligeiramente superior para a maior concentração.

Buscando uma maior resolução da resposta nos primeiros minutos de reação os experimentos com soluções de H_2S 5 $mg.L^{-1}$ e 10 $mg.L^{-1}$ foram realizados com uma taxa de obtenção de sinal de 5s. Os resultados são apresentados na Figura 71. Ambas as concentrações apresentaram um perfil semelhante, com um rápido aumento seguido de uma estabilização do sinal. Entretanto, os valores em estado estacionário foram muito próximos e as respostas apresentaram uma alta variabilidade, sendo impossível distingui-las neste nível de concentração.

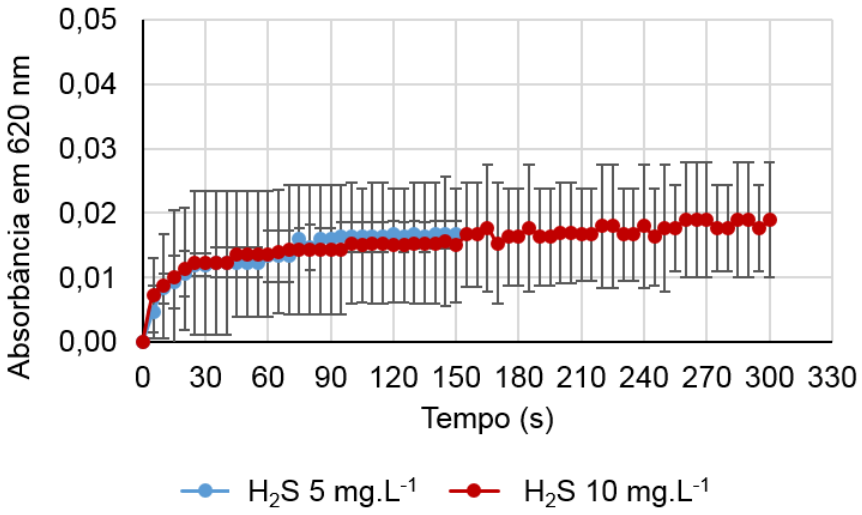


Figura 71 – Resposta do biossensor óptico para concentrações de H_2S 5 $mg.L^{-1}$ e 10 $mg.L^{-1}$ com taxa de aquisição de sinal igual a 5 s. As barras verticais representam os desvios padrão para triplicatas de cada concentração.

Os resultados para concentrações de sulfeto de hidrogênio entre 15 mg.L^{-1} e 100 mg.L^{-1} são graficamente representados na Figura 72. As escalas nos eixos das ordenadas foram ajustadas diferentemente em cada gráfico para melhor visualização das diferenças entre os resultados para cada nível de concentração.

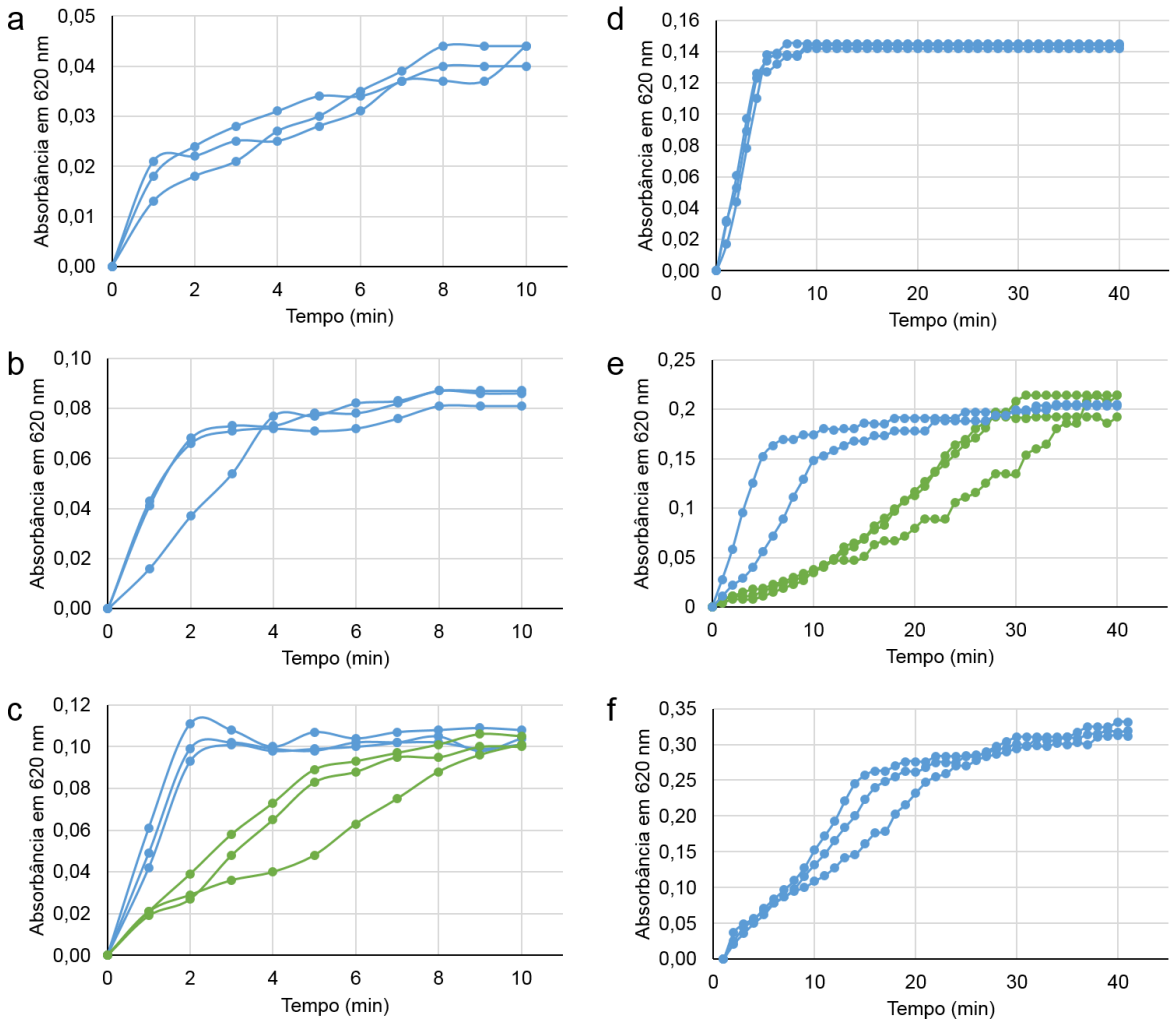


Figura 72 – Respostas do biossensor óptico para diferentes concentrações de H_2S obtidas a partir de dispersões celulares em pH 1 e concentração 0,22 g.L^{-1}. Gráficos: a, 15 mg.L^{-1}; b, 25 mg.L^{-1}; c, 30 mg.L^{-1}, d, 50 mg.L^{-1}; e, 70 mg.L^{-1}; f, 100 mg.L^{-1}. Cores diferentes representam nos gráficos medidas obtidas em dias diferentes.

Os resultados da Figura 72 indicaram um perfil de aumento de absorbância semelhante, com estabilização do sinal em tempos variados em função do nível de concentração de H_2S. Para a concentração de 50 $mg.L^{-1}$ de H_2S houve praticamente uma sobreposição das curvas obtidas em triplicata, indicando uma forte repetitividade dos dados ao longo do tempo. Entretanto, como perfil geral de resposta foi observada uma variabilidade de respostas nos primeiros minutos de reação, observada especialmente nas análises realizadas a partir de cultivos diferentes.

Tomando como exemplo a concentração de 30 $mg.L^{-1}$, podem ser observados dois padrões de aumento de absorbância para os diferentes cultivos utilizados, com diferentes taxas de aumento de absorbância. Na Tabela 28 estão representadas as respostas em 5, 8 e 10 minutos de reação para as seis análises realizadas.

Tabela 28 - Respostas do biossensor para concentração de H_2S 30 $mg.L^{-1}$ em diferentes tempos de reação para cultivos diferentes utilizados em dois dias de análise.

Tempo (min)	**Absorbância em 620 nm no primeiro dia de análise**			**Absorbância em 620 nm no segundo dia de análise**			**Média**	**Desvio padrão**	**Desvio padrão relativo (%)**
5	0,100	0,103	0,99	0,093	0,080	0,048	0,087	0,021	23,9
8	0,102	0,105	0,104	0,101	0,095	0,088	0,099	0,006	6,5
10	0,101	0,108	0,106	0,105	0,100	0,101	0,104	0,003	3,2

Aos 5 minutos de reação houve uma alta variabilidade da resposta espectrofotométrica especialmente para análises realizadas em dias diferentes, com um desvio padrão relativo para as seis análises de aproximadamente 24 %. A heterogeneidade de respostas é possivelmente dependente da adaptabilidade da condição metabólica às novas condições ambientais, como nível de saturação de oxigênio, força iônica e pressão osmótica do meio, mudança de pH e do tipo de nutriente, uma vez que estas estavam adaptadas ao enxofre como fonte de energia durante o cultivo.

Aos 10 minutos de reação os valores de absorbância se aproximam alcançando um valor médio 0,104. O desvio padrão para as seis medidas foi 0,003 e um desvio padrão relativo (DPR) de 3,2 % indicam uma boa precisão e reprodutibilidade do biossensor avaliado neste tempo de reação.

Análise semelhante pode ser realizada para a concentração de 70 $mg.L^{-1}$. Houve uma grande variabilidade de resposta nos primeiros minutos de reação especialmente percebidos ao comparar os resultados obtidos em dias diferentes. Entretanto, ao final da reação estes são aproximados, obtendo-se aos 40 minutos uma média de absorbância 0,206 com DPR igual a 4,44 %.

Para melhor observação da influência da concentração de H_2S na resposta do biossensor os resultados para as diferentes concentrações são apresentados em função de suas médias na Figura 73 e agrupados conforme o tempo de resposta.

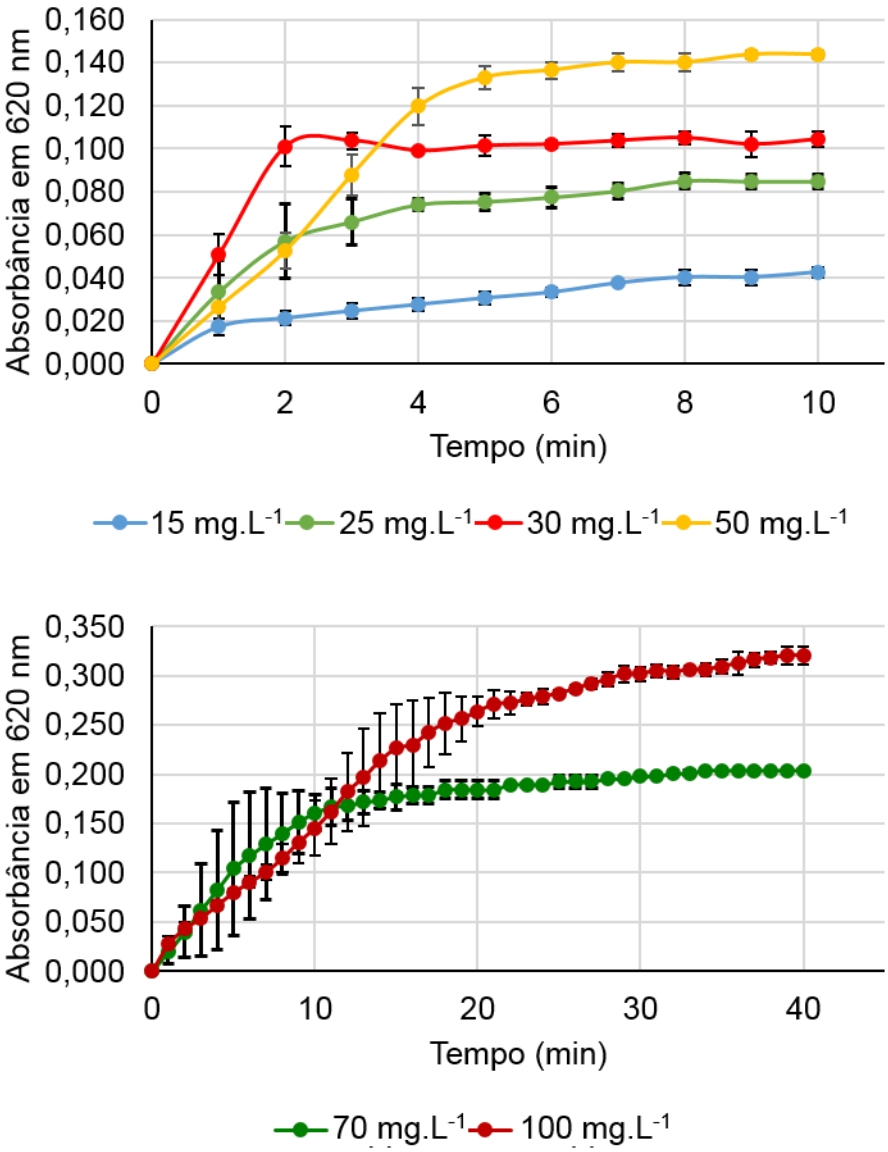


Figura 73 – Resposta do biossensor para diferentes concentrações de H_2S agrupados em função do tempo de resposta. As barras verticais representam os desvios padrão para cada medida.

Na Figura 73 estão representadas as médias de respostas para as análises sequenciais de cada concentração, de modo que para as concentrações de 30 $mg.L^{-1}$ e 70 $mg.L^{-1}$ estão representadas as médias para o primeiro dia de análise. É possível distinguir tempos de resposta para dois grupos de concentrações. Concentrações de H_2S entre 15 e 50 $mg.L^{-1}$ apresentaram um tempo de resposta de 10 minutos e para concentrações acima de 50 $mg.L^{-1}$ foram necessários 40 min para estabilização do sinal espectrofotométrico.

5.11.8 Curva de calibração do biossensor óptico

Considerando as respostas para todas as concentrações testadas foi observado a partir da Figura 74 que um aumento de concentração de sulfeto de hidrogênio provocou um aumento no valor máximo de absorbância, com um desvio padrão pequeno no tempo de resposta estabelecido. A linearidade desta relação foi avaliada a partir da Tabela 29 para determinação da curva de calibração entre resposta espectrofotométrica e concentração de H_2S.

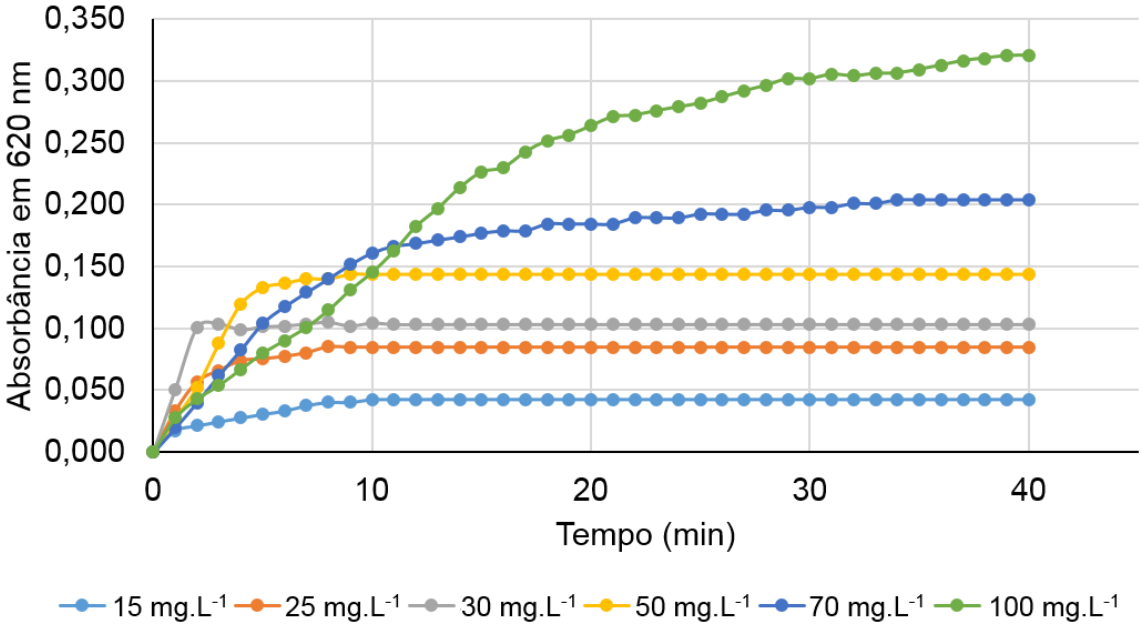


Figura 74 – Efeito do aumento de concentração no valor máximo de absorbância para soluções de H_2S entre 15 e 100 $mg.L^{-1}$.

Tabela 29 – Caracterização da resposta do biossensor óptico para concentrações de H_2S entre 15 e 100 mg.L^{-1}.

	Concentração (mg.L^{-1})						
Medida	**0**	**15**	**25**	**30**	**50**	**70**	**100**
1	0,004	0,040	0,087	0,101	0,142	0,203	0,331
2	0,007	0,044	0,086	0,104	0,142	0,214	0,319
3	0,001	0,044	0,081	0,108	0,144	0,214	0,322
4	0,001			0,105		0,192	
5	0,000			0,100		0,205	
6	0,003			0,101			
7	0,001						
8	0,004						
9	0,001						
10	0,004						
Média	0,003	0,043	0,085	0,103	0,144	0,206	0,321
Desvio Padrão	0,002	0,0023	0,0032	0,0031	0,0015	0,0091	0,0096
DPR (%)	66,6	5,41	3,80	2,97	1,06	4,44	3,00

Os dados da Tabela 29 indicaram boa repetitividade da resposta analítica, com um desvio padrão relativo não ultrapassando 5,41 % para a faixa de concentração estudada. A relação entre a média de absorbância e a concentração de H_2S é representada na curva de calibração da Figura 75.

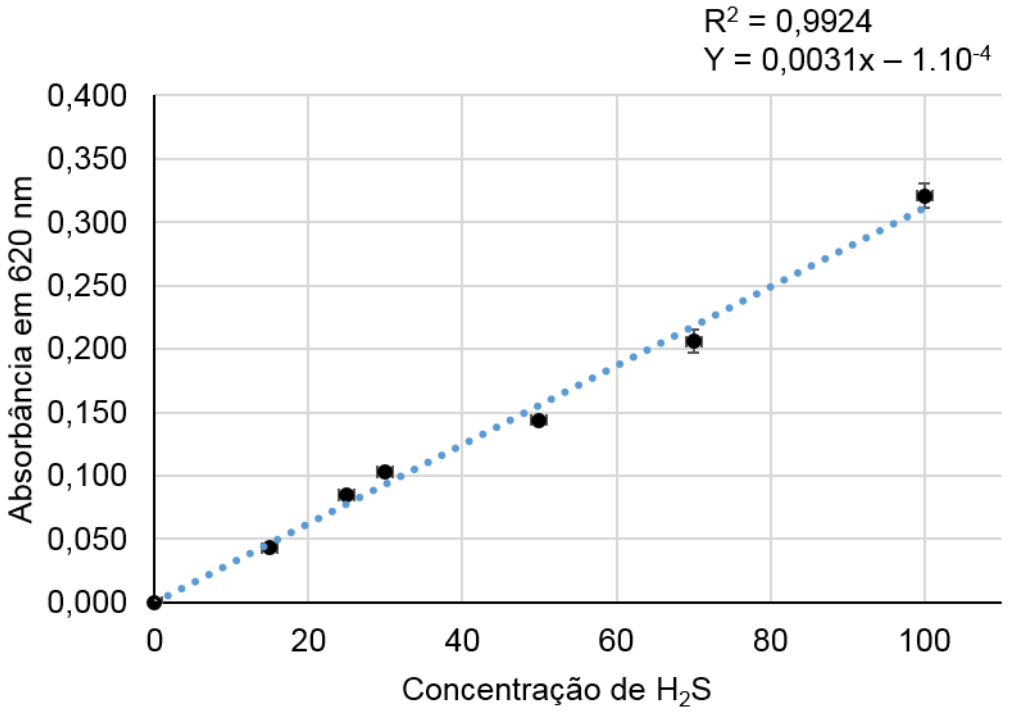


Figura 75 – Curva de calibração entre a resposta espectrofotométrica e a concentração de sulfeto de hidrogênio. A linha azul representa a linha de tendência para uma relação linear com interseção não definida. As barras verticais representam os desvios padrão para cada concentração.

Houve uma forte linearidade entre a resposta do biossensor e a concentração de H_2S para a faixa entre 15 e 100 $mg.L^{-1}$, com um coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,99. Utilizando dispersões celulares de concentração 0,22 $g.L^{-1}$, com seis dias de cultivo e em pH 1 a concentração de H_2S pode ser diretamente obtida através da Equação 29.

$$\text{Concentração de } H_2S\ (mg.L^{-1}) = \frac{\text{Absorbância em 620 nm} + 1.10^{-4}}{0{,}0031} \qquad \text{Equação 29}$$

Os resultados para as concentrações 25 $mg.L^{-1}$ e 30 $mg.L^{-1}$ foram avaliadas em função de sua proximidade realizando um teste t de student. Foi obtido um p-valor igual a 0,0134 indicando que a diferença entre os valores encontrados para estas concentrações são significativamente diferentes em um nível de confiança de 95 %.

Os resultados obtidos para os ensaios em branco, realizados na ausência de H_2S, foram utilizados para o cálculo do limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). O limite de detecção corresponde à menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os valores de LD e LQ foram calculados baseados em parâmetros da curva analítica, a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de 10 amostras do branco, conforme as equações 30 e 31 (ANVISA, 2017).

$$LD = \frac{3{,}3\ \sigma}{IC} \qquad \text{Equação 30}$$

$$LD = \frac{10\ \sigma}{IC} \qquad \text{Equação 31}$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (ANVISA, 2017).

Considerando os resultados apresentados na Tabela 29 e o coeficiente angular da equação de regressão linear da curva de calibração, igual a 0,0031, foi calculado um limite de detecção de aproximadamente 2,1 $mg.L^{-1}$ e um limite de quantificação de 6,4 $mg.L^{-1}$. O limite de detecção (LD) em função da absorbância obtida para os ensaios em branco pode ser determinado a partir da Equação: $LD = X + t\ \sigma$, onde X é a média dos valores obtidos para o branco da amostra, σ é o desvio padrão dos brancos e t é a abcissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança (INMETRO, 2011). Para uma amostra com n=10 são obtidos 9 graus de liberdade para matriz do branco, correspondendo a um valor de t unilateral, para 99 % de confiança, igual a 2,821, e um limite de detecção de aproximadamente 0,009.

5.11.9 Influência de possíveis espécies químicas interferentes

A oxidação de enxofre pode ser estimulada pela presença de sais impermeáveis à membrana celular, em baixa concentração, pela neutralização de cargas superficiais causando uma redução nas forças repulsivas. Ânions permeáveis à membrana celular podem inibir a oxidação de enxofre pela destruição do potencial de membrana, causando uma redução do pH interno, enquanto uma alta concentração de íons pode ocasionar estresse pelo aumento da pressão osmótica reduzindo a capacidade de oxidação de enxofre por *A. thiooxidans* (SUZUKI et al, 1999).

O procedimento para determinação da concentração de H_2S, pela mistura de 1,7mL de suspensão celular e 1,7 mL de solução de H_2S, não foi adotado neste experimento. Neste caso, a adição de um volume apreciável de interferente ultrapassaria o limite comportado pela cubeta de quartzo e o preparo de diversas soluções de H_2S contendo cada um dos interferentes seria limitada pela pequena quantidade de sulfeto de sódio disponível para todos os estudos. Assim, a interferência de diversas espécies iônicas na resposta do biossensor foi avaliada através da análise de sistemas contendo 1,7 mL de suspensão celular sobre a qual foram adicionados 1 mL de solução de H_2S e 1 mL de cada espécie interferente testada em concentração de 1.000 $\mu mo.L^{-1}$. Neste caso, a curva de calibração obtida para determinação da concentração de H_2S não é aplicável e a interferência na resposta do biossensor foi avaliada de acordo com Yang et al. (2004) pela razão entre a absorbância obtida no estado estacionário, na presença e na ausência de interferentes, pela substituição do volume de interferente por igual volume de água destilada. Os resultados são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 – Resposta do biossensor na presença de diversas espécies iônicas. As medidas correspondem à razão entre o valor de absorbância no estado estacionário na presença de interferentes e para soluções contendo apenas suspensão celular e sulfeto de hidrogênio.

Interferente	**Medida 1**	**Medida 2**	**Desvio padrão relativo (%)**	**Média**	**Erro (%)**
Na^+	0,98	1,01	2,09	0,995	-0,49
K^+	1,02	1,00	1,37	1,010	0,98
NH_4^+	1,04	1,01	1,97	1,024	2,38
Zn^{2+}	0,95	0,94	0,71	0,948	-5,24
Fe^{2+}	0,94	1,05	7,66	0,995	-0,49
Cd^{2+}	1,01	0,89	8,89	0,951	-4,89
Mn^{2+}	0,98	0,96	1,43	0,971	-2,94
$S_2O_3^{2-}$	1,14	1,09	2,77	1,115	11,52
NO_3^-	1,07	0,96	7,31	1,015	1,46
HPO_4^{2-}	1,01	0,98	2,09	0,995	-0,49
Cl^-	1,02	0,99	2,07	1,005	0,49
I^-	1,02	1,00	1,37	1,010	0,98
SO_4^{2-}	0,98	1,01	2,09	0,995	-0,49

As espécies iônicas e a concentração de interferentes foram escolhidas segundo Liu et al. (2008). Nas condições de análise os cátions com as maiores interferências foram Zn^{2+} e Cd^{2+}. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghadiri et al. (2013) que justificaram a redução na resposta observada pela precipitação de seus respectivos sulfetos que, neste caso, estariam menos disponíveis para inibição enzimática. Para o biossensor em estudo, a precipitação de sulfetos metálicos os tornaram menos disponíveis para oxidação biológica uma vez que *A. thiooxidans* apresenta uma baixa capacidade de ataque a sulfetos insolúveis (LIU et al, 2003).

O íon tiossulfato foi a espécie com a maior interferência entre os ânions analisados. A espécie *A. thiooxidans* utiliza H_2S e $S_2O_3^{2-}$ como fonte de energia e o produto principal do primeiro estágio de oxidação de tiossulfato também é enxofre elementar (YOUSEFI et al, 2003). O consumo de ambas as espécies presentes no sistema gerou um aumento na absorbância máxima em relação à ausência de tiossulfato, provocando um erro de 11,5 % na resposta do biossensor. As outras espécies testadas provocaram um erro menor que 6 % na resposta do biossensor, indicando uma boa seletividade.

O sulfeto de hidrogênio é uma molécula reativa e um poderoso agente redutor (KING, 2013; ZHAO; BIGGS; XIAN, 2014). Pode ser quimicamente oxidado pelo ar e sua oxidação pode ser catalisada especialmente por íons de transição (VAZQUEZ; ZHANG; MILLERO, 1989). Assim, torna-se importante verificar a formação de enxofre através de reações paralelas com participação do sulfeto de hidrogênio. Foram realizados dois testes controle na ausência de células. O primeiro consistiu na mistura de 1 mL de solução de H_2S e 1 mL de solução contendo 1.000 $\mu mol.L^{-1}$ de todas as espécies químicas contidas na Tabela 30 em 1,7 mL de solução salina normal. No segundo, a solução de interferentes foi substituída por 1mL de meio ATCC 125, uma vez que íons deste meio de cultura estão possivelmente presentes após remoção das células do meio de cultivo. Os resultados são apresentados na Figura 76.

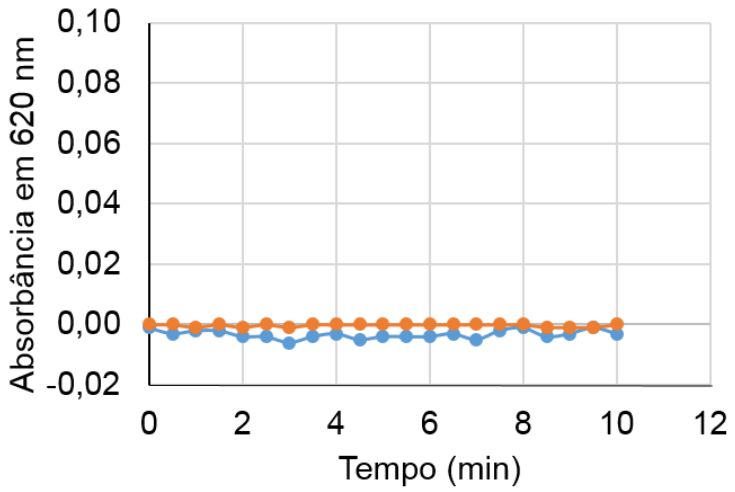


Figura 76 – Resposta em 620 nm para mistura de soluções de H_2S 50 mg.L^{-1} e interferentes iônicos na ausência de células. Linha azul, solução 1.000 µmol.L^{-1} de íons da Tabela 30; linha vermelha, meio de cultivo ATCC 125.

A oxidação do H_2S em meio alcalino é considerável, mas a taxa de oxidação do sulfeto de hidrogênio em pH abaixo de 6 é muito lenta (CHEN; MORRIS, 1972). As respostas foram caracterizadas por pequenas oscilações com máximo e mínimo entre -0,005 e 0,002, indicando que o aumento de absorbância foi negligenciável. A presença dos íons nas condições estudadas não interferiram na resposta do biossensor pela formação de enxofre elementar.

De acordo com Luther et al. (2011) o efeito catalítico de metais de transição em baixa concentração é mais pronunciada para os íons Fe^{2+} e Mn^{2+}. Entretanto, o enxofre elementar não é formado como produto da oxidação química do H_2S mesmo na presença desses metais. Os produtos obtidos em maior proporção nestas condições são íons sulfato e tiossulfato (ZHANG; MILLERO, 1993). Estas espécies possuem uma absorção acentuada abaixo da região de 250 nm com um pico de máximo em 218 nm para o íon tiossulfato (KHAN, 2012), sobreposta pela absorção do H_2S em 230 nm (HENGLEIN; ERSHOV; MALOW, 1995). A absorção dessas espécies em 620 nm é desprezível, de forma que mesmo que fossem formadas, não seria esperada influência na resposta do biossensor.

5.12 Ensaios com amostra real – Água Produzida

A geração de sulfeto de hidrogênio está associada a uma variedade de processos industriais, como a produção e refino do petróleo, indústria de papel, curtimento de couro, sistemas de esgoto e mineração (SEN et al, 2006; CÁCERES et al, 2010). Estas fontes geradoras de H_2S são potenciais áreas de aplicação de biossensores para detecção de H_2S. A indústria petroquímica desperta especial interesse em função das diversas etapas do processo de produção e refino em que o sulfeto de hidrogênio está relacionado. Este é encontrado naturalmente no petróleo, é gerado no processo de recuperação secundária de poços de petróleo, é formado durante o processo de craqueamento térmico, durante a purificação de gás natural, em trocadores e dutos que utilizam água do mar, em tanques de armazenamento de óleo e água de produção e durante o processo de dessulfurização de combustíveis (MAINIER et al, 2007).

Concentrações de sulfeto acima do limite de detecção dos biossensores desenvolvidos neste trabalho são encontradas em água produzida. Assim, as respostas dos biossensores óptico e potenciométrico foram avaliadas em amostras de água produzida cedida pelo CENPES. A origem e composição da água produzida não foi revelada. Entretanto, é característica comum à água de produção a alta concentração salina e a presença de partículas de óleos, particulados sólidos, metais pesados e compostos orgânicos de naturezas diversas.

Dois principais fatores que podem comprometer as respostas dos biossensores são a alta concentração de sólidos dissolvidos, em especial íons Na^+ e Cl^-, e a presença de óleo em suspensão e emulsificado, constituído de compostos orgânicos de alta toxicidade como benzeno, tolueno etilbenzeno e xileno (BTEX).

O primeiro fator foi avaliado para o biossensor potenciométrico a partir da análise de solução salina de composição descrita na Tabela 11 acrescida de 30 $mg.L^{-1}$ de H_2S. Não foi observada influência importante na variação de potencial, conforme resultados apresentados no item 5.9.5.5.

A mesma solução foi analisada concomitantemente empregando o biossensor óptico para avaliar o impacto da alta concentração salina na absorbância em 620 nm. Os resultados são apresentados na Figura 77 e na Tabela 31.

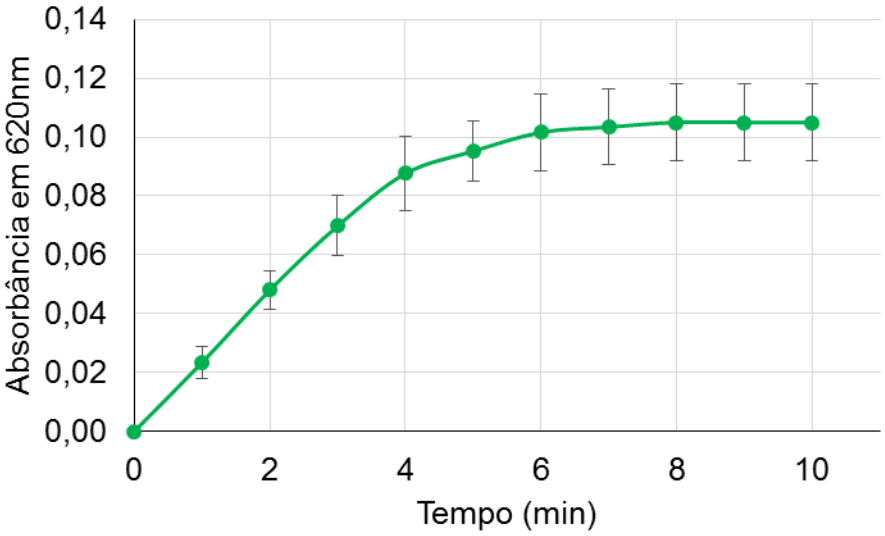


Figura 77 – Resposta do biossensor óptico para análise de solução de sulfeto de hidrogênio 30 mg.L^{-1} contendo íons em concentração característica de água produzida. As barras verticais representam os desvios padrão (n=5).

O aumento de absorbância em 620 nm apresentou o perfil padrão observado em análises anteriores de soluções de mesma concentração de H_2S. Houve estabilização da resposta após cerca de 6 minutos de reação com valor médio de absorbância igual a 0,105. O valor para esta concentração de H_2S na ausência de possíveis íons interferentes é 0,103, indicando um erro relativo de 1,94 %.

O resultado obtido, considerando o valor médio para 5 análises, indica que a presença de íons em concentração e composição semelhantes às encontradas em água de produção não influenciaram a resposta do biossensor óptico. Entretanto, a alta concentração salina induziu uma maior variabilidade da resposta do biossensor, como pode ser observado na Tabela 31.

Tabela 31 – Aumento de absorbância em função do tempo de reação para análise de solução de H_2S contendo íons característicos de água de produção.

	Análises						
Tempo	1	2	3	4	5	Média	Desvio-Padrão
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,032	0,026	0,020	0,020	0,019	0,023	0,006
2	0,059	0,046	0,048	0,041	0,046	0,048	0,007
3	0,087	0,068	0,070	0,063	0,061	0,070	0,010
4	0,110	0,082	0,085	0,078	0,083	0,088	0,013
5	0,110	0,082	0,093	0,093	0,098	0,095	0,010
6	0,118	0,082	0,101	0,101	0,106	0,102	0,013
7	0,118	0,083	0,109	0,101	0,106	0,103	0,013
8	0,118	0,083	0,109	0,109	0,106	0,105	0,013
9	0,118	0,083	0,109	0,109	0,106	0,105	0,013
10	0,118	0,083	0,109	0,109	0,106	0,105	0,013

A primeira e segunda análises, embora realizadas após uma hora de ressuspensão e ajuste de pH, apresentaram respostas díspares, elevando o valor de desvio padrão em relação à média das 3 últimas análises. O desvio padrão relativo (DPR) para as três últimas análises, após aparente estabilização da condição metabólica, foi de apenas 1,94 %, embora o valor de absorbância média tenha sido cerca de 4,8 % acima do valor esperado considerando a curva de calibração do biossensor.

Nos experimentos realizados com água produzida utilizando o biossensor óptico e o biossensor potenciométrico foram utilizadas amostras sem qualquer tratamento prévio. Em condições reais de análise, operação como filtração para remoção de particulados sólidos, processo de acidificação ou métodos físicos e químicos para remoção de óleo poderiam interferir na quantidade de H_2S dissolvido.

As propriedades organolépticas da água produzida utilizada indicaram uma leve turbidez, de aspecto amarelado, presença de pequenos particulados pretos, viscosidade aproximadamente igual à da água, forte cheiro nauseante e presença de óleo na superfície e disperso na solução.

Para análise com o biossensor óptico foi dissolvido sulfeto de sódio em quantidade suficiente para 30 mg.L^{-1} de H_2S diretamente na água produzida, de forma a garantir uma concentração mínima conhecida. Os resultados são apresentados na Figura 78.

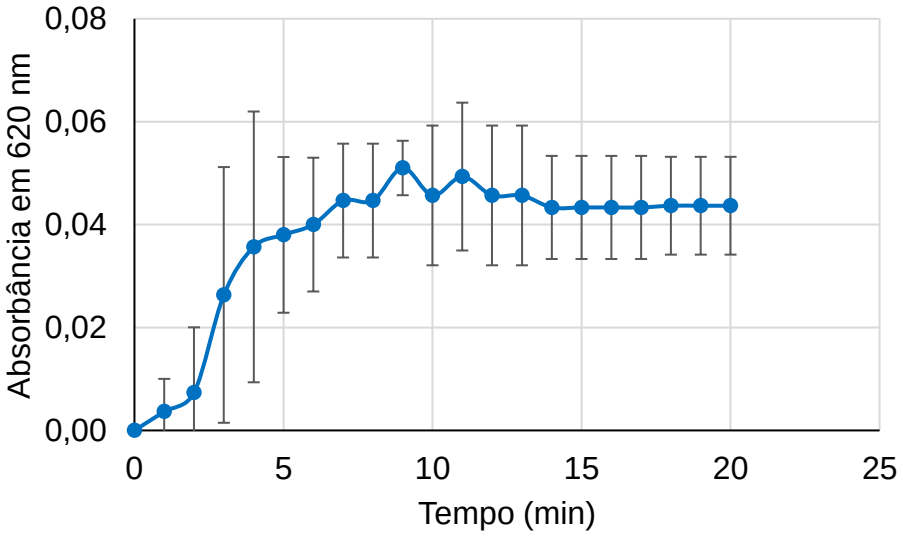


Figura 78 – Resposta do biossensor óptico para análise de solução de água produzida adicionada de 30 mg.L^{-1} de H_2S. As barras verticais representam os desvios padrão (n=3).

Os resultados indicaram algumas diferenças marcantes em relação ao padrão de aumento de absorbância observado na ausência de água de produção. Houve um período *lag* de aproximadamente 2 min que precedeu o aumento de absorbância em duas das três análises. Para a concentração de H_2S empregada seria esperado um aumento de absorbância mínimo de 0,103 ± 0,003, considerando a curva de calibração. Entretanto, a resposta obtida foi bastante inferior, entre 0,034 e 0,053, indicando uma baixa repetitividade da resposta, embora valores constantes tenham sido obtidos nas três análises após 10 min de reação.

A alta concentração salina não exerceu influência importante na resposta do biossensor. É possível inferir que outros constituintes da água de produção impactaram a condição metabólica celular, não havendo adaptação às novas condições no tempo da análise. Entretanto, a solubilização do sulfeto de sódio ocorreu de forma não costumeira. Este é prontamente dissolvido em água destilada. Em água de produção houve a formação de um precipitado branco ao redor dos cristais de sulfeto de sódio, que foi disperso por agitação em vórtex. Assim, é possível que a quantidade de H_2S efetivamente formado seja inferior à esperada pela massa de $Na_2S.9H_2O$ adicionada, sendo o sulfeto parcialmente consumido na formação de sulfetos insolúveis. Dessa forma seriam obtidos menores valores de absorbância máxima, uma vez que *A. thiooxidans* é capaz de atacar apenas sulfetos solúveis.

Para a análise com o biossensor potenciométrico foi inicialmente utilizada solução de água de produção contendo 30 $mg.L^{-1}$ de H_2S, preparada a partir da dissolução de massa apropriada de sulfeto de sódio. A formação de precipitado branco foi novamente observada e dispersada por agitação em vórtex. O pH da água de produção, inicialmente em 7,6, foi aumentado para aproximadamente 8,5 após dissolução do sulfeto de sódio. O pH foi ajustado no biossensor para 3,49 com soluções diluídas de NaOH e HCl e a variação de potencial foi acompanhada por 3 h. O resultado é apresentado na Figura 79.

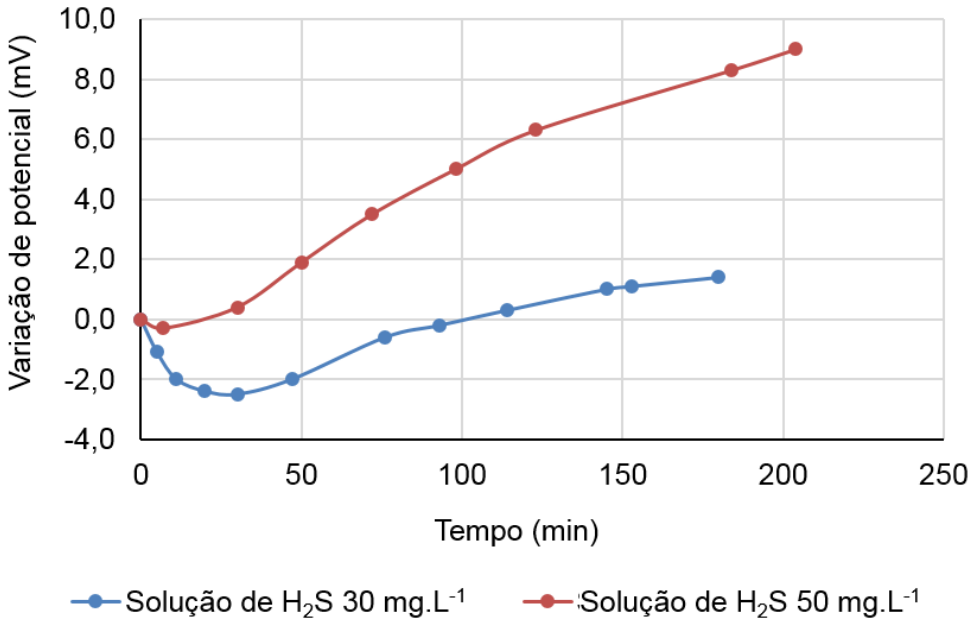


Figura 79 – Resposta do biossensor potenciométrico para soluções de água de produção contendo H_2S em concentração 30 $mg.L^{-1}$ e 50 $mg.L^{-1}$.

A resposta potenciométrica apresentou um comportamento anômalo, havendo uma redução no valor de potencial observado por aproximadamente 0,5 h. Resultados semelhantes foram observados nos testes preliminares realizados com sistema fechado com tampa de borracha e com sistemas iniciados em pH elevado. Foi observado que o contato dos micro-organismos com meios em pH elevado afeta a taxa metabólica, reduzindo o consumo de H_2S. Em pH 9 o sulfeto está presente principalmente na forma de íons HS^-. Quando o pH é reduzido a 3,5 o íon bissulfeto é convertido em H_2S, sendo parcialmente volatilizado. O equilíbrio químico é deslocado, reduzindo a quantidade de íons H^+ em solução e provocando aumento do pH. Quando o consumo de H_2S para a produção de H_2SO_4 não é efetivo, é observado uma redução de potencial.

A partir de 0,5 h de reação houve um aumento progressivo de potencial de aproximadamente 4,0 mV e uma redução de pH de 0,06. Este resultado indica que após este período houve uma adaptação dos micro-organismos ao meio de análise, embora a resposta ao final de 3 h de reação tenha sido bastante inferior à encontrada para esta concentração de H_2S na ausência de água de produção, que foi de 20 mV.

Uma segunda análise foi realizada com concentração de H_2S de 50 $mg.L^{-1}$, preparada com o mesmo procedimento adotado para solução 30 $mg.L^{-1}$, considerando que a redução de potencial inicialmente observada foi resultado de uma baixa quantidade de H_2S disponível e de uma baixa taxa metabólica inicial. O resultado, representado na Figura 83, indicou uma minimização da redução de pH inicialmente observada. O pH retorna ao valor inicial após cerca de 15 min e aumenta progressivamente, alcançando 9 mV após 200 min de reação. A resposta do biossensor foi notoriamente menor que a esperada na ausência de água produzida, embora o biossensor tenha alcançado um aumento de potencial de 34,4 mV após 20 h de experimento. O resultado indicou que o metabolismo celular foi afetado por constituintes orgânicos da água de produção, uma vez que a resposta do biossensor não foi afetada pela presença de sais em concentração característica da água de produção.

As respostas obtidas com o biossensor óptico e com o biossensor potenciométrico para análise de H_2S na presença de água produzida foram menores que aqueles obtidos em sua ausência. Em ambos os biossensores o comportamento metabólico foi afetado pelos inevitáveis constituintes orgânicos da água produzida. Entretanto, os resultados são promissores. Estes indicaram que as bactérias FG-01 apresentaram capacidade de adaptação ao novo meio analisado, sendo encontradas respostas positivas para os dois biossensores.

6. Conclusões

Os resultados de peso seco celular mostraram que dispersões celulares de densidade óptica em 620 nm igual a 1,0 correspondem à dispersões de concentração celular 1,11 $g.L^{-1}$. A maximização do crescimento celular foi obtida empregando meio de cultivo recomendado para *A. thiooxidans* ATCC 8085, utilizando enxofre elementar como fonte de energia em concentração de 20 $g.L^{-1}$. As demais condições de sistema foram: temperatura em 30 ºC, concentração de inoculo igual a 20 % (v/v) em pH 3 e com agitação orbital a 150 rpm iniciada após a inoculação.

Os melhores resultados dos biossensores foram obtidos utilizando células em fase exponencial de crescimento, com 6 dias de cultivo. A condição metabólica mostrou-se sensível às variações de pH, sendo necessário um período mínimo de 0,5h de adaptação à nova condição de acidez. Ambos os biossensores mostraram boa repetitividade, reprodutibilidade e linearidade, com desvio padrão relativo menor que 5% e coeficiente de determinação maior que 0,99 nas condições ótimas de atuação.

O biossensor óptico apresentou um tempo de resposta menor que o potenciométrico, estabilizando o sinal após 10min de reação para concentrações de H_2S de até 50 $mg.L^{-1}$. Melhores resultados foram obtidos em pH 1, com faixa de linearidade entre 15 e 100 $mg.L^{-1}$.

Em relação ao biossensor potenciométrico, os resultados obtidos em Erlenmeyer fechado com tampa de borracha evidenciaram uma limitação do aumento de potencial provocada pela carência de oxigênio para biorreação. Esta foi superada empregando o reator com tampa porosa, mas houve perda de H_2S do sistema e problemas de reprodutibilidade e repetitividade da resposta potenciométrica. Os melhores resultados foram obtidos em pH 3,5. Em pH abaixo de 3,0 houve diminuição da sensibilidade do biossensor e em pH 5,0 houve redução da taxa metabólica, comprometendo o resultado do biossensor no tempo de resposta definido, que foi de 200 min.

Os biossensores apresentaram boa seletividade na presença de diversas espécies iônicas. Mesmo presentes nos sistemas em altas concentrações, características de água produzida, houve pouca interferência nas respostas dos biossensores. A espécie que apresentou maior interferência na resposta do biossensor óptico foi o ânion tiossulfato, provocando um erro relativo de 11,5 %, comparado à resposta na ausência de íons interferentes.

Analisando uma amostra real de água produzida, as respostas dos biossensores óptico e potenciométrico mostraram interferência no comportamento padrão característico dos biossensores. Houve uma redução nos sinais analíticos esperados para as concentrações de H_2S experimentadas, não sendo possível empregar as curvas de calibração para esta nova condição de sistema. Os resultados indicaram a necessidade de um estudo de adaptação celular aos componentes da água produzida, visto que as células apresentaram capacidade de consumir H_2S em sua presença.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que foi possível desenvolver e otimizar os parâmetros de aplicação de dois biossensores microbianos para determinação de sulfeto de hidrogênio em solução aquosa. A faixa de trabalho foi característica de diversos processos industriais envolvendo o sulfeto de hidrogênio, como a produção e refino do petróleo, indústria de papel, curtimento de couro, sistemas de esgoto e mineração, constituindo potenciais áreas de aplicação dos biossensores para determinação de H_2S.

Referências Bibliográficas

ADAIR, F. W. Membrane-associated sulfur oxidation by the autotroph Thiobacillus thiooxidans. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 4, p. 899-904, 1966.

ADÁNEZ, J.; GARCÍA-LABIANO, F.; de DIEGO, L. F.; FIERRO, V. H_2S Removal in Entrained Flow Reactors by Injection of Ca-Based Sorbents at High Temperatures. **Energy and Fuels**, n. 12, p. 726-733, 1998.

ADIGUZEL, Y. Biosensor with UV Spectrophotometric Detection. **Proceedings**, v. 2, n. 113, p. 1-4, 2018.

AITA, B. C. et al. Biofiltration of H_2S-rich biogas using *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Clean Technologies and Environmental Policy**, n. 18, 689-703, 2016.

AKYILMAZ, E.; DINÇKAYA, E. An amperometric microbial biosensor development based on Candida tropicalis yeast cells for sensitive determination of ethanol. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 20, p. 1263-1269, 2005.

ALMEIDA, E. S. C.; FREIRE, M. C. M.; RABELO, S. K. L. Avaliação dos efeitos da presença de bactérias redutoras de sulfato em linhas de produção de petróleo na bacia de campos. **Perspectivas Online**, v. 3, n. 10, 2009.

ALMEIDA, S. K. Detecção de bactérias redutoras de sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio. Dissertação de mestrado. Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

AMEMIYA, K. Relationship between growth and metabolic activity in the strict chemolithotroph, *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, n. 12, 1709-1712, 1974.

AMINI, S. et al. Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, p. 2186-2195, 2012.

ANDRADE, V. T. Avaliação da toxicidade de água produzida tratada por processo evaporativo com a finalidade de reuso em solo. 2009. 164f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

ANTUNES, R. M. V. Contribuição para o Estudo de Odores em Estações de Tratamento de Águas Residuais Urbanas (2006). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal, 299p.

ANUNZIATO, P. A. Efeito do *Thiobacillus thiooxidans* na corrosão do aço 430, dissertação de mestrado, p. 43, Unicentro-PR, 2008.

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 166, de 24 de JULHO de 2017. Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> Acessado em: 20 FEV. 2018.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21sted. Washington, DC, New York: American Public Health Association; 2005.

AROCA, G. et al. Comparison on the removal of hydrogen sulfide in biotrickling filters inoculated with *Thiobacillus thioparus* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Electronic Journal of Biotechnology**, n. 10, p. 514-520, 2007.

ATCC, AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Product Sheet, 2011. *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC® 8085™. Disponível em:<https://www.atcc.org/Products/All/8085.aspx# generalinformation> Acessado em: 17 Fev. 2018.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial ecology – Fundamentals and applications. 3rd ed., Redwood City, The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., p. 314-345, 1993.

AVELAR-FREITAS, B. A. et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 307–3015, 2014.

BAJESTANI, M. I.; MOUSAVI, S. M.; SHOJAOSADATI, S. A. Bioleaching of heavy metal from spent household batteries using *Acidithiobacillus ferroxidans*: Statistical evaluation and optimization. **Separation and Purification Technology**, n. 132, p. 309-316, 2014.

BALBI, A. Vazamento de gás mata dois operários em Campos. Jornal O Globo, Rio de Janeiro, 26/01/2001.

BARROCAS, P. R. G. et al. Biossensores para o monitoramento da exposição a poluentes ambientais. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 16; n. 4, p. 677-700, 2008.

BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. Sulphate-reducing Bacteria. **Environmental and Engineered Systems**. Cambrigde University Press, 2007.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 181-186, 2004.

BHALLA, N. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, n. 60, p. 1-8, 2016.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. (2007) Resolução nº 393 de 8 de agosto 2007. Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 de agosto de 2007.

BURNS, G.R. The oxidation of sulphur in soils. In: Sulphur, energy and environment. B. Meyer (Ed.). **Sulphur Institute Tech. Bull**. n.13, p. 261, 1967.

BUTT, S. Experiments in Cell Biology: Cell counting – hemocytometry. Lahore, Pakistan, 2013. Disponível em:<https://sites.google.com/site/drsabaspages/lab-manual>. Acesso em: 10 mar. 2016.

CÁCERES, M. et al. Oxidation of volatile reduced sulphur compounds in biotrickling filter inoculated with *Thiobacillus thioparus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 91-100, 2010.

CAELEN, I.; KALMAN, A.; WAHISTROM, L. Biosensor-based determination of riboflavina in milk samples. **Analytical Chemistry**, n. 76, p. 137-143, 2004.

CAMÕES, M. F. Zona de viragem. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n. 100, p. 85-86, 2006.

CAMPUZANO, S. Presente y futuro de los biosensores microbianos electroquímicos. **Anales de Química**, v. 107, n. 4, p. 350–357, 2011.

CANTERFOLD, D. R. Simultaneous determination of cyanide and sulfide with rapid direct current polarography. **Analytical Chemistry**, n. 47, p. 88-95, 1975.

CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR-Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **Microbiology Ecology**, n. 31, p.1-9, 2000.

CHAIPRAPAT, S. et al. Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 344-352, 2011.

CHAIPRAPAT, S. et al. Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 344-352, 2011.

CHARNNOK, B. et al. Oxidation of hydrogen sulfide in biogas using dissolved oxygen in the extreme acidic biofiltration operation. **Bioresource Technology**, 131, p. 492-499, 2012.

CHEN, K. Y.; MORRIS, J. C. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O_2. **Environ Sci Tecnol**, v. 6, n. 6, p.529-537, 1972.

CHEN, M. et al. Growth kinetics of *thiobacilli* strain HSS and the application in bioleaching phosphate ore. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 5, p. 1329-1334, 2002.

CHEN, S. et al. Reaction-based genetically encoded fluorescent hydrogen sulfide sensors. **Journal of American Chemical Society**, n. 134, p. 9589-9592, 2012.

CHUNG, Y. C.; HUANG, C.; TSENG, C. P. Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 biofilter. **Biotechnology Progress**, n. 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**, n. 52, p. 31-38, 1996b.

CHUNG, Y. C.; HUANG, C.; TSENG, C. P. Removal characteristics of H_2S by *Thiobacillus novellus* CH3 biofilter in autotrophic and mixotrophic environments. **Journal of Environmental Science and Health**, A32, p. 1435-1450, 1997.

COBLEY JG, COX JC. 1983. Energy conservation in acidophilic bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 47, n.4, p.579-595.

COELHO, R. M. P. Ecologia Microbiana. Laboratório de Gestão Ambiental de Reservatórios, UFMG. Disponível em: <http://ecologia.icb.ufmg.br/~rpcoelho/Limnologia%20Aquicultura/website/aulas/aula_6.pdf >Acesso em: 20 de fevereiro 2016.

COLLINS, J.; LEWIS, D. Air toxicology and epidemiology section. **California Office of Environmental Health Hazard Assessment**, California, 2000.

CONAMA, 2002. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (2002). Resolução 315. Brasília, Brasil.

COSTA, G. S.; SALGADO, A. M.; BARROCAS, P. R. G. Advances on Using a Bioluminescent Microbial Biosensor to Detect Bioavailable Hg (II) In Real Samples. **American Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 1, n. 3, p. 44-48, 2013.

COSTA, G. S. Avaliação da aplicabilidade de um biossensor microbiano para determinação de mercúrio biodisponivel em amostras da baía de guanabara. Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p.155, 2015.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, 2007.

COOK, T. M. Growth of *Thiobacillus thiooxidans* in shaken culture. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 3, p. 620-623, 1964.

CRESCENZI, F. et al. Control of acidity development on solid sulfur due to bacterial action. **Environmental Science Technology**, n. 40, p. 6782-6786, 2006.

CRUZ, L. P. S.; CAMPOS, V. P. Métodos de amostragem e análise para compostos reduzidos de enxofre atmosférico. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1180-1189, 2008.

DAMGAARD, L.; NIELSEN, L.; REVSBECH, N. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. **Water Research**, n. 35, p. 1379-1386, 2001.

DAUNERT, S. et al. Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. **Chemical Reviews**, n. 100, p. 2705–2738, 2000.

DEB, A. et al. Ascorbic acid, acetaminophen, and hydrogen peroxide detection using a dendrimer-encapsulated Pt nanoparticle carbon nanotube composite. **Journal of Applied Electrochemistry**, n. 46, p. 289–298, 2016.

DEMIREL, B. YENIGÜN, O. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. **Bioresource Technology**, n. 97, p. 1201-1208, 2006.

DÍAZ, I. et al. Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. **Bioresource Technology**, n. 102, p.3768–3775, 2011.

DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, p. 149–156, 2008.

DURSUN, S. Biodegradation of hydrogen sulfide (H_2S) from the waste gases by a packing materials column. **6th International Scientific Conference**, v.1, p. 405-413, 2006.

DWORKIN, M.; FALKOW, S. The prokaryotes: A handbook of the biology of bacteria. **Springer Science e Business Media**, v. 5, p. 824, 2006.

EBRAHIMI, E. et al. A microbial biosensor for hydrogen sulfide monitoring based on potentiometry. **Progress Biochemistry**, n. 49, p. 1393-1401, 2014.

EGGENSTEIN, C. et al. A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium sensitive transducer. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, n. 1, p. 33-41, 1999.

EGGINS, B. Biosensor: An Introduction, New York: **Wiley Teubner**, 1996.95p.

E&P Forum, 1994. Oil Industry International Exploration and Production Forum. North Sea Produced Water: Fate and Effects in the Marine Environment. London, 50p. In: Report No. 262/204.

FAGNANI, E. et al. Controle de qualidade na determinação potenciométrica de sulfetos volatilizáveis por acidificação (SVA) utilizando adições de padrão. **Química Nova na Escola**, v. 35, n. 4, p.832-836, 2012.

FARAHANI, M. S. et al. Bioleaching of heavy metals from a petroleum spent catalyst using *Acidithiobacillus thiooxidans* in a slurry bubble column bioreactor. **Separation and Purification Technology**, n. 132, p. 41-49, 2014.

FENG, S.; YANG, H.; WANG, W. System‐level understanding of the potential acid tolerance components of *Acidithiobacillus thiooxidans* ZJJN-3 under extreme acid stress. **Extremophiles**, n. 19, p. 1029-1039, 2015.

FERREIRA, B. H. Estudo dos processos de tratamento de água produzida de petróleo. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Engenharia de Petróleo. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

FERREIRA, L. A. et al. Curso de formação de operadores de refinaria: química aplicada, corrosão. Curitiba: PETROBRAS : Unicenp, 32p, 2002.

FIGUEIREDO, E. C. On-line molecularly imprinted solid-phrase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. **Analytica Chimica Acta**, n. 635, p. 102-107, 2009.

FIGUEREDO, K.S.L. et al. Study of produced water using hydrochemestry and multivariate statistics in different productions zones of mature fields in the Potiguar Basin – Brazil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, n. 116, p. 109-114, 2014.

FRANÇA, R. G.; FIGUEIREDO, R. F. Redução por biolixiviação do teor de metais pesados presentes nos lodos de esgotos digeridos. **21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2001.

FRENCH, C.; GWENI, C. Biosensors in bioprocess monitoring and control. In: Allman A. editor, **Fermentation microbiology and biotechnology Tehran**: Satayesh, 2011.

GABRIEL, D.; DESHUSSES, M. A. Retrofitting existing chemical scrubbers to biotrickling filters for H_2S emission control. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 11, p.6308-6312, 2003.

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

GARCIA Jr.,O. Solubilização de Metais por Bactérias. In: II Workshop sobre Biodegradação. Campinas, SP, Brasil 18 - 20 de junho de 2001.

GENG, M.; DUAN, Z. Prediction of oxygen solubility in pure water and brines up to high temperatures and pressures. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, n. 74, p. 5631–5640, 2010.

GHADIRI, M.; KARIMINIA, H.; AZAD, R. R. Spectrophotometric determination of sulfide based on peroxidase inhibition by detection of purpurogallin formation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 91, p. 117-121, 2013.

GHOSH, W.; DAM, B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur-oxidation by taxonomically and ecologically diverse Bacteria and Archaea. FEMS **Microbiology Reviews**, 33, 999-1043. 2009.

GHOUS, T.; Townshend, A. Flow injection determination of neostigmine and galanthamine by immobilized acetylcholinesterase inhibition. **Analytical Chimica Acta**, n. 372, p. 379-386, 1998.

GINKEL, S. W. V.; HASSAN, S. H. A.; OH, S. E. Detecting endocrine disrupting compounds in water using sulfur-oxidizing bacteria. **Chemosphere**, n. 81, p. 294-297, 2010.

GOLOVACHEVA, P. 1985. Microscopia eletrônica de A. thiooxidans. Disponível em: <http://geo.web.ru/db/msg.html?mid=1161842euri=part_6_2_1.htm> Acesso em: 22 de fevereiro 2016

GREGORAKOS, L. et al. Hydrogen sulfide poisoning: management and complications. **Angiology**. v.4, n.6, p. 1123-1131, 1995.

GUENTHER, E. A.; JOHNSON, K. S.; COALE, K. H. Direct ultraviolet spectrophotometric determination of total sulfide and iodine in natural waters. **Analytical Chemistry**, n. 73, p. 3481-3487, 2001.

GUPTA, V. et al. Spectrophotometric ferric ion biosensor from *Pseudomonas fluorescens* culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 284-296, 2008.

HAMZAH, H. H. et al. Spectrophotometric determination of uric acid in urine based-enzymatic method uricase with 4-aminodiphenylamine diazonium sulfate (variamine blue RT salt). **Journal of Analytical & bioanalytical Techniques**, S7, p. 1-6, 2013.

HASSAN, S. S. M.; MARZOUK, S. A. M; SAYOUR, H. E. M. Methylene blue potentiometric sensor for selective determination of sulfide ions. **Analytica Chimica Acta**, n. 466, p. 47-55, 2002.

HECKER, M.; VOLKER, U. General stress response of Bacillus subtilis and other bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, n. 44, p. 35-91, 2001.

HENGLEIN, A.; ERSHOV, B. G.; MALOW, M. Absorption spectrum and some chemical reactions of colloidal platinum in aqueous solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 38, p.14129-14136, 1995.

HOWARD, A. G.; YEH, C. Y. Sulfide measurement by flow injection analysis with flame photometric detection. **Analytical Chemistry**, n. 70, p. 4868-4872, 1998.

HUA, Z. et al. An electrochemical biosensing platform based on 1-formylpyrene functionalized reduced grapheme oxide for sensitive determination of phenol. **RSC Advances**, n.6, p. 25427-25434, 2016.

HUGHES, M. N.; CENTELLES, M. N.; MOORE, K. P. Making and working with hydrogen sulfide-The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 47, p. 1346-1353, 2009.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE-008: Revisão 04-Jul/2011. 2011. Disponível em: <em:http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>Asesso em: 04 fev. 2018

ISLANDER, R. L. et al. Microbial ecology of crown corrosion in sewers. **Journal of Environmental Engineering**, n. 117, p. 751-770, 1991.

JAISWAL, N.; PRAKASH, O. Immobilization of a thermostable L-amylase on agarose and agar matrices and its application in starch stain removal. **World Applied Science Journal**, n.13, p. 572-577, 2011.

JENSEN, H. S. et al. Growth kinetics of hydrogen sulfide oxidizing bacteria in corroded concrete from sewers. **Journal of Hazardous Materials**, 189, p. 685-691, 2011.

JUNIOR J. A. C. e LACAVA P. T. Emissões em Processos de Combustão. São Paulo, Editora UNESP, 2003.

KAMIMURA, K. Marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium requiring salts for the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds. **Extremophiles**, n. 7, p. 95-99, 2003.

KAMIMURA, K. et al. Effects of inhibitors and NaCl on the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by a marine acidophilic, sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH. **Extremophiles**, n. 9, p. 45-51, 2005.

KARYAKIN, A. A. et al. Potentiometric biosensors based on polyaniline semiconductor films. **Sensors and Actuators B**, n. 33, p. 34-38, 1996.

KATO JUNIOR, E. T.; FRANCO, T. T.; YOSHIDA, C. M. P Desenvolvimento e otimização de sensor inteligente e biodegradável contendo indicador de H_2S. **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 4282-4288, 2010.

KEMPNER, E. S. Acid production by *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 6, p. 1842-1843, 1996.

KHAN, S. et al. Growth and biochemical activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* collected from Black Shale. **Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 4, p.78-83, 2012.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource technology**, v.102, n. 4, p.3662 -3672, 2010.

KIM, I. et al. Optical Detection of Paraoxon Using Single-Walled Carbon Nanotube Films with Attached Organophosphorus Hydrolase-Expressed *Escherichia coli*. **Sensors**, n. 15, p. 12513-12525, 2015.

KING, S. B. Potential biological chemistry of hydrogen sulfide (H_2S) with the nitrogen oxides. **Free Radical Biology and Medicine,** n. 55, p. 1–7. 2013

KNAYSI, G. A cytological and microchemical study of *Thiobacillus thiooxidans.* **Journal of Bacteriology**, v. 46 n. 5, p. 451-461, 1943.

KOCH, G. H. et al. Corrosion costs and preventive strategies in the United States. Transportation Equity Act for the 21st Century, n. FHWA-RD-01-156, 2002.

KONISHI, Y.; ASAI, S.; YOSHIDA, N. Growth kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 10, p. 3617-3622, 1995.

KREBS, W.; BACHOFEN, R.; BRANDL, H. Growth stimulation of sulfur oxidizing bacteria for optimization of metal leaching efficiency of fly ash from municipal solid waste incineration. **Hydrometallurgy**, n. 59, p. 283-290, 2001.

KREDIET, C.J. et al. Rapid, Precise, and Accurate Counts of *Symbiodinium* Cells Using the Guava Flow Cytometer, and a Comparison to Other Methods. **PLoS ONE**, v.10, n.8, 2015.

KUBO, I. et al. Biosensor based on *Thiobacillus thioparus* for measuring thiosulfate and methanethiol. **Canadian Journal of Microbiology**, n.41, p.366–371,1995.

KULAIF, Y. Desenvolvimento de estudos para elaboração do plano duodecenal (2010-2030) de geologia, mineração e transformação mineral. **Relatório Técnico 54**, contrato n. 48000.003155/2007-17, 2009.

KUMAR, J.; KUMAR, S.; D'SOUZA, S. F. Optical microbial biosensor for detection of methyl parathion pesticide using *Flavobacterium* sp. whole cells adsorbed on glass fiber filters as disposable biocomponente. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 21, p. 2100–2105, 2006.

KUMERIA, T.; PARKINSON, L.; LOSIC, D. A nanoporous interferometric micro-sensor for biomedical detection of volatile sulphur compounds. **Nanoscale Research Letters**, n. 6, p. 634, 2011.

LAWRENCE, J.; ROBINSON, K. L.; LAWRENCE, N. Electrochemical determination of sulfide at various carbon substrates: A comparative study. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 673-676, 2007.

LAWRENCE, N. S. et al. A thin-layer amperometric sensor for hydrogen sulfide: the use of microelectrodes to achieve a membrane-independent response for clark-type sonsors. **Analytical Chemistry**, n. 75, p. 2499-2503, 2003.

LEE, E. Y.; CHO, K. S.; RYU, H. W. Characterization of sulfur oxidation by an autotrophic sulfur oxidizer, *Thiobacillus* sp. ASWW-2. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, n. 5, p. 48-52, 2000.

LEE, E. Y. et al. Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 309-314, 2006.

LEI, Y., CHEN, W., MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, n. 568, p. 200-210, 2006.

LEYS, C. et al. Detecting *outliers*: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the media. **Journal of Experimental Social Psychology**, v, 49, n. 4, p. 764-766, 2013.

LEUNG, K. T. et al. Mineralization of p-nitrofenol by pentachlorophenol-degrading *Sphingomonas* spp. **FEMS Microbiology Letters**, n. 155, p. 107-114, 1997.

LI, Q. et al. Insights into the pH up-shift responsive mechanism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. **Folia Microbiologica**, 56, p. 439-451, 2011.

LI, S. et al. Microbial community shifts during the process of marmatite bioleaching. **Hydrometallurgy**, n. 149, p. 127-131, 2014.

LINDNER, E.; PENDLEY, B. D. A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: An analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfall: tutorial. **Analytica Chimica Acta**, n. 762, p. 1-13, 2013.

LIU, H. L.; CHIU, C. W.; CHENG, Y. C. The effects of metabolites from indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans* and temperature on the bioleaching of cadmium from soil. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 638-645, 2003.

LIU H.L., CHIU C.W. and CHENG Y.C. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. **Progress Biochemistry**, n. 39, p. 1953-1961, 2004.

LIU, L. et al. A novel inhibition biosensor constructed by layer-by-layer technique based on biospecific affinity for the determination of sulfide. **Sensors and Actuators B**, n. 129, p. 218-224, 2008.

LODGE, J. P. Métodos de Amostragem e análise do ar. **Lewis Publishers**, Inc. 3 ed., p. 486-492, 1989.

LORS, C.; CHEHADE, M. H.; DAMIDOT, D. pH variations during growth of *Acidithiobacillus thiooxidans* in buffered media designed for an assay to evaluate concrete biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 63, p. 880–883, 2009.

LOZANO, S. V.; SEPULVEDA, T. V.; TORRES, E. F. Lipases Production by Solid-State Fermentation: The Case of *Rhizopus homothallicus* in Perlite. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 227-237, 2012.

LUTHER, G. W. et al. Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: A look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. **Frontiers in Microbiology**, n. 62, p. 1-9, 2011.

MAHENDRA, S. Sulphur management in coarse textured alluvial soils. **Proc. of TSI-FAI symposium**, Sulphur in agriculture, New Delhi, 1988.

MALICKA, J. et al. DNA hybridization using surface plasmon-coupled emission. **Analytical Chemistry**, n. 75, p. 6629-6633, 2003.

MAINIER, F. B.; ROCHA, A. A. H_2S: Novas rotas de remoção química e recuperação de enxofre. 2º **Congresso Brasileiro de PeD em Petróleo e Gás**, 2003.

MAINIER, F. B.; SANDRES, G. C.; TAVARES, S. S. M. Corrosão por sulfeto de hidrogênio (H_2S) e suas implicações no meio ambiente e na segurança industrial. **8º Congresso Iberoamericano de engenharia Mecânica**, Cusco, 2007.

MARTINS, L. R. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação. Tese (Doutorado em Ciências Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MELO, E. I. Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodos de grafite modificado com aminofenóis para determinação de diclorvós em alimentos de origem vegetal. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de pós-graduação multi-institucional UFG, UFSM, UFU, Uberlândia, 2009.

MERCUZA, M. et al. Chromatographic methods applied in the monitoring of biodesulfurization processes – State of the art. **Talanta**, n. 73, p.103–114, 2007.

MIRAZIMI, S. M. J.; ABBASALIPOUR, Z.; RASHCHI, F. Vanadium removal from LD converter slag using bactéria and fungi. **Journal of Environmental Management**, n. 153, p. 144-151, 2015.

MIRZAEI, M. et al. An immobilized *Thiobacillus thioparus* biosensing system for monitoring sulfide hydrogen; optimized parameters in a bioreactor. **Progress Biochemistry**, n. 49, p. 380-385, 2014.

MISHRA, D. et al. Bioleaching of spent hydroprocessing catalyst using acidophilic bacteria and its kinetics aspect. **Journal of Hazardous Materials**, n.152, p. 1082–1091, 2008.

MONTEBELLO, A. M. et al. Monitoring and performance of a desulphurizing biotrickling filter with an integrated continuous gás/liquid flow analyser. **Chemical Engineering Journal**, n. 165, p.500-507, 2010.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes. Ed. Edgard Blucher Ltda, p. 132-133, 1993.

MOTTA, A. R. P. et al. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 15-26, 2013.

MOURA, A. N. Remediação de áreas contaminadas com metais pesados utilizando Acidithiobacillus sp. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Sanitária) – Departamento de Engenharia, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

National Association of Corrosion Engineers (NACE). International Measures of Prevention, Application and Economics of Corrosion Technology. 2016. Disponível em: <https://inspectioneering.com/news/2016-03-08/5202/nace-study-estimates-global-cost-of-corrosion-at-25-trillion-ann> Acesso em: 11 Mar. 2018.

NARAYANA, K. et al. Effects of methyl parathion (*o*,*o*-dimethyl *o*-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 588, n. 1, p. 28–34, 2005.

NEFF, J.; LEE, K.; DE BLOIS, E.M. Produced water: Overview of composition, fates and effects. Cap. 1 In: Produced water, environmental risks and advances in mitigation technologies. Springer Science, 608p., 2011.

NEWBURGH, R. W. Phosphorylation and chemosynthesis by *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**, n. 68, p. 93-97, 1954.

NUNES, G.C. Water treatment in brown fields. In: International Seminar on Oilfield Water Management, 3, 2010, Rio de Janeiro. Apresentações. Rio de Janeiro: IBP. SPE, 2010.

OLIVEIRA FILHO, J. P. S.; CAMAROTTI, A. J.; MORAES, C. M. Redução do teor de H_2S em campos maduros de petróleo. **II Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada**, 2004.

OPRIME, M. E. A. G. Processo combinado químico-bacteriano para a remoção de H_2S de gases. Tese (Doutorado em biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

OPRIME, M. E. A. G., GARCIA Jr., O., CARDOSO, A. A. Oxidation of H_2S in acid solution by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Process Biochemistry**, n. 37, p. 111–114, 2001.

ORTIZ, L. P. C; PABELLO, V. M. L; PIETRINI, R. V. Estado da arte e perspectivas del uso de biossensores ambientales en México. **Revista Internacional de Contaminação Ambiental**, v. 27, n.1, p. 35-45, 2007.

PAPPOE, M.; BOTTARO, C. S. Systematic optimization of a pyromellitic acid background electrolyte for capillary electrophoresis with indirect UV-Vis detection and online pre-concentration analysis of thiosalt anions in treated mine tailings. **Analytical Methods**, v.6, n. 23, p. 9305-9312, 2014.

PAULA, M. S.; SOBRAL, L. G.; OLIVEIRA, D. M. Biodessulfurização de carvão mineral. **XV Jornada de Iniciação Científica** – CETEM, Rio de Janeiro, 2015.

PECINA-TREVIÑO, E. T. et al. Bioflotation of sulfide minerals with *Acidithiobacillus ferrooxidans* in relation to copper activation and surface oxidation. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 58, p. 1073-1083, 2012.

PETERSON, B. A. et al. Conversion techniques in flow injection analysis. **Analytica Chemica Acta**, n. 184, p. 165-172, 1986.

POLLOCK, M. R.; KNOX, R. Bacterial reduction of tetrathionate: A report to the medical research council. **Biochemistry Journal**, v. 37, n. 4, p. 476–481, 1943.

POSTGATE, J. R. The sulphate-reducing bacteria. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1984.

POOR, N. Z. M. et al. An inhibitory enzyme electrode for hydrogen sulfide detection. **Enzime and Microbial Technology**, n. 63, p. 7-12, 2014.

POURBAIX, V. M. Atlas d'équilibres électrochimiques à 25 °C. Von M. Pourbaix, unter Mitwirkung zahlreicher Fachgelehrter. Verlag: **Gauthier-Villars & Cie**., Paris 1963. 1. Aufl., 644 S., zahlr. Abb., geb. NF 140

QI, P.; ZHANG, D.; WAN, Y. Development of an Amperometric Microbial Biosensor Based on *Thiobacillus thioparus* Cells for Sulfide and Its Application to Detection of Sulfate-Reducing Bacteria. **Electroanalysis**, n. 26, p. 1824-1830, 2014.

QUATRINI, R. et al. Draft genome sequence of Acidithiobacillus thiooxidans CLST isolated from the acidic hypersaline Gorbea salt flat in northern Chile. **Standards in Genomic Sciences**, n. 12, p. 1-8, 2017.

RABBANI, K.; CHARLES, W.; RUWISCH, C.; Ho, G. Recovery of sulphur from contaminated air in wastewater treatment plants by biofiltration: a critical review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, n.14, p. 523–534, 2015.

RABTI, A.; ARGOUBI, W.; RAOUAFI, N. Enzymatic sensing of glucose in artificial saliva using a flatelectrode consisting of a nanocomposite prepared from reduced graphene oxide, chitosan, nafion and glucose oxidase. **Microchimica Acta**, n. 183, p.1227–1233, 2016.

RAMESH, R. et al. Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease. **Materials Science & Engineering C**., p. 1-23, 2015.

RAO, G. S.; BERGER, L. R. Requirement of low pH for growth of *Thiobacillus thiooxidans*. **Archives of Microbiology**, v.79, n. 4, p. 338-344, 1971.

RAVICHANDRA, P.; GOPAL, M.; ANNAPURNA, J. Biological sulfide oxidation using autotrophic *Thiobacillus* sp.: evaluation of different immobilization methods and bioreactors. **Journal of Applied Microbiology**, n. 106, p. 1280-1291, 2009.

REDONDO, R. et al. On-line monitoring of gas-phase bioreactor for biogás treatment: hydrogen sulfide and sulfide analysis by automated flow systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n. 391, p.789-798, 2008.

RIAZI, M. R. Characterization and Properties of Petroleum Fractions. Kuwait: American Society for Testing and Materials International, ASTM manual series: MNL50, p. 408, 2005.

RIEDER, E. S. et al. Investigação dos principais processos de corrosão em estações de energia elétrica do Estado do RS. **Revista Matéria**, v. 14, n. 3, p. 1000-1014, 2009.

RODRIGUES, S. C. T. Passagem da análise de contagem de células de levedura para autocontrolo, pelo método sysmex. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

ROSSINI, G. A.; SOBRAL, L. G. S.; OLIVEIRA, D. M. Lixiviação de minério intemperizado com produção *in situ* de ácido sulfúrico. **XXII Jornada de Iniciação Científica** – CETEM-UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.

ROTARIU, L.; BALA, C.; MAGEARU, V. Yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode. **Analytica Chimica Acta**, n. 458, p. 215–222, 2002.

RUIZ, J. G. Desarrrolo de biossensores enzimáticos miniaturizados para sua aplicaion en la industria alimentaria. Tese (Doutorado em Química) Universidad Autótonoma de Barcelona, Barcelona, 2006.

SACRAMENTO, A. I. S. Desenvolvimento de um biossensor para monitorização de acetilcolina, um biomarcador associado à Doença de Alzheimer. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, p. 57, 2014.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

SANDRES, G. C.; MAINIER, F. B. Sistema de gestão integrado interno contra vazamentos acidentais de sulfeto de hidrogênio (H_2S) em refinarias de petróleo. **V Congresso Nacional de Excelência em Gestão**, Niterói, 2009.

SANT'ANNA, A. L. Preconve P7 – Teremos resultados positivos ao meio ambiente? **VII Simpósio Internacional de Ciências Integradas da UNAERP**, Guarujá, 2011.

SASAKI, S. et al. Sulfate sensor using *Thiobacillus ferrooxidans*. **Analytical Chimica Acta**, 347, p. 275-280, 1997.

SATTARAHMADY, N.; TONDRO, G. H.; HELI, G. H. Gold nanoparticles biosensor of Brucella spp. Genomic DNA: Visual and spectrophotometric detections. **Biochemical Engineering Journal**, n. 97, p. 1-7, 2015.

SCHAD, P. A. Preparation and restriction digestion of *Escherichia coli* chromosomal DNA in agarose plugs for use in PFGE. **Bio-Rad US/EG Bulletin 1753**, [2015?].

SCHAEFFER, R. W.; UMBREIT, W. W. Phosphatidylinositol as a wetting agent in sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**, n. 85, p. 492-493, 1963.

SEGUI, P. N. Bioatenuação da geração de sulfeto, por meio da utilização de nitrato, em água produzida proveniente da extração de petróleo. Dissertação. Mestrado em Engenharia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

SEN, S. et al. Highly sensitive hydrogen sulphide sensors operable at room temperature. **Sensors and Actuators B**, n. 115, p. 270-275, 2006.

SHARIHARI, S. R. et al. Dissolution of Sulphur Particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: Substrate for Unattached Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 612-616, 1993.

SHIMADZU. Manual: Capillary Gas Chromatograph GC-2010 Plus. **Shimadzu Corporation**, 2012.

SHINABE, K. et al. Characteristics of hydrogen sulfide removal by Thiobacillus thiooxidans KS1 isolated from a carrier-packed biological deodorization system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p-592-598, 1995.

SHIVELY, J. M.; BENSON, A. A. Phospholipids of *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1679-1683, 1967.

SILVA, A. F. Construção de eletrodos Ag/Ag_2S de configuração convencional, com membrana sinterizada e não sinterizada, para determinação potenciométrica de sulfeto em fluxo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2000.

SILVA, C. R. Spectrophotometric flow injection monitoring of sulfide during sugar fermentation. **Talanta**, nº 85, p. 1703-1705, 2011.

SILVA, J. J. B. Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2004.

SILVA, M. J. A. Modelação da Incerteza e Deteção de *Outliers* para Melhoria do Diagnóstico de Perdas em Sistemas de Abastecimento de Água. Dissertação de mestrado em Matemática e Aplicações, Técnico Lisboa, Lisboa, 2016.

SILVA, S. R.; TONHOLO, J.; ZANTA, C. L. Aplicação de processos oxidativos avançados no tratamento de água produzida de petróleo. **Congresso Brasileiro de Petróleo e Gás**, 2005.

SILVA, P. F. N. et al. Correlação entre o hemocitômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina (H.U.-UEL). Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 4, p. 659-664, 2007.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREEN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterin *Ferrobacillus ferrooxidans*. **Journal of bacteriology**, n. 77, p. 642-647, 1959.

SIMÕES, T. S.; QUEIRÓS, M. A.; SIMÕES, M. O. Química em Contexto. Porto Editora, Porto, 2004.

SLONCZEWSKI, J. L. et al. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. **Advances in Microbial Physiology**, v. 55, n. 1–79, 2009.

SOBRAL, L. G.; OLIVEIRA, D. M.; SOUZA, C. E. G. Biohydrometallurgical process: A practical approach. **CETEM/MCT**, Rio de Janeiro, 2010.

SOUTHAM, G.; BEVERIDGE, T. J. Ennumeration of *thiobacilli* within pH-neutral and acidic mine tailings and their role in the developmente of secondary mineral soil. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 58, p. 1904-1912, 1992.

SOUZA, V. M. Estudo de sequestrantes de H_2S para sistemas de produção de óleo e gás. Dissertação. Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais. COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

STARKEY, R. L. Cultivation of organisms concerned in the oxidation of thiosulphate. **Journal of Bacteriology**, n. 28, p. 365-386, 1989.

STARKEY, R. L.; JONES, G. E.; FREDERICK, L. R. Effects of medium agitation and wetting agents on oxidation of sulphur by *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of General Microbiology**, n. 15, p. 329-334, 1956.

STAROSVETSKY, J.; ZUKERMAN, U.; ARMON, R. H. A simple medium modification for isolation, growth and enumeration of *Acidithiobacillus thiooxidans* (syn. *Thiobacillus thiooxidans*) from water samples. **Journal of Microbiological** Methods, n. 92, p. 178-182, 2013.

STREHLITZ, B., NIKOLAUS, N., STOLTENBURG, R. Protein detection with aptamer biosensors. **Sensors**, n. 8, p. 4296-4307, 2008.

SUZUKI, I.; CHAN, C. W.; TAKEUCHI, T. L. Oxidation of elemental sulfur to sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* cells. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 58, n.11, p.3767-3769, 1992.

SUZUKI, I. et al. Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, v. 11, p. 5163-5168, 1999.

SYED, M. et al. Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review. Canadian Biosystems Engineering/Le génie des biosystèmes au Canada, 48, p. 2.1 - 2.14, 2006.

SZKLO, S. A. Fundamentos do Refino do Petróleo. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005.

TABASSUM, R.; MISHRA, S. K.; GUPTA, B. D. Survace plasmon ressonance based fiber optic hidrogen sulphide gas sensor utilizing Cu-ZnO thin films, **Physical Chemistry Chemistry Physics**, n. 15, p. 11868-11874, 2013.

TAK, M.; GUPTA, V.; TOMAR, M. A highly efficient urea detection using flower-like zinc oxide nanostructures. **Materials Science and Engineering C**, n. 57, p. 38–48, 2015.

TECON, R.; MEER, V. J. R. Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. **Sensors**, v. 8, n.7, p. 4062-4080, 2008.

THOMAS, J.E. Fundamentos de refino do petróleo. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2005.

TIBAZARWA, C. et al. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. **Environmental Pollution**, v. 113, n. 1, p. 19-26, 2001.

TICHY, R. et al. Possibilities for bioleaching processes. **Bioresource Technology**, v. 48, n. 3, p. 221-227, 1994.

TIWARI, K. M. Sulphur in balanced fertilisation in Northen India. **Proc. TSI/PM/IFA symposium on sulphur in balanced fertilization**, p. SI-I/1-SI-1/15, 1997.

TRACKER, B. H.; GLENN, N. L.; DANTE, J. F. Corrosion control in oil gas pipelines. **Pipeline and Gas Journal**, v. 237, n. 3, p. 62-66, 2010.

TRIVEDI, U. B. et al. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. **Sensors and Actuators B**, n. 140, p. 260–266, 2009.

UNFPA, 2016. Disponível em: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/L7007> Acesso em: em 16 Fev. 2016.

URSULA, B.; ANTHONY, P. E. T. Biosensors for environmental monitoring. **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, p. 428, 2000.

VALDMAN, B.; FOLLY, R.; SALGADO, A. Dinâmica, controle e instrumentação de processos. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 2008.

VASCONCELOS, M. A.; LIGÓRIO, W. Contribuição da unidade de remoção de sulfato na redução de perdas por incrustação: um estudo comparado aplicado ao caso de uma plataforma de produção "*offshore*". **Revista da Engenharia de Instalações no Mar da FSMA**, n. 3, p. 1-10, 2009.

VAZQUEZ. F.; ZHANG. J.; MILLERO, F. J. Effect of metals on the rate of the oxidation of H_2S in seawater. **Geophysical Research Letters,** v. 16, n.12, p.1363-1366, 1989

VEIL, J.A. et al. A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas and coal bed methane. **Argonne National Laboratory/US Department of Energy**, 87p., 2004.

VIANNA, W. L. et al. Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, s.2, 2004.

VIDELA, H. Manual of biocorrosion. Lewis Publishers, **Boca Raton**, p. 273, 1996.

VIDYALAKSHMI, R.; PARANTHAMAN, R.; BHAKYARAJ. Sulphur oxidizing bactéria and pulse nutrition – A review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 270-278, 2009.

VIEIRA, F. S. Análise de fixação ocular de condutores através de teste de carga mental. XXIX Congresso Nacional de Pesquisa em Transporte da ANPET, Ouro Preto, 2015.

VIEIRA, V. M. Água produzida no Segmento *onshore* de petróleo–caracterização de cenários na Bahia e prospecção de soluções para gerenciamento. Dissertação de Mestrado. 2011. Centro de pesquisa em geofísica e geologia, Instituto de Geociências. Universidade Federal da Bahia. Salvador–BA.

VIEIRA, V. M. **Modelo de avaliação do gerenciamento da água produzida em operações de produção de petróleo e gás natural em bacias terrestres brasileiras.** 2016. 155 f. Tese (Doutorado em Geologia)-Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2016.

VISHNIAC, W. The metabolism of *thiobacillus thioparus* I.: The Oxidation of Thiosulfate. **Journal of Bacteriology**, n. 64, p. 363-373, 1952.

VIVEROS, A. P; OCHOA, E. G; ALAZARD, D. Comparative electrochemical noise study of the corrosion process of carbon steel by the sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio alaskensis under nutritionally rich and oligotrophic culture conditions. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 18, p. 3841-3847, 2006.

VOGEL, A. I. Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 6a. ed, 2002.

VOGLER, K. G. Studies on the metabolism of autotrophic bacteria II. The nature of the chemosynthetic reaction. **The Journal of General Physiology**, p. 103-117, 1942.

VOGLER, K. G.; UMBREIT, W. W. The necessity for direct contact in sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. **Soil Science**, n. 51, p. 331-337, 1941.

VOSOUGHI, A. et al. Investigating the effect of design parameters on the response time of a highly sensitive microbial hydrogen sulfide biosensor based on oxygen consumption. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 70, p. 106-114, 2015.

WAKSMAN, S. A.; STARKEY, R. L. On the growth and respiration of sulphur-oxidizing bacteria. **The Journal of General Physiology**, p. 285-308, 1923.

WAKSMAN, S. A. Principles of soil microbiology. 2nd edition, Williams and Williams Co., Baltimore, 1932.

WAKSMAN, S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil – IV. A solid medium for the isolation and cultivation of *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of bacteriology**, n. 6, p. 605-608, 1922.

WAKSMAN, S. A.; JOFFE, J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in The soil - II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. **Journal of bacteriology**, v. 7, n. 2, p. 239-256, 1922.

WANG, Y.; YAN, H.; WANG, E. Solid polymer eletrolyte-based hydrogen sulfide sensor. **Sensors and Actuators B**, n. 87, p. 115-121, 2002.

WANG, J. et al. Bioleaching of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture. **Journal of Hazardous Materials**, n. 172, p. 1100-1105, 2009.

WANGA, Y.; CHENB, Q.; ZENGA, X. Potentiometric biosensor for studying hydroquinone cytotoxicity in vitro. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 25, p. 1356–1362, 2010.

WONG, L. S.; CHONG, C. W. Rapid Detection of Heavy Metals with the Response of Carotenoids in Daucus carota. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 5, p. 270-273, 2014.

WU, C. et al. A general excimer signaling approach for aptamer sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2232-2237, 2010.

WU, K. A.; WISECARVER, K. D. Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid. **Biotechnologyc Bioengeenering**, n. 39, p. 447-449, 1991.

XU,D. L.; WANG, D. H. Glucose supplement reverses the fasting-induced suppression of cellular immunity in Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus). **ZOOLOGY**, v.114, n. 5, p. 306–312, 2011.

YANG, Y; ALLEN, E. R. Biofiltration control of hydrogen sulfide 1. Design and operational parameters. **Journal of Air and Waste Management Association**, n. 44, p. 863-868, 1994.

YANG, Y. et al. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sensors and Actuators B**, n. 102, p. 162-168, 2004.

YIN, H. et al. Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile Acidithiobacillus thiooxidans. BMC Microbiology, n. 14, p. 179, 2014.

YOUSEFI, A.; HEJAZI, P.; ALLAHVERDI, A. Evaluation of effective strategies for cultivation of *Acidithiobacillus thiooxidans* as cement-degrading bacteria. **Iranian Journal of Chemical Engineering**, v. 10, n. 2, p. 55-66, 2013.

YU, C, et al. Electrochemical H_2S sensor with H_2SO_4 pre-treated Nafion membrane as solid polymer electrolyte. **Sensors and Actuators B**, n. 86, p. 259-265, 2002.

ZHANGA, Z. et al. Nitrate removal by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on poly(vinyl alcohol) carriers. **Journal of Hazardous Materials**, n. 163, p. 1090-1095, 2009.

ZHANG, J. Z.; MILLERO, F. J. The products from the oxidation of H_2S in seawater. **Geochim Cosmochim Acta**, n. 57, p.1705-1718, 1993.

ZHAO, J. G.; HENKENS, R. W.; CRUMBLISS, A. L. Mediator-free amperometric determination of toxic substances baed on their inhibition of immobilized horseradish peroxidase. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 5, p. 703-708, 1996.

ZHAO, Y.; BIGGS, T. D.; XIAN, M. Hydrogen sulfide (H_2S) releasing agents: chemistry and biological applications. **Chemical Communications,** n. 50, p. 11788-11805, 2014.

ZYCHLINSKY, E.; MATIN, A. Effect of Starvation on Cytoplasmic pH, Proton Motive Force, and Viability of an Acidophilic Bacterium, *Thiobacillus acidophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 153, n. 1, p. 371-374, 1983.