

**MARISTELLA AYALA DIAS SALDANHA**

**SELEÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS LIVRES E  
IMOBILIZADOS PARA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS**

**Departamento De Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Julho/2003**

**MARISTELLA AYALA DIAS SALDANHA**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS LIVRES E  
IMOBILIZADOS PARA A BIOSSORÇÃO DE METAIS  
PESADOS**

Tese apresentada ao programa de  
Pós Graduação em Microbiologia do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais visando à obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Biológicas

**Belo Horizonte/MG**

**Julho/2003**

Tese realizada no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento De Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa.

Dedico esta tese aos meus pais, ao Gustavo e ao meu Querido filho Thiago, que a cada sorriso dava-me forças Para não desistir de caminhar. E ao Gu e meus pais pelo Amor, apoio e compreensão em cada momento da minha vida.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, pela orientação, incentivo, apoio e amizade ao longo do desenvolvimento de todo este trabalho.

A Profa. Dra. Heizir de Castro, pelo apoio e incentivo em todas as fases deste trabalho, redação dos manuscritos, teses e, principalmente, pela paciência e amizade.

Ao Dr, Armindo Santos, pelo apoio nas atividades desenvolvidas no CDTN.

Ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, pelas condições para o desenvolvimento desta tese.

A Coordenação do curso do Pós-Graduação em Microbiologia do ICB, nas pessoas do ex- coordenador, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli e atual coordenadora Profa. Matilde Cota Koury.

A Cristina, secretária do Programa de Pós-Graduação pela dedicação e cooperação. Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, nas pessoas de Sandra e Gustavo, pelas análises de adsorção atômica.

A Profa. Dra. Silvia Beleza de Moura, revisora desta tese.

Aos meus amigos queridos do Laboratório (Adriana, Rafael, Carla, Inayara, Bia, Bibinha, Marjorie, Lud, Poliana, Fátima, Carla Daniela, Elaine, Priscila, Mariana, e a todos os novatos), pela ótima convivência ao longo destes quatro anos e, principalmente, pela amizade que desenvolvemos e que certamente não se perderá.

A querida Fatinha, que sempre me ajudou em todos os sentidos, preparando material, sendo amiga e até um pouco mãe, você certamente tem lugar especial na minha vida.

Aos meus queridos pais, pela oportunidade de chegar aqui, meus irmãos (Flávio, Fabiano, Magda), pelo apoio, carinho e amor.

Ao meu marido Gustavo pela Grande ajuda, compreensão, amor em todos os momentos vividos em torno destes anos.

A Deus e meu Anjo da Guarda pela vida e proteção.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
1. INTRODUÇÃO.	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Biossorção.	12
2.2 Biossorção por fungos	13
2.3 Mecanismo de Biossorção	14
2.3.1 Complexação	14
2.3.2 Coordenação	14
2.3.3 Quelação de Metais	14
2.3.4 Troca iônica	15
2.3.5. Adsorção	15
2.3.6. Microprecipitação	16
2.3. Conceito de Imobilização	16
2.3.1 Métodos de imobilização	17
2.4. Matrizes de Suportes para Imobilização de Células	22
2.5. Utilização de Microrganismos em Sistemas Imobilizados	24
2.6. Aplicação de Células Imobilizadas	25
2.7. Modelos Utilizados na Biossorção	26
<b>3.OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
4. PRODUÇÃO CIENTIFICA	31
4.1. Trabalho 1	32
4,2. Trabalho 2	37
4.3. Trabalho 3	49
5. DISCUSSÃO DA TESE	61
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
8 . ANEXOS	75

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar fungos filamentosos e leveduras capazes de remover metais pesados. Os fungos foram isolados, utilizando-se amostras de tanques de tratamento e águas residuais de indústria siderúrgica. Esses microrganismos foram testados quanto à capacidade de crescer na presença de concentrações crescentes de 5mg a 50mg de cada metal (cromo, níquel e ferro). Foram então selecionados 15 fungos capazes de crescer na presença de metais pesados. A bioadsorção por metais foi similar quando se usou meio mineral (5%, glicose 1%, elementos traços 0,5 %, extrato de levedura 5% e  $\text{NH}_4 \text{SO}_4$  0,1 %) e caldo Sabouraud. A partir de então, todos os experimentos foram realizados em caldo Sabouraud, nas seguintes condições: pH entre 4,0 e 6,0 e temperatura de 35°C. O inóculo utilizado nos testes de bioadsorção foi padronizado 100mg do fungo previamente crescido em ágar Sabouraud. Os frascos foram colocados no agitador durante uma semana e, depois, filtrados com filtro de Millipore (0,45). O sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro de adsorção atômica para análise de metais. Utilizou-se fórmula  $q = (C_f - C_i) \times \text{biomassa (g)} / \text{volume}$  para quantificar a capacidade de adsorção dos fungos filamentosos ativos. Posteriormente, foram selecionados oito fungos filamentosos em soluções sintéticas contendo de 8mg/l a 200mg/l de solução sintética de cada metal (Cr, Fe, Ni). Desses oito fungos, quatro se destacaram pela capacidade de bioadsorver os metais pesados: *Aspergillus terreus* UFMG-F01, UFMG-02, *Aspergillus niger* UFMG-F03 e *Phoma* sp UFMG-F04. A capacidade máxima de bioacumulação dos três metais pelos fungos foi a seguinte: *A. terreus* UFMG-F01 bioacumulou 78,0mg/g de cromo por grama de biomassa, 77,0 mg/g de níquel por grama de biomassa e 10,0 mg/g de ferro por grama de biomassa; UFMG-F02 bioacumulou 101,0mg/g de cromo por grama de biomassa 42,2 mg/g de níquel por grama de biomassa e 72 mg/g de ferro por

grama de biomassa, *A. niger* UFMG-F03 biocumulou 88mg/g de cromo por grama de biomassa, 45,5 mg/g de níquel por grama de biomassa e 30,0mg/g de cromo por grama de *Phoma* sp UFMG-F04 Biocumulou 98,0 mg/g de cromo por grama de biomassa 78,0 mg/g de níquel por grama de biomassa e 55mg/g de ferro por grama de biomassa. Os fungos filamentosos mostraram capacidade de ligações aos metais em escalas diferenciadas e o melhor resultado foi do *Aspergillus terreus* UFMG-F01, que adsorveu os três metais em quantidade superiores á encontrada na literatura para outros fungos. Em outro experimento, foi utilizada biomassa fúngica viva e morta de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 para imobilização em suportes de poliuretani se destacou pela maior adesão a biomassa quando apresentou a porosidade de 43Cm. Foi também observado que a biomassa viva de *Apergillus terreus* UFMG-F01 possui especificidade por cromo e níquel quando testada em influentes siderúrgicos. O mesmo fungo foi imobilizado em alginato. A biomassa imobilizada neste suporte apresentou baixa resistência e baixa capacidade de remover metais quando testado em efluentes siderúrgicos. Entretanto a biomassa imobilizada com alginato mostrou afinidade pelo ferro em soluções sintéticas. Nos experimentos com alumina utilizou-se biomassa fúngica morta. Este suporte possui resistência e porosidade controlada. A biomassa imobilizada neste suporte apresentou grande afinidade pelo elemento ferro e cromo quando testada em soluções sintéticas e efluentes siderúrgicos. O fungo *Aspergillus terreus* UFMG-F01 teve alta capacidade de biossorver os três metais estudados, tanto na biomassa imobilizada quanto na biomassa livre, devendo ser considerado um bom biossorvente para tratamento de efluentes. Desta forma, este trabalho mostra o potencial de fungos filamentosos na biossorção de metais para o tratamento de efluentes siderúrgicos.



## Abstract

The major goal of this work was to isolate and characterize yeast and filamentous fungus able to remove heavy metal particles from the steel industries water residues. Those microorganism were recovered from water treatment reservoirs and residual water generated during steel production. The fungi recovered from those sites were assayed for growth on increasing concentration, ranging from 5 to 100 mg/l, of chrome, nickel or iron. 15 isolates were selected and re-assayed on a mineral or liquid medium Sabouraud media supplemented with the challenging metal and no differences were observed between either medium. Therefore, Sabouraud liquid medium was selected as the media of choice for further assays and growth conditions standardized to pH ranging from 4.0 to 6.0 ay 35°C. The amount of 100 mg of fungal mass retrieved from Sabouraud media was utilized as initial inoculum in all experiments. The liquid fraction of the incubated material was filtered through a 45 um Millipore membrane and the supernatant analyzed on mass spectrometer for heavy metal measurements. The adsorption capacity was estimated though the equation  $q = (C_f - C_i) \times \text{biomass (g)}$ , where q stands for adsorption capacity and  $C_f$  and  $C_i$  for final and initial concentration respectively. From the 15 initially selected isolates, ° filamentous fungus and 1 yeast isolate with the highest q values were chosen. They are then tested again against the heavy metals at concentrations ranging from ° to 200 mg/l, and 4 with the better scores were considered for further applications. They were characterized as *Aspergillus terreus* UFMG-F01 and UFMG-02, *Aspergillus niger* UFMG-F03 e *Phoma* sp UFMG-F04. The isolate UFMG-F01 was able to adsorb 78 mg/g of chrome, 77 mg/g of nickel and 100 mg/g of iron. While the isolate UFMG-F02 adsorbed 101 mg mg/l, 42.2 mg/l and 59.9 mg/l of chrome, nickel and iron respectively The isolate UFMG-F03 was able to adsorb 88 mg/l of chrome, 45.5 mg/l of nickel and 30 mg/l of iron, while the isolate UFMG-F04 adsorbed 98 mg/l, , 78 mg/l and 52.2 mg/l of chrome, nickel and iron respectively. The adsorption values observed with *A. terreus* UFMG-F01 were higher than the usually described for other fungus on the literature. Viable and dead biomass of UFMG-F01 were immobilized on polyurethane, alginate and alumina and challenged with synthetic heavy metal solution as well as steel industry water waste. Polyurethane was, among the materials tested, the one with higher capability of holding fungal biomass at a porosity of 43 / cm. Alginate, for other hand, had poor mechanical resistance and low capacity of synthetic medium. Only dead material was incorporated on alumina and it was able to remove chrome and iron from both waste water and synthetic media. *A. terreus* showed potential for further use as a bio adsorbent in the steel industry and its comertial application should be perused.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as atividades industriais são as principais responsáveis pela poluição dos recursos hídricos por metais pesados. Esses poluentes são descarregados em ambientes aquáticos e terrestres, principalmente como solutos ou partículas, podendo alcançar elevadas concentrações em áreas próximas ao lançamento \*GADD & WHITE, 1993)

Embora exista uma preocupação universal para evitar desastres ecológicos por contaminação, tais eventos continuam acontecendo principalmente através das indústrias siderúrgicas, que são os maiores poluidores da natureza. Entretanto, os órgãos de controle ambiental têm estabelecido padrões cada vez mais rigorosos para o lançamento de efluentes líquidos e sólidos no meio ambiente, exigindo a implantação de tecnologias de tratamento eficientes e práticas. As técnicas normalmente utilizadas na descontaminação de efluentes industriais são lagoas aeróbias, os tanques de lodo ativado, além de processos químicos (ANSELMO et al. 1985). A tendência atual do tratamento de efluentes oriundos de siderurgias implica a utilização de processos biológicos, combinados com os convencionais (GOYAL et al. 2003). Esse procedimento fundamenta-se na utilização de biomassa microbiana, viva ou morta (biossorventes), com capacidade de reter elevadas quantidades de íons metálicos por meio de processos passivos ou ativos (GOMES, 1985). O processo ativo (requer gasto de energia) e passivo (não requer gasto de energia) consistem na ligação do metal à biomassa, sendo denominados como bioacumulação e bioissorção, respectivamente (BLACKWELL et al. 1995). No processo de bioissorção, existe uma variedade de mecanismos envolvidos, entre os quais os mais estudados são: troca iônica, quelação, adsorção, coordenação, complexação e microprecipitação (VOLESKY & HOLAN 1995). No processos exigem grupos diferentes descargas negativas na superfície das células (LARSSON et al. 1992). Além disso, a bioissorção de metais pesados por microrganismos imobilizados é também de grande interesse, pois a sua utilização no tratamento de efluentes industriais reduz os problemas da separação e regeneração da biomassa após a bioissorção (sólido-líquido) e padroniza o tamanho das partículas imobilizadas (ZOUBOULIS et al. 2003). Além destas vantagens, a biomassa imobilizada possui maior concentração de massa, facilita as ligações químicas com íons metálicos e protege a biomassa de ambientes tóxicos o que facilita o tratamento do efluentes (AKSU et al. 2003).

Com o propósito de comparar a capacidade de bioissorção de fungos filamentosos livres e imobilizados no tratamento de efluentes siderúrgicos, o presente trabalho contribui

com novas informações para estabelecer uma metodologia eficiente na remoção de metais pesados presentes em efluentes industriais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biossorção

Os métodos convencionais para remoção de metais pesados de soluções aquosas compreendem oxidação e redução, precipitação, filtração, tratamento eletroquímico e evaporação. Diversas limitações são encontradas nessas técnicas, como um elevado gasto energético, uma remoção metálica incompleta e a geração de larga quantidade de material tóxico, o qual necessita de grandes áreas de depósito (BAI & ABRAHAM, 2003).

Como método alternativo de menor custo, utiliza-se biossorventes, como algas marinhas, bactérias, leveduras, fungos e micélios de fermentações industriais em vários setores industriais em vários setores industriais, devido à capacidade destes organismos de ligação a metais pesados (BAIK et al. 2002). Os biossorventes utilizados na remoção de metais possuem vantagens sobre os métodos convencionais, pois o processo não produz lodo químico, pode ser altamente seletivo, de fácil operação e de baixo custo para o tratamento de grandes volumes (DONMEZ & AKSU, 2002). Nesse sentido, a biossorção de metais pesados por materiais de origem biológica é uma alternativa viável para a descontaminação de efluentes industriais uma vez que os microrganismos podem simultaneamente o sequencialmente acumular metais sem a participação do metabolismo são denominados biossorção, ao passo que os processos dependentes são chamados de bioacumulação (VOLESKY, 1990). As ligações do metal em células mortas ocorrem rapidamente na superfície da célula (processo passivo). O mecanismo que liga os íons metálicos (tamanho, carga iônica e espécie metálica), das espécies de microrganismos e das condições ambientais (pH, Temperatura, força iônica, existência de competição orgânica ou inorgânica de metais quelantes).

O lodo ativado é bem conhecido como biomassa utilizada na purificação de alguns efluentes siderúrgicos e águas domésticas. Parte dos microrganismos cresce em sistemas de tratamentos e podem ser separados e utilizados para remoção de metais pesados (AKSU et al. 2002). No tratamento de efluentes ocorrem ligações ativas, este processo é denominado bioacumulação, envolve o transporte de íons para o citoplasma da célula (SAG & KUTSAL, 1996).

## 2.1 Biossorção por Fungos

Fungos filamentosos têm sido largamente utilizados industrialmente tanto na bioconversão de muitos compostos como a biodegradação de poluentes de efluentes siderúrgicos. Fungos também são capazes de sequestrar e acumular metais pesados, essas propriedades são resultados da ativa ligação do metal através de reações metabólicas e ligações passivas. Isso ocorre devido à química da célula e seus constituintes que são basicamente grupos carboxila e fosfato que possuem cargas negativas que fornecem à célula microbiana potente poder de acumular íons metálicos (ARICA et al. 2003). Possuem também constituintes muito importantes como manana-B-glucana e quitosana, polímeros estruturais componentes de parede celular responsáveis pela sorção de metais devido ao sítio de nitrogênio e do grupo amina (BAIK et al. 2002). Esses componentes juntamente com as proteínas, lipídeos e pigmentos existentes na parede celular, possuem alto potencial como sítios de captação de metais (REMACLE, 1990). Um desses pigmentos, a melanina, localizada no exterior da parede celular, contém grupos carboxila, fenol, hidroxila e amina e apresenta alta capacidade de se ligar a íons metálicos (FORGATY & TOBIN, 1996).

Na literatura são citados alguns fungos filamentosos como bons biossorventes, *Rhizopus nigricans* tem sido bastante estudado quanto à capacidade de adsorver cromo hexavalente (BAI & ABRAHAM, 2001). A capacidade desse fungo adsorver metais tem sido relacionada à presença de várias unidades de quitina-quitosana, que servem de matriz para os grupos  $-COOH$  e  $-NH_2$ , responsáveis pela ligação dos íons metálicos (TSEZOS, 1986; BAI & ABRAHAM, 2001). Os fungos *Mucor rouxii* e *Aspergillus niger* exibem uma excepcional biossorção do elemento chumbo. Esses fungos adsorvem mais metal do que o relatado para carvão ativado e outros microrganismos. O fungo *M. rouxii* demonstra alta afinidade seletiva por chumbo, e também afinidade pelos íons metálicos Zn, Ni e Cu. Isso é muito importante na aplicação do biossorvente uma vez que os efluentes industriais contêm vários metais diferentes. Os fungos *Polyporus versicolor* e *Phenerochaete chrysosporium* são efetivos no tratamento de águas residuais contendo chumbo níquel e cromo (YETIS et al. 1998).

## **2.2. Mecanismos de Biossorção**

### **2.2.1. Complexação**

A complexação é definida como a associação de dois ou mais elementos químicos, em que cada um é capaz de existir de maneira independente. Quando um dos elementos é um íon metálico, a entidade resultante é conhecida como complexo metálico (HARTMEIER, 1988).

### **2.2.2. Coordenação**

Quando um átomo metálico se liga a um outro átomo não metálico este último é chamado receptor, e o metálico, coordenador. A ligação é chamada de ligação coordenada. O complexo metálico é um tipo particular de coordenação, por isso os termos coordenação e complexação são frequentemente usados como sinônimos (HARTMEIER, 1998).

### **2.2.3. Quelação de Metais**

Trata-se de um tipo especial de complexação. Nesse tipo de interação, uma molécula denominada ligante, com mais de um grupo ou radical capaz de estabelecer ligação com íon metálico, forma um anel heterocíclico onde o íon metálico, denominado agente quelante, participa como ponte de ligação entre os grupos do ligante. Geralmente, os ligantes são compostos orgânicos (HARTMEIER, 1998).

### **2.2.4. Troca Iônica**

Tal mecanismo é o intercâmbio de partículas eletricamente carregadas que são formadas pela perda e/ou ganho de elétrons. Provavelmente, trata-se do fenômeno mais comum na biossorção. Nesse processo, um sólido ou um líquido inorgânico ou orgânico contendo íons móveis (denominados trocador iônico), troca estes íons por outros de mesma carga (+ ou -), presente em solução, na qual o trocador iônico é essencialmente

insolúvel. Essa relação é em geral, reversível. A capacidade de troca de íons ocorre devido a um excesso de cargas elétricas (positivas ou negativas) da estrutura do trocador iônico, equilibrada pela carga dos íons ancorados. Desse modo, a troca iônica deve promover a assimilação de uma quantidade de íons da solução, de carga total equivalente à carga e garantir a eletro neutralidade (HARTMEIER, 1988).

### **2.2.5. Adsorção**

A adsorção é o processo pelo qual íons ou moléculas aderem a superfícies sólidas. Nesse processo, ela pode ser negativa quando a adsorção de cátions se dá por sítios negativos e é positiva quando a adsorção de ânions ocorre através de sítios positivos. Este fenômeno que define a composição e exotérmico. Nesse sentido, a adsorção é o fenômeno que define a composição química da superfície (HARTMEIER, 1988).

### **2.2.6. Microprecipitação**

A microprecipitação de metais ocorre quando substâncias ao redor da célula convertem íons solúveis em sais insolúveis. Devido à imposição de condições química as células microbianas são compostas de polissacarídeos, proteínas e lipídeos. O metal se liga a grupos funcionais desses compostos como carboxila, hidroxila, sulfato, fosfato e aminas (KUYUCAK & VOLESK, 1988).

A carga e a geometria desses grupos de ligação são bastante diversificadas, podendo resultar até em uma seletividade na remoção dos íons metálicos. Nesse contexto, o conhecimento da estrutura química dos materiais biológicos é de grande interesse para a ligação do metal ao biossorvente. Muitos microrganismos com superfícies constituídas de ácidos e polissacarídeos mantém a habilidade para complexar metais pesados e apresentam grupos amino, carboxila, fosfato e sulfato. Os grupos amino e carboxila, fosfato e sulfato. Os grupos amino e carboxila, os elementos nitrogênio e oxigênio e os peptídeos estão disponíveis para a ligação de coordenação com os íons metálicos. A ligação que é formada, por exemplo, entre fungo e íon metálico pode ser acompanhada pelo deslocamento de prótons, dependendo da extensão da protonação, determinada pelo pH. Os íons metálicos estão eletrostaticamente ligados oxigênio da carboxila não protonada e ao sulfato. Esta adição se faz com os grupos ligantes funcionais,

os quais são frequentemente polissacarídeos que possuem a propriedade de troca iônica (SAY et al. 2001).

### **2.3. Conceito de imobilização**

A imobilização é um termo geral que descreve as muitas formas de as células e enzimas serem fixadas, encapsuladas ou aprisionadas em suporte sólido. O conceito de células imobilizadas refere-se a biomassa ou microrganismo fisicamente confinado ou localizado em uma região definida do espaço, de tal forma que suas características sejam mantidas (PRADELLA, 1987; PULITANO, 1992). Tem-se reconhecido que a imobilização da biomassa microbiana reduz os problemas de separação e regeneração da biomassa após a biossorção (sólido-líquido) e padroniza o tamanho das partículas imobilizadas (ZOUBOULIS et al. 2003). Além dessas vantagens, a biomassa imobilizada possui maior concentração de massa, facilita as ligações químicas com íons metálicos e protege a biomassa de ambientes tóxicos, facilitando o tratamento dos efluentes (FREEMAN & LILLY, 1998).

Processos que utilizam imobilização de células em crescimento têm sido mais promissores do que a tradicional fermentação com células livres, desde que as células microbianas imobilizadas sejam utilizadas em processos contínuos e com vários ciclos (McCABE et al. 2001). Assim a matriz para imobilização é um dos fatores chave na aplicação ambiental da biomassa imobilizada. Assim a matriz polimérica determina a força mecânica e a resistência química para o produto final da biossorção e da dessorção. As principais técnicas de imobilização normalmente aplicadas em testes de biossorção são baseadas: na adsorção em suportes inertes, na encapsulação e no aprisionamento em matrizes poliméricas (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997).

Muitos estudos estão sendo relacionados com polímeros e poli sulfonato na imobilização de bactérias e poliacrilamida e glutaraldeído para fungos e algas para remoção de cobre e cromo (BAI & ABRAHAM, 2003). Para obtenção de sistemas eficientes são empregadas normalmente combinações de diversas técnicas. Uma combinação típica é a adsorção do biocatalisador em um gel, seguida da técnica de ligação cruzada, com o uso de agentes bifuncionais. Essa métodos podem ser feitos através de suporte sólido (ligações covalentes e adsorção) ou por inclusão (matriz ou capsulas). No primeiro caso, a ligação pode ser feita entre enzimas, e no segundo, através



de carreadores que entram na matriz de polímeros, ou por aprisionamento pela membrana (HARTMEIER, 1988).

### **2.3.1 Métodos de imobilização**

Segundo HARTMEIER (1988) existem seis métodos de imobilização de células, enzimas ou organelas, os quais pode ser combinados entre si, originando novas técnicas. As vantagens e desvantagens de cada método são apresentadas no **Quadro 1**.

**QUADRO 1:** Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Encapsulação	É utilizada para enzimas, células, sistemas de coenzimas e multienzimas. Mínima alteração do biocatalizador. Incorporação de partículas para aumento de densidade e propriedades magnéticas.	Diluição de géis. Propriedades mecânicas pobres de alguns géis. Inativação de monômeros na ligação cruzada. Difusão restrita de muitos substratos.
Adsorção	Simples, sem modificação de célula e enzima. Possível regeneração do suporte. Baixo custo.	Imobilização superficial. Mudança na força iônica podendo inibir adsorção. Controle ambiental de pH, temperatura e força iônica.
Ligação Covalente	Não é afetada por pH, força iônica do meio ou concentração do substrato. Ligação específica. Disponibilidade de carreadores e métodos.	Envolve tratamento químico. Com modificação do sítio ativo. Custo elevado. Dificuldade no processo. Regeneração impossível ou difícil.
Ligação Iônica	Simples, sem modificação da célula.	É afetada pelo pH, Ligação fraca.
Ligação Cruzada	São formados compostos insolúveis e várias ligações.	Perda de atividade. Envolve agentes quelantes.
Aprisionamento	Sem modificação química da célula e da enzima.	Limitação da difusão, não afeta para substratos de alto peso molecular. Susceptível a inativação da enzima. Perda contínua da enzima devido ao tamanho dos poros.

Fonte: Hartmeier, 1988.

### 2.3.1.1. Encapsulação

A técnica consiste na utilização de uma grande variedade de matrizes carreadoras. Esse método não tem sido muito utilizado para imobilização de enzimas, mas tem sido aplicado com muito sucesso para células e organelas (MOSBACH, 1976).

A encapsulação é realizada por meio do envolvimento do biocatalisador pelo polímero, sendo as células aprisionadas por uma unidade do polímero. Cria-se uma barreira, de forma que o suporte e os produtos das moléculas passem livres, mas o biocatalisador seja retido. Uma vez que os biocatalisadores são mais importantes que os suportes com o qual agem, diferentes tipos de suportes têm sido testados visando a uma melhor combinação entre o suporte, o biocatalisador e a eficiência do processo. Deve-se considerar, ainda a concentração da solução na qual o biocatalisador age livremente e é confinado no sistema de encapsulação (LEFEBVRE & VICENT, 1995).

### 2.3.1.2. Encapsulação pela técnica sol-gel em esferas de alumina

A técnica sol-gel é um processo químico por via úmida, no qual gotas de uma solução contendo alumina são solidificadas por reação química de precipitação de um hidróxido metálico. A solução contida nas gotas, denominada “solução de alimentação”, é composta de nitrato de alumínio e de uma fase sólida composta de alumina ativada, parcialmente neutralizada (com alta superfície específica), e de uma solução de álcool polivinílico (PVA) e de etanol.

As gotas são produzidas por um sistema mecânico, constituído por um vibrador, ao qual se acopla um bocal de diâmetro específico. Ao se desprenderem do bocal, devido a tensão superficial, as gotas assumem forma cada vez mais esférica à medida que caem em direção à superfície da solução amoniacal, contida na coluna de vidro e do equipamento denominado “coluna de precipitação”. Durante a queda, as gotas atravessam uma atmosfera de amônia, quando então ocorre a seguinte reação na superfície das mesmas:



Em que: “X” pode assumir os valores 1 e 3, dependendo da temperatura e do pH do meio de precipitação.

Essa reação forma uma película de característica gelatinosa em torno de toda a superfície da gota, conferindo-lhe resistência ao impacto com a superfície da solução amoniacal, contida na coluna de precipitação. A sobrevivência das gotas ao impacto com a superfície da solução amoniacal depende da velocidade de formação da película gel e da natureza elástica do gel formado. Para se alterar a velocidade de formação da película gel, atua-se na natureza do alumínio. Assim, ao invés de realizar a precipitação a partir de uma solução verdadeira, procede-se por meio de uma dispersão coloidal denominada “sol”. Para aumentar a natureza elástica das gotas no momento do choque (SANTOS, 1990). Durante o percurso na coluna, as esferas gelatinosas resultantes continuam a sofrer a reação de precipitação, devido à difusão da solução amoniacal para o seu interior, e são coletadas em um recipiente plástico contendo esferas.

Parte da solução amoniacal é retirada e fica em repouso por um período suficiente para a reação se completar. As esferas são, então, retiradas da solução amoniacal, sofrem várias lavagens com água deionizada para remoção do nitrato de amônio, e são submetidas a um tratamento térmico para remoção do PVA introduzido. Através do tratamento térmico, são ajustadas as características físicas desejadas, tais como: porosidade, densidade, resistência mecânica à compressão, superfície específica.

### **2.3.1.3. Adsorção**

Nesse caso, o material a ser imobilizado é ligado à superfície do suporte por forças físicas, como a de Van der Waals, e por outros tipos de interações como ligações iônicas, pontes de hidrogênio, além de interações hidrofóbicas. Estas são simples e rápidas, excedendo pouca influência na estrutura da biomassa. Para se estabelecer uma ligação adsorviva, basta colocar o adsorvente em contato com uma suspensão aquosa de biomassa por um tempo suficiente. Essa técnica apresenta desvantagens devido à relativa fragilidade das forças de adsorção, as quais podem ser rompidas por variações na temperatura, no pH e na composição do substrato (BERKELEY et al. 1980).

#### **2.3.1.4. Ligação Covalente**

Na ligação covalente, os átomos estão ligados através do compartilhamento de pares eletrônicos, obtendo-se ligações fortes entre as enzimas, sendo pouco utilizada para células. Uma desvantagem deste método é a tensão resultante da intensidade da ligação á qual se sujeita a enzima, o que pode levar a variações consideráveis na conformação enzimática, resultando em perda de parte da atividade catalítica (HARTMEIER, 1988).

#### **2.3.1.5 Ligação Iônica**

O método de ligação iônica é baseado na atração eletrostática entre grupos de cargas opostas presentes no suporte e na espécie que se deseja imobilizar. Esse processo é bastante simples e pode ser realizado em temperatura e pressão ambientes através de agitação das partículas do suporte e, solução. Pode ser feito também pela suspensão do material a ser imobilizado ou através de um fluxo dessas soluções ou suspensões sobre partículas do suporte (HARTMEIER, 1988).

#### **2.3.1.6 Ligação Cruzada**

Nesse processo, unidades isoladas de células, enzimas ou organelas são ligadas uma às outras através de reagentes bi ou multifuncionais, que estabelecem ligações químicas com grupos de superfície da biomassa. Com a multiplicação dessas ligações, são formadas moléculas muito grandes, geralmente insolúveis. Embora esse Método seja relativamente simples, apresenta algumas desvantagens. Geralmente, as partículas obtidas por este método são gelatinosas e pouco resistentes. Quando se empregam substratos de peso molecular elevado em concentrações reduzidas, o acesso dos mesmos aos sítios ativos é limitado pelas condições desfavoráveis à difusão. Como esse método usualmente envolve ligações do tipo covalente, pode ocorrer perda na conformação do material imobilizado, com conseqüente perda de atividade (HARTMEIER, 1988).

### 2.3.1.7 Aprisionamento em membrana

Este método tem por objetivo delimitar o espaço no qual o biocatalizador exerce sua atividade, utilizando-se uma membrana semipermeável que possibilita a difusão de substrato e produtos, retendo a espécie imobilizada em seu interior. As vantagens desse método consistem na boa estabilidade mecânica e química do sistema, além da possibilidade de controle da reação através da difusão seletiva de substrato e produtos (HARTMEIER, 1988).

## 2.4. Matrizes de Suportes para Imobilização de Células

São utilizados variados tipos de materiais na imobilização de células, e de forma geral, é possível classifica-los em suportes orgânicos e inorgânicos. No Quadro 2, são mostrados os suportes mais comumente utilizados.

**Quadro 2:** Suportes mais utilizados na imobilização de microrganismo (Adaptado de KOLOT, 1981).

Compostos orgânicos			Compostos inorgânicos	Outros materiais
A	B	C		
K-Carrageno	Gelatina	Poliestireno	Cerâmica	Bagaço de cana de açúcar
Alginato	Colágeno	Poliuretano	Silica/Alumina	Fragmentos de madeiras
Pectina		Poliacrilamida	Vidro	Serragem
Quitina		Cloreto de polivinila	Zircônia	
Celulose		Resinas de troca Iônica (Zeveg).	Aço inoxidável	

Segundo vários autores, a seleção do suporte para imobilização de células envolve critérios específicos (GHOMMIDH et al. 1982; HARMEIER., 1988, PHILLIPS & POON,

1988). Em todos estes, deve-se levar em consideração os seguintes fatores: a massa do biocatalizador, o comportamento cinético e a estabilidade do material a ser imobilizado.

A massa do biocatalizador refere-se não somente à quantidade real das células que sofrem imobilização, mas também ao fato de que, no decorrer do processo, não deve ocorrer perda de atividade ou sítios ligantes, e que o comportamento cinético do complexo (biocatalizador e suporte) seja mantido.

Para que um material possa ser usado como suporte, deve-se levar em consideração, sobretudo, a resistência do suporte do meio em que este interage. Nesse sentido, o suporte deve ser pouco ou muito pouco solúvel no meio, principalmente nas condições de operação. A estrutura do suporte é extremamente importante, principalmente a superfície de contato e a porosidade, fatores estes que afetam a atuação do biocatalizador. De acordo com os fatores acima mencionados, os suportes podem ser classificados da seguinte maneira:

- suportes não porosos
- suportes porosos

Além desta estrutura básica, é possível ainda, usar um mesmo suporte em diferentes configurações, como fibra ou membrana. Suportes não porosos possuem superfície de contato extremamente baixa, dificultando a fixação dos biocatalizadores. Esse problema pode ser contornado. Com o uso de suportes sob a forma de fibras ou pequenas partículas, Entretanto, partículas ou mesmo fibras são difíceis de remoção no reator, pois diminuem a pressão e velocidade de escoamento. Por outro lado, os mesmos oferecem a vantagem de fixar o biocatalizador externamente no suporte, colocando-o, imediatamente, em contato com o meio em que este interage. Atualmente, suportes porosos, orgânicos ou inorgânicos são encontrados no mercado, como, o poliestireno macro reticular, um suporte poroso é que todos os agentes importantes no processo, principalmente as grandes moléculas dos biossorventes, penetram na superfície interna ou na estrutura do suporte para garantir a fixação. Além disso, substratos com moléculas maiores que as dos biocatalizadores podem não penetrar nos poros e, nesse caso, não ocorreria a reação desejada já que grandes quantidades de biocatalizador não devem ser utilizadas. Em suma, as vantagens dos materiais porosos são: grande área para imobilização, proteção do biocatalizador e carga superficial oposta à do biocatalizador (HARTMEIER, 1988).

## 2.5. Utilização de Microrganismos em Sistemas Imobilizados

A imobilização de microrganismos pode contribuir na remoção de metais, na produção de exopolímeros, no transporte e sequestro intracelular e na produção de compostos orgânicos e inorgânicos insolúveis (WHITE et al. 1997). Vários autores têm descrito a utilização de microrganismos imobilizados em processos de bioadsorção, dentre os quais o *Trametes versicolor* e *Pleurotus sajor caju* são fungos brancos e fortes, decompositores de vários xenobióticos, que podem ser utilizados na adsorção de mercúrio em soluções aquosas (ARICA et al. 2003). Outros exemplos são: o *Fomitopsis pinicola*, imobilizado com alginato, utilizados como bioadsorvente de cádmio (LEBEAU et al. 2002); o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, imobilizado em esponjas de poliuretano, como purificador de efluentes de indústria têxtil (YANG & YU, 1996). Muitos microrganismos imobilizados por encapsulação são aplicados, também no tratamento de efluentes contaminados oriundos de indústrias de alimentos (HSU et al. 1996).

Nos processos aeróbios, a imobilização possibilita o controle do crescimento celular pela adição proporcional de nutrientes sem causar maiores problemas no biorreator (GADD, 1986; TZESOS, 1986). Este controle é necessário, devido à taxa limitada de oxigênio no meio da cultura, onde ocorrem maiores concentrações celulares (NILSON et al. 1980). Outro exemplo é o microrganismo *Acetobacter aceti* que produz mais ácido acético imobilizado, pois a bactéria possui proteção contra as variações de pH e temperatura (JUDIT & BÉLA, 1996).

Tanto células vivas como mortas podem ser usadas em sistemas imobilizados, embora o emprego da biomassa viva traga algumas vantagens, pois o microrganismo pode aproveitar certas substâncias do meio para seu metabolismo. Os métodos mais comuns de imobilização de microrganismos envolvem o uso de alginatos, poliacrilamidas e sílica gel (CHIBATA et al. 1986).

Sendo assim, estudos têm demonstrado que microrganismos imobilizados apresentam resistência às condições adversas apresentadas pelo ambiente (SAG,2001).



## 2.6. Aplicação de Células Imobilizadas

Embora não fossem conhecidos os princípios da imobilização, a aplicação de células imobilizadas em processos de larga escala industrial era amplamente empregada na produção de compostos orgânicos, desde os primórdios do século XIX. Nesse período, o vinagre era produzido em tanques que continham pedaços de madeira, cerâmica, carvão e outros materiais, sobre os quais eram gotejadas soluções aquosas contendo etanol. Propiciava-se, assim, o desenvolvimento de bactérias na superfície dos suportes (PHILLIPS & POON, 1998). A utilização de células imobilizadas é hoje muito recorrente na incorporação de biomassa microbiana nos processos de engenharia. Várias espécies microbianas têm sido encapsuladas, em diversas matrizes para diferentes aplicações industriais, ambientais, analíticas e quimioterápicas (ANSELMO et al. 1985; FRAVEL et al. 1985).

Na aplicação em quimioterápicos, pode-se citar a produção de antraquinona por células imobilizadas de *Morinda Citrifolia* (BRODELIUS et al. 1980), a produção de antibióticos como Bactrim (trimetoprim+ sulfá) e Penicilina G, por células imobilizadas de *Bacillus subtilis* e *Penicillium Chrysogenum* em poliacríamida (MORIKAWA et al. 1980). Na obtenção de pró-insulina utiliza-se a técnica de encapsulação em agarose, a partir de células viáveis de *Bacillus subtilis* (MOSBACH et al. 1983). A produção de ácido málico e ácido fumárico eobtida por células imobilizadas de *Brevibacterium flavum* e de *Aspergillus* sp. As células de B. Flavum aumentaram o efeito catalítico de *Aspergillus* sp na produção destes ácidos (CHIANG et al. 1997).

Na aplicação ambiental, as técnicas de imobilização são utilizadas na agricultura como biocontrole de pragas (BASHAN, 1986, AXTELL & GUZMAN, 1987), e biocontrole do solo (CONNICK, 1982). Além dessas aplicações, relata-se que a imobilização de fungos filamentos tem-se mostrado como ótimo ligante de metais de águas industriais, devido ao maior poder de adesão conferida às células (FRY & MELHORN, 1994). A imobilização de material biológico é um método opcional de tratamento de águas residuais, aplicando em conjunto com métodos convencionais para tratamento de águas contaminadas com metais pesados (COSTA & FRANÇA, 1996).

Todos esses sistemas de células imobilizadas constam na utilização de substratos e obtêm bons resultados na produção de enzimas devido à facilidade de

manuseio e baixos custos para as indústrias, sobretudo quando comparados aos sistemas que utilizam células livres.

## 2.7. Modelos utilizados na Biossorção

A presença de uma ou várias espécies metálicas nas soluções sintéticas e efluentes, durante a biossorção pode ser significativa e trazer consequências favoráveis na capacidade de biossorver metais pesados. Em geral, no efluente são encontrados vários tipos de poluentes (Multi componentes), o que torna mais difícil a ocorrência do equilíbrio. Nos estudos de mono e multi-componentes são considerados os modelos de Langmuir e Freundlich para definir o equilíbrio de ligações dos componentes metálicos e a afinidade da biomassa pelo íon metálico (PAGNANELLI et al. 2003).

O modelo de Langmuir tem como premissas:

- a superfície do sólido é constituída por um certo número “S” de sítios de adsorção.
- as espécies adsorvidas (adsorvatos) interagem somente com um sítio ativo;
- a adsorção ocorre apenas em uma camada;
- a energia de adsorção é idêntica para todos os sítios e independe da presença das espécies adsorvidas em qualquer outro sítio.
- é utilizada para baixas concentrações de metais.

Resulta na seguinte expressão:

$$q = \frac{q_0 \times K \times C_f}{1 + K C_f}$$

Quando a concentração de metais é muito baixa, “ $C_f \rightarrow 0$ ”, tem-se que “ $(1 + K C_f) \approx 1$ ”, resultando:  $q = q_0 k C_f$ . Portanto, em baixas concentrações, a quantidade absorvida, é

diretamente proporcional à concentração residual final (sendo representada por uma reta) cuja inclinação informa a afinidade entre o adsorvente e o adsorvato. Por outro lado, quando se obtém altas concentrações, “ $K_{cf} \geq 1$ ”, e “ $(1+K_{cf}) \approx K_{cf}$ ” resulta em:  $q = q_0$ . Em concentrações elevadas, a capacidade de adsorção tende a seu valor máximo, definido como capacidade de carregamento.

O modelo de Freundlich é um modelo empírico que propõe uma distribuição exponencial dos diversos sítios de adsorção. A equação que descreve este modelo é:

$$q = K^* \times C^{1/n}$$

Em que “ $K^*$ ” e “ $n$ ” são constantes do modelo de Freundlich.

Essas constantes são determinadas ao se linearizar a equação, a qual representa bem os resultados experimentais para faixas medianas de concentrações em sistemas, para os quais as premissas do modelo de Langmuir não são válidas. Esse modelo não fornece informações referentes à capacidade de carregamento da biomassa.

Nesses modelos, podem-se também utilizar dois metais simultaneamente. Estudam-se as isotermas de sorção de cada um através de gráficos tridimensionais, verificando se o biossorvente na presença de dois metais, acelera sua adsorção ou se um metal compete com o outro, o que diminui, o poder de adsorção do biossorvente. Logo, é necessário construir isotermas para a avaliação quantitativa da capacidade de biossorção do material adsorvente (CHONG & VOLESKY, 1995). Para cada metal em estudo, são testados dados específicos que ocorrem para o traçado de uma isoterma, plotando-se a capacidade de biossorção em função da concentração residual final de equilíbrio (TSEZOS, 1995). Geralmente, a forma das isotermas é hiperbólica, tendendo para uma reta paralela ao eixo das abscissas, quando concentrações finais se tornam mais elevadas e a capacidade de biossorção se aproximam de seu valor máximo ou de saturação, o que configura a capacidade de carregamento.

A inclinação inicial das isotermas de biossorção, para baixas concentrações iniciais, fornece informações referentes a afinidade entre biomassa e o íon metálico em

solução. A capacidade de bioadsorção das biomassas é afetada por diversos fatores, tais como:

- a) pH da solução;
- b) Temperatura;
- c) Tipo de ânion associado ao cátion metálico;
- d) Presença de outros íons metálicos;
- e) Forma iônica do íon metálico de interesse (VOLESKY, 1990).

As isotermas são construídas a partir de um material de massa  $m$ , que é agitado em um volume  $V$  de uma solução com uma concentração de soluto ( $C_0$ ), em uma determinada temperatura, após um período de tempo necessário para atingir o equilíbrio (aproximadamente 24 horas). Nessa situação, o soluto tem uma distribuição definida entre as fases sólida e líquida. Repetindo-se esse procedimento para soluções crescentes do soluto, é possível construir uma isoterma de adsorção que relacione a capacidade de adsorção do sólido com a concentração residual do soluto, a uma determinada temperatura. A capacidade de bioadsorção das biomassas é afetada tanto pela temperatura quanto pelo pH. Contudo, o pH tem maior influência na capacidade de bioadsorção. Seguindo os modelos já propostos para descrever quantitativamente o fenômeno de adsorção, VOLESKY (1990) considera que os modelos de LANGMUIR e FREUNDLICH são os que mais correlacionam os dados experimentais para bioadsorção.

Devido ao aumento da poluição ambiental nos recursos hídricos em consequência do crescimento do setor industrial, a legislação ambiental tornou-se mais rigorosa, levando tal setor a buscar metodologias alternativas para o tratamento de efluentes siderúrgicos. Sendo assim, a proposta do presente trabalho foi investigar a utilização de fungos filamentosos livres e imobilizados em esponjas de poliuretano, alginato e esferas de alumina como bioadsorventes de metais pesados (cromo, níquel, ferro).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Comparar fungos filamentosos livres como material sorvente de metais pesados, presentes em soluções sintéticas e efluentes industriais.

#### **• Objetivos Específicos**

- Isolar e identificar fungos filamentosos a partir de efluentes siderúrgicos e selecionar linhagens mais adaptadas para testes de remoção de metais de soluções sintéticas e efluentes.
- Avaliar a bio sorção de metais pelo bio sorvente, em soluções sintéticas e efluente, a partir da utilização de bio sorvente imobilizados em poliuretano, alginato e alumina.
- Estudar a adequação da técnica sol-gel para imobilização de biomassa inativa, objetivando a produção de esferas bio sorventes.

## **4.0 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

## Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix

M.A. Dias<sup>1</sup>, I.C.A. Lacerda<sup>1</sup>, P.F. Pimentel<sup>2</sup>, H.F. de Castro<sup>3</sup> and C.A. Rosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, C.P. 486, Belo Horizonte, MG, Brazil, <sup>2</sup>Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, C.P. 706, 31170-000, Belo Horizonte, MG, Brazil, <sup>3</sup>Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, C.P. 116, Lorena, 12600-970, SP, Brazil

2001/194: received 2 July 2001, revised 8 October 2001 and accepted 15 October 2001

M. A. DIAS, I. C. A. LACERDA, P. F. PIMENTEL, H. F. DE CASTRO AND C. A. ROSA 2002.

**Aims:** The aim was to investigate the biosorption of chromium, nickel and iron from metallurgical effluents, produced by a steel foundry, using a strain of *Aspergillus terreus* immobilized in polyurethane foam.

**Methods and Results:** *A. terreus* UFMG-F01 was immobilized in polyurethane foam and subjected to biosorption tests with metallurgical effluents. Maximal metal uptake values of 164.5 mg g<sup>-1</sup> iron, 96.5 mg g<sup>-1</sup> chromium and 19.6 mg g<sup>-1</sup> nickel were attained in a culture medium containing 100% of effluent stream supplemented with 1% of glucose, after 6 d of incubation.

**Conclusions:** Microbial populations in metal-polluted environments include fungi that have adapted to otherwise toxic concentrations of heavy metals and have become metal resistant. In this work, a strain of *A. terreus* was successfully used as a metal biosorbent for the treatment of metallurgical effluents.

**Significance and Impact of the Study:** *A. terreus* UFMG-F01 was shown to have good biosorption properties with respect to heavy metals. The low cost and simplicity of this technique make its use ideal for the treatment of effluents from steel foundries.

### INTRODUCTION

Metal accumulation by micro-organisms has received much attention in recent years due to its potential application for both detoxification and metal recovery from industrial wastes. The biosorption of heavy metals such as Cu, Zn, Cd, Pb, Fe, Ni, Ag, Th, Ra and U by microbial biomass has been observed for several microbial species, including filamentous fungi such as *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*; yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa*; algae such as *Chlorella vulgaris*; and bacteria such as *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* (Gomes *et al.* 1998). Filamentous fungi may be better suited for this purpose than other microbial groups, because of their high tolerance towards metals, wall binding capacity, and intracellular metal uptake capabilities. Fungi can accumulate metal by

physico-chemical and biological mechanisms including extracellular binding by metabolites and polymers, binding to specific polypeptides, and metabolism-dependent accumulation (Volesky and Holan 1995). Biosorption consists of accumulation by predominantly metabolism-independent interactions, such as adsorptive or ion-exchange processes. Bioaccumulation is a much slower process of metal uptake than biosorption and may be inhibited by the absence of nutrients such as glucose, nitrogen and phosphate, the action of metabolic inhibitors, low temperature, and other environmental factors (Såg *et al.* 2001). Fungal bioaccumulation performs well in comparison to sorption on commercial ion-exchange resins, activated carbon, and metal oxides. The cell-wall of biomass plays an important role in the sorption of heavy metals (Michael and Reeves 1997).

For industrial purposes, the immobilization of the fungal biomass is essential to maintain microbial cell activity in a toxic environment. Other advantages of the process based on an immobilized biomass include (1) the re-use of biomass (2) the use of conventional reaction systems, and (3) the lack of biomass-liquid separation requirements (Costa and França

Correspondence to: C. A. Rosa, Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31170-901, Brazil (e-mail: cartrosa@mona.icb.ufmg.br).

1996). The aim of the present work was to study the removal of toxic metals from solutions by a strain of *Aspergillus terreus* isolated from sludge at a stainless steel industrial plant. *A. terreus* UFMG-F01 was chosen as the biosorbent material because of its metal tolerance and the relative lack of information related to the sorption abilities of this species. This work was performed with the fungal biomass immobilized in polyurethane foam with different porosities and using chromium, nickel and iron as the metals of interest to study.

## MATERIALS AND METHODS

### Micro-organisms

Micro-organisms were isolated from the effluents generated by a steel foundry in the State of Minas Gerais (Brazil). Aliquots of 0.1 ml of untreated effluent from the foundry were spread, in triplicate, on Sabouraud agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK). The plates were incubated at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  for 5–8 d. Fungi that grew in this medium were selected and used to inoculate Sabouraud agar media having increasing levels of effluent solutions containing iron, nickel and chromium ( $10\text{--}50\text{ mg l}^{-1}$ ). The fungus that demonstrated the greatest capacity to grow in the presence of these metals was characterized by standard methods (Raper and Fennell 1965; Klich and Pitt 1988) and identified as *Aspergillus terreus* by Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello, Campinas-SP (Brazil). This strain was designated as *A. terreus* UFMG-F01 and used throughout this study.

### Effluent

Effluents generated by a stainless steel foundry in the State of Minas Gerais (Brazil) were collected from the three principal process stages performed in the steel plant. Thus, the residue generated in the chromium coating stage was identified as effluent 1 (metal concentrations were  $65\text{ mg l}^{-1}$  for Fe,  $4.9\text{ mg l}^{-1}$  for Cr and  $25\text{ mg l}^{-1}$  for Ni). Effluent 2 refers to a stage in which the steel enters the chemical bath ( $46\text{ mg l}^{-1}$  for Fe,  $4.7\text{ mg l}^{-1}$  for Cr and  $21.2\text{ mg l}^{-1}$  for Ni). At this stage, the steel becomes shiny as a consequence of the chemicals containing nickel and chromium used. Effluent 3 was collected at the final stage ( $730\text{ mg l}^{-1}$  for Fe,  $157\text{ mg l}^{-1}$  for Cr and  $60\text{ mg l}^{-1}$  for Ni). Prior to the biosorption tests, the effluents were diluted with deionized water at ratios varying from 1 : 100 (effluents 1 and 2) to 1 : 1000 (effluent 3). All effluents had a pH value of 1.0, and were dark in colour with a sulphurous smell.

### Support material

Polyurethane foams 43 and  $57\text{ pores cm}^{-1}$  were obtained from Bridgstone Co. Ltd. (Tokyo) and tested as carrier, to

support and immobilize the *A. terreus* strain. They were used as supplied, without pre-treatment.

### Culture media

Culture media for metal sorption experiments were: 90% Sabouraud broth plus 10% effluent, 50% Sabouraud broth plus 50% effluent, and 100% of effluent supplemented with 1% of glucose. Nine culture media (CM1 to CM9) were prepared at concentrations ranging from 50 to  $700\text{ mg Fe ml}^{-1}$ ,  $40\text{--}600\text{ mg Cr ml}^{-1}$  and  $5\text{--}230\text{ mg Ni ml}^{-1}$ . The pH of the culture media were adjusted to 4.5 with NaOH 2 N.

### Fungal biomass immobilization

Twenty polyurethane foam units with a pore size of  $43\text{ pores cm}^{-1}$  or 20 units with a pore size of  $57\text{ pores cm}^{-1}$  were added to 250 ml conical flasks containing 10 ml of diluted effluent 1 and either 90 ml of tartarate solution (ammonium tartarate buffer pH 4.5) or malt extract (10%) broth supplemented with yeast extract (20%). Each flask was inoculated with 1 ml of fungal spore suspension and incubated for seven d at  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  on an incubator shaker (New Brunswick Scientific) at  $200\text{ rev min}^{-1}$ . The immobilized fungus in polyurethane foam was recovered by filtration (Whatman paper No. 41). The immobilization efficiency was determined from the difference between fixed and free biomass compared to the total biomass. Biomass dry weight was determined by drying to constant weight in an oven at  $70^\circ\text{C}$  (Simon 1991).

### Sorption tests

Immobilized fungal biomass (50 mg, dry wt) was added to 100 ml of each culture medium (CM1 to CM9) in 250 ml conical flasks. The flasks were agitated ( $200\text{ rev min}^{-1}$ ) at  $28 \pm 3^\circ\text{C}$ , for 6 d. The initial pH of the culture medium was 4.5. Control runs were also performed without the micro-organism. All experiments were performed in triplicate and results shown are mean values with less than 5% error. The contents were filtered on  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  Millipore filter membranes and the filtrates were analysed by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian model AA-475) for residual metal content. The metal specific uptake ( $q$  in  $\text{mg g}^{-1}$ ) was calculated according to equation 1.

$$q = [(C_0 - C)/X] \quad (1)$$

where:  $q$  (mg of metal. g of biomass $^{-1}$ ) is the metal specific uptake,  $C_0$  (mg l $^{-1}$ ) is the initial metal concentration,  $C$  is the residual metal concentration and  $X$  (g l $^{-1}$ ) is the biomass concentration.



### Statistical Analysis

The effect of effluent type and the effluent dilution on the specific metal uptake was evaluated by a two-way factorial design (Box *et al.* 1978). The analysis of variance was carried out using the Statgraphics software version 2.7.

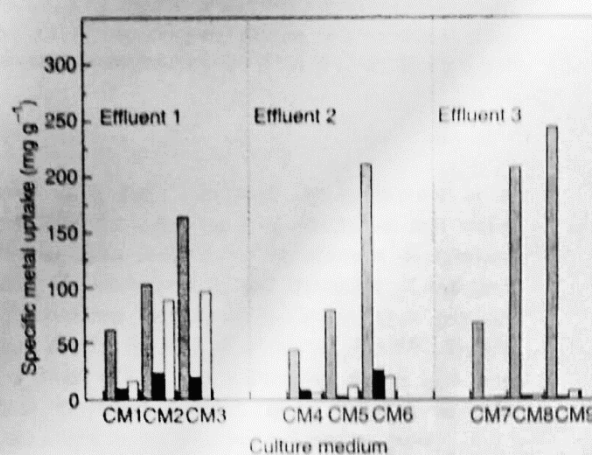
### RESULTS AND DISCUSSION

Micro-organisms isolated from industrial processes and polluted environments with high metal concentrations exhibit considerable tolerance to these elements. This tolerance may be due to abiotic factors (pH, temperature, nutrients in the environment or growth media) or to the physiological and genetic adaptations of the micro-organism (Romero *et al.* 1999). Various micro-organisms have been screened for their heavy metal sorption capacity, but of particular interest are those isolated from the environment where these contaminants are found. In our laboratory, a strain isolated from sludge collected at a stainless steel foundry, identified as *Aspergillus terreus*, was shown to bind efficiently iron, nickel, and chromium present in the effluents generated by the same industry where this strain was isolated.

Comparative data for the immobilization efficiency using foams with two porosities (43 and 57 pores  $\text{cm}^{-1}$ ) in two different culture media (tartarate and malt extract broth) are shown in Table 1. Immobilization efficiency was strongly affected by the matrix porosity. Immobilization efficiency varied from 19.6 to 92.5% and the highest values were attained with the lowest matrix porosity independent of the dispersion medium used. Thus, the selected matrix optimizes both the surface area, which restrained biomass, and the porosity that affects the transport of metal ions and nutrient throughout the supporting structure.

Having selected the appropriate matrix (43 pores  $\text{cm}^{-1}$ ) and immobilization conditions, we tested the ability of the resulting immobilized fungus to remove iron, chromium and nickel from metallurgical waste. A total of 27 assays was conducted to study the influence of culture medium on the

specific metal uptake by *A. terreus*. The specific metal uptake values ( $q$ ,  $\text{mg g}^{-1}$ ) for iron, chromium and nickel are shown in Fig. 1 for each culture medium used. Control runs in the absence of immobilized fungus showed no change in metal concentrations from the initial to the final stage of the sorption experiments, without any evidence of metal precipitation. The specific metal uptake was found to be dependent on both the ion metal concentrations and metal species. Specific metal uptake values varied strongly from 43.8 to 244.7  $\text{mg g}^{-1}$  for iron; 1.9–26.6  $\text{mg g}^{-1}$  for nickel and from 8.6 to 96.5  $\text{mg g}^{-1}$  for chromium. Figure 1 also shows that the immobilized fungus showed high affinity for iron in all culture media tested (CM1 to CM9) and the highest value for this metal uptake was attained with effluent 3 (CM9). However, the high iron concentration of this



**Fig. 1** Specific metal uptake values for *Aspergillus terreus* immobilized into polyurethane foam using industrial effluent at different concentrations. Medium composition: CM1, CM4, CM7 (90% of Sabouraud broth + 10% of effluent); CM2, CM5, CM8 (50% of Sabouraud-broth + 50% of effluent); CM3, CM6, CM9 (1% the glucose + 100% of effluent). Specific metal uptake ( $\text{mg g}^{-1}$ ) values were calculated according to equation 1 from biosorption runs performed in triplicate. (▨) Fe, (■) Ni, (□) Cr

	Matrix pore size	Culture medium	
		57 pores $\text{cm}^{-1}$	43 pores $\text{cm}^{-1}$
Free biomass (g)	Tartarate buffer	0.41	0.04
	ME Broth*	0.19	0.05
Fixed biomass (g)	Tartarate buffer	0.10	0.49
	ME Broth	0.32	0.45
Immobilization efficiency (%)	Tartarate buffer	19.6	92.5
	ME Broth	62.8	90.0

\*ME Broth: Malt extract (10%) broth supplemented with yeast extract (20%).

**Table 1** Immobilization efficiency for *Aspergillus terreus* UFMG-F01 using polyurethane foams with different pore sizes as support matrix

culture medium ( $712.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) affected the fungus biosorption efficiency for chromium, which is consistent with the competition between the Fe and Cr for the same binding site (Sag *et al.* 2001). For all culture media prepared with effluent 3 (Fe/Cr ratio higher than 5), the Cr binding was completely inhibited, and all the active binding sites on the fungus were saturated by Fe ions. Low chromium removal was also observed for culture media prepared with effluent 2 (Fe/Cr ratio higher than 4). The highest values for Cr uptake were obtained when effluent 1 was used, probably because of its low nickel concentration and balanced levels of iron and chromium (Fe/Cr ratio close to 1), which may have restricted the competition of these metals for the same binding sites.

The biosorption results were also analysed statistically by analysis of variance of the major effects (effluent type and effluent dilution). These factors revealed a significant effect ( $P < 0.05$ ) on the metal specific uptake by *A. terreus* (Table 2). The results also demonstrate that the presence of different metal species at different levels in the culture medium substantially affected the absorption capacity of the immobilized fungus. As a general trend, metal removal efficiency with this fungus decreased as the initial metal ion concentration increased and for Fe/Cr ratio higher than 1. In agreement with these data, *A. terreus* UFMG-F01 was shown to have higher affinity for metals present in effluent 1, adsorbing the highest levels of chromium and iron. This is better illustrated in Fig 2, which shows the cumulative metal removal percentage [MR percentage =  $100(C - C_0)/C$ ] achieved for each culture medium used.

By comparing data obtained in this work with those reported by Sag *et al.* (1996) for *Rhizopus arrhizus* ( $5.1 \text{ mg iron g}^{-1}$  and  $12.4 \text{ mg chromium g}^{-1}$ ) and Cabral (1992) for *Pseudomonas syringae* ( $6.0 \text{ mg nickel g}^{-1}$ ), the values for metal adsorption capacity obtained with by *A. terreus* UFMG-F01 were shown to be superior ( $164.5 \text{ mg iron g}^{-1}$ ,  $96.5 \text{ mg chromium g}^{-1}$  and  $19.6 \text{ mg nickel g}^{-1}$ ). Due to its affinity for binding simultaneously to a mixture of three heavy metals in solution, this strain of *A. terreus* can be

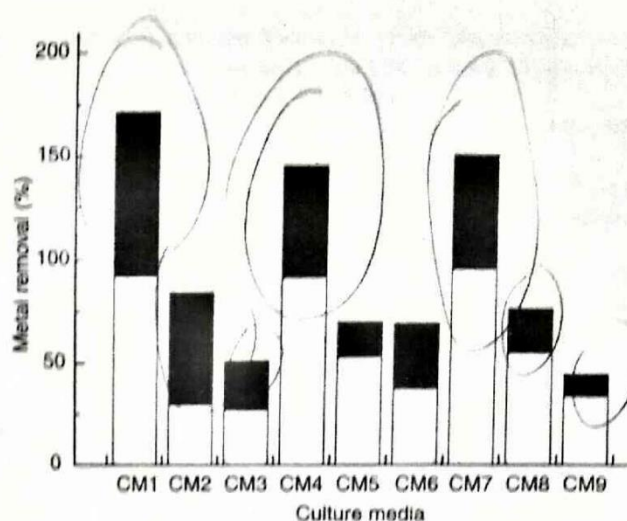


Fig. 2 Detoxification of heavy metals from industrial wastes by *Aspergillus terreus* UFMG-F01 immobilized into polyurethane matrix. Data were calculated by taking into account the percentage of each metal removed from the culture media (CM1 to CM9). (■) Fe; (□) Ni; (▒) Cr

considered as a good candidate for application at an industrial level for removing iron, chromium and nickel. Such results make feasible the replacement of synthetic adsorbents for biosorbent in the treatment of industrial waste. In addition, biosorbent is cheaper than synthetic resins and can be recycled (Christov *et al.* 1999). Besides having a high affinity for chromium, nickel and iron, *A. terreus* is non-pathogenic, quite resistant to toxic conditions found in the effluents and easy to grow.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful for the financial support from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADCT (Grant number 0430/95).

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for specific metal uptake by *A. terreus* UFMG-F01 as a function of effluent type at different metal concentrations

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares			Mean square			Calculated F			Level of significance		
		Ni	Cr	Fe	Ni	Cr	Fe	Ni	Cr	Fe	Ni	Cr	Fe
Effluent type	2	24017.6	1008.7	2042.5	12008.8	504.4	10321.2	17.1	13.2	34.2	0.0000*	0.0002*	0.0000*
Dilution	2	99884.7	417.5	5600.1	49942.4	208.7	2800.0	71.3	5.5	9.3	0.0000*	0.0117*	0.0012*
Residue	22	15402.6	836.9	6639.1	700.1	38.0	301.8						
Total	26	139305.0	2263.1	32881.6									

\*Significant at the 5% level of probability.

## REFERENCES

- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978) Statistics for experimenters. In *An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. New York: Wiley & Sons Inc.
- Cabral, J.P.S. (1992) Selective binding of metal ions to *Pseudomonas syringae* cells. *Microbios* 71, 47-53.
- Christov, L.P., Driessel, B. and Plessia, C.A. (1999) Fungal biomass from *Rhizomucor pusillus* as adsorbent of chromophores from a bleach plant effluent. *Process Biochemistry* 35, 91-95.
- Costa, A.C.A. and França, F.P. (1996) Cadmium uptake by biosorbent seaweeds: Adsorption isotherms and some process conditions. *Separation Science and Technology* 31 (17), 2373-2393.
- Gomes, N.C.M., Mendonça-Hagler, L.C.S. and Savvaia, I. (1998) Metal bioremediation by micro-organisms. *Brazilian Journal of Microbiology* 29, 85-92.
- Klich, M.A. and Pitt, J.I.A. (1988) *Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and Their Teleomorphs*. Commonwealth scientific and industrial research organization. North Ryde, New South Wales, Australia, pp. 116.
- Michael, Z.C. and Reeve, M. (1997) Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain C3U immobilized in a novel matrix. *Biotechnology Progress* 13, 60-70.
- Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965) *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 686.
- Romero, C.M., Gatti, M.E. and Bruno, E.D. (1999) Effects of heavy metals on microbial life of water and sediment communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 161-166.
- Sag, Y., Yalçuk, A. and Kutuel, T. (1996) Full competitive biosorption of chromium (VI) and iron (III) ions from binary metal mixtures by *Rhizopus arrhizus*: Use of competitive Langmuir model. *Process Biochemistry* 31, 573-585.
- Sag, Y., Yalçuk, A. and Kutuel, T. (2001) Use of mathematical model for the performance of the simultaneous biosorption of Cr (VI) and Fe (III) on *Rhizopus arrhizus* in a semi-batch reactor. *Hydrometallurgy* 59, 77-87.
- Simon, G.P. (1991) *Ion Exchange Trapping Manual*, pp. 227. New York: van Nostrand Reinhold.
- Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* 11(3), 235-250.

# **BIOSORPTION OF CHROMIUM, NICKEL AND IRON BY FILAMENTOUS FUNGI FROM METALLURGICAL STREAMS**

**Maristella A. Dias, heizir f. de Castro, Carlos A. Rosa**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais,  
Caixa postal 486, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil, Fax: 553134992730, E-mail:  
[carlrosa@icb.ufmg.br](mailto:carlrosa@icb.ufmg.br)

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena,  
Caixa Postal 116, Lorena, 12600-970, SP, Brasil.

## Abstract

Metal uptake performance of four species (*Aspergillus terreus* UFMG-F01, *Mycelia sterila* UFMG-02, *Aspegilus Niger* UFMG-F03 and *Phoma* sp UFMG-F04) from sludge generated by steel foundry was studied using aqueous solutions containing Cr (VI) , Fe (III) and cu (II) ions. All fungi showed ability to Bing the test metals although at different ranger, Maximal metal uptake values for each fungus were 100 mg.g iron, 78 mg.g chromium and 42 mg.g nickel for *Mycelia Sterila* UFMG802; 30 mg.g iron, 88 mg.g chromium and 45 mg.g nickel for *A. niger* UFMG-F03 and 52 mg.g iron, 98 mg.g chromium and 78 mg.g nickel for *Phoma* sp UFMG-F04. *Aspergillus terreus* UFMG-F01 was selected as a potential fungus strain to be used in the treatment of effluent containing heavy metals. In addition, it also showed to adsorb all the three metals at higher amounts than previously reported.

**Key words:** Fungi, biosorption, bioaccumulation, heavy metals.

## Introduction

Heavy metals are discharged in aquatic and terrestrial atmospheres by metallurgical industries and can reach high concentrations in the atmosphere. Among these, hexavalent chromium and nickel are the most serious contamination concerns because of their toxicity and ability to bind human cells constituents, in addition to their carcinogenic and mutagenic properties (Gadd and White, 1993). Many studies have shown that microbes have potential to bind and concentrate heavy metals from aqueous environments (Goyal, 2003) following two basic mechanisms: (1) biosorption (adsorption) of metal ions onto microorganism surfaces (2) bioaccumulation, which requires living organisms and is cell metabolism dependent (Volesky, 1990, Sa and Kutsal, 2000). Of these microorganisms, filamentous fungi have been shown to bind efficient a variety of

metal ions from aqueous solutions and is considered to be an alternative method to treat metallurgical effluents (Kapoor and Viraraghavan, 1995).

Biosorption of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Fe, Ni, Cr, Ag, Th, Ra and U) by fungi biomass have been observed to follow several mechanisms, including complexation, ion exchange, adsorption, chelating, precipitation, metal transformation and intracellular metabolism (Pethkar et al. 2001) and are dependent on several process parameters such as pH, metal ion species, biomass concentration, biomass pre-treatment (physical or chemical) presence of different Viraraghavan, 1995).

Various fungi have been screened for their heavy metal sorption capacity, but of particular interest are those isolated from the environment where these contaminants are found. Fungi isolated from industrial processes and polluted environments with high metal concentrations exhibit considerable tolerance to these elements. This tolerance may be due to biotic factors (pH, temperature, nutrients in the environment or growth media) or to the physiological and genetic adaptations of the microorganism (Romero et al. 1999).

In this work, we reported the comparative performance of four species of filamentous fungi isolated from sludge collected at a stainless steel foundry with respect to Bismuth, iron, nickel, and chromium. Major factors affecting the biosorption of these metals by these strains were also discussed.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Fungi strains**

Fungi were isolated from the effluents generated by a steel foundry in the State of Minas Gerais (Brazil). Aliquots of 0.1 ml of untreated effluent from the foundry were spread, in triplicate, on Sabouraud agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK). The plates were incubated at 28° ± 3°C for 5-7 days. Fungi that grew in this medium were selected and used to inoculate Sabouraud agar containing increasing levels of effluent solutions containing iron, nickel and chromium (10 to 50 mg.l<sup>-1</sup>). Fungi that demonstrated capacity to adsorb those metals were characterized by standard methods (Klich and Pitt, 1988, Raper et al. 1965) and identified as *Aspergillus terreus*, *Mycelia sterila*, *Aspergillus niger*, *Phoma* sp. By Institute of Botany of the Secretary of Agriculture, São Paulo, SP (Brazil). These strains were designated as: *A. terreus* UFMG-F01, *M. sterila* UFMG-F02, *A. niger* UFMG-F03 and *phoma* sp. UFMG-F04.

## 2.3. Metal Solutions

Single metal solutions of chromium ( $K_2Cr_2O_7$ ), nickel ( $Ni\ So_4.6H_2O$ ) and iron ( $Fe_2O_3$ ) were prepared in distilled water, at initial concentrations varying from  $0$  to  $200\ mg.ml^{-1}$ . These synthetic solutions were added to the Sabouraud broth to perform experiments.

### 2.3.1. Sorption tests

Fungi strains were initially cultivated on modified Sabouraud agar (0.5% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose and 2% agar) at pH of 6.5, following by incubation for six days at  $30^\circ C$ . After this, 2 mg (dwt) of fungus biomass ( five spheres having around 7 mm of diameter) was added to the 250 ml conical flasks containing 50 ml of Sabouraud broth and 10 ml of solution (Fe, Cr and Ni). Each flask was incubated for seven days at  $25+30^\circ C$  on a reciprocating shaker ( New Brunswick Scientific) at  $200\ oscilations.min^{-1}$ . The initial pH of the culture medium was 4.5. All test were performed in triplicates together with their respective controls Control runs were also performed without the microorganism. The flask contents were filtered on 0.45  $\mu m$  Millipore filter membranes and the filtrates were analyzed by flame atomic absorption spectrophotometry ( Varian model Aa-475) for residual metal content. The biomass dry weight was determined by frying to constant weight in an oven at  $70^\circ C$  (Simon, 1991). The metal specific uptake ( $q$  in  $mg\ g^{-1}$ ) was calculated according to the expression:

$$q = \frac{C_0 - C}{X} \cdot V$$

Where:  $q$  (mg of metal. G of biomass) is the metal specific uptake,  $C_0$  ( $mg.l^{-1}$ ) is the initial metal concentration,  $C$  is the residual metal concentration,  $V$  is volume total and  $X$  ( $g.l^{-1}$ ) is the biomass concentration.

### 3. Results

All tested filamentous fungi grew well and removed metals from aqueous solutions containing chromium, nickel and iron. Each fungus had different equilibrium loading capacity due to their distinct characteristics wall, pH, temperature and metal toxicity (Gomes and Linardi, 1996). The equilibrium concentrations were different for each of the four tested strains and depend on the specificity of each strain for each metal ion, as presented in Figures 1A to 1D.

Figure 1A shows the metal bioaccumulation (chromium, nickel and iron) when *A. terreus* UFMG-F01 was used. The metal uptake values ranged from 5.0 to 78.0 mg Cr.g<sup>-1</sup> biomass and 6.0 to 100.0 mg Fe.g<sup>-1</sup> biomass. The highest capacity to bind iron was found at metal solution containing 150 mg Fe.ml<sup>-1</sup>. These results indicate that *A. terreus* UFMG-F01 had higher specificity for the metal iron than nickel and chromium.

The bioaccumulation for chromium, nickel and iron by *Mycelia sterilia* UFMG-02 is displayed in Figure 1B. Uptake capacities for each metal ranged from 6.0 to 101.0 mg Cr.g<sup>-1</sup> biomass, 2.0 to 42.0 mg Ni.g<sup>-1</sup> biomass and 4.0 to 72.0 mg Fe.g<sup>-1</sup> biomass. This strain showed higher specificity for chromium and iron than for nickel.

Figure 1D shows the bioaccumulation of chromium, nickel and iron, when *phoma* sp UFMG-F04 was used. Uptake metal capacity ranged from 4.0 to 98.0 mg.g<sup>-1</sup> biomass for iron. *Phoma* sp UFMG-F05 showed higher specificity for chromium and nickel than for iron.

### 3. Discussion

In the present work a preliminary study on the removal of heavy metal in aqueous solution by live biomass from four isolated filamentous fungi was performed. The specificity mechanism for filamentous fungi to bind some heavy metals are well and may be exemplified by the saturation of free sites on the cellular membrane, as was previously demonstrated by Aloysius et al. (1999) with biomass alive of *Rhizopus oligosporus* in aqueous metal solution containing cadmium.

The results obtained here showed that in all tested strains an increase on the initial metal concentration also increased the binding biomass capacity for the metal species up to the saturation point of the specific fungus free sites for this metal. Therefore, the metal removal from aqueous solutions depends on chemical mechanisms involving metal ion



interactions associated with the specific groups present on the fungus cellular wall (Bai and Abraham, 2002)

The biosorption equilibrium can only occur when the saturation of the specific free sites on the cell surface is reached. For this to take place several factors are involved such as specific surface properties of the microorganism and the physicochemical parameters of the solution such as temperature, pH, initial pollutant concentration and biomass concentration. The combined effects of two or more parameters will interfere on the microorganism biosorption capacity (Aksum et al, 1999) since the mechanism and the kinetics of heavy metal species biosorption on the fungal biomass also depend on the experimental conditions particularly on medium pH and heavy metal ions concentration (Ridvan et al, 2001).

In this way, it was verified that particularities exist from one to another fungus strain; each fungus species possesses differentiated free sites, which will favor the binding of just some metals depending on the experimental conditions. Besides these important factors, the capacity of internal metal concentration is also a significant parameter in these experiments since fungi can only accumulate metals, including those, which are essential, e.g. K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Co, Mn, and those with no essential biological function e.g. Cs, Pb, Al, Sn, Hg, Cr, Ni (Young & Banks, 1998).

Microorganisms can accumulate both metal types (essential and non-essential). When fungi bind on non-essential metals physical interactions and non-specific chemical bindings are involved since the metabolism of these ions will be minimum in order to avoid cell toxicity. On the other hand, when essential metals are involved there are bindings on the surfaces and metabolism at a higher level since the internal concentration of these metals will be largest, limiting in this way the toxicity for these metals. This factor together with others defines the binding capacity of the fungi biomass for heavy metals (Young & Banks, 1998).

The biosorption test showed in all cases a chemical, equilibrated and saturable mechanism, which reflected the predominantly site-specific mechanism on the cell surface. Among all tested fungus strains the highest capacity for bioaccumulating and adsorbing chromium were: *Phoma*-sp UGMG-F04, *Mycelia sterila* UFMG-F02 and *A. niger* UFMG-F03, for adsorbing nickel were *A. terreus* UFMG-F01 and *phomasp* UFMG-F04, for bioaccumulation iron was *A. terreus* UFMG-F01.

## Acknowledgements

We are thankful for the financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADCT (Grant number 0430/95).

## References

AKSU, Z. AKPINAR, D. KABASAKAL, E. KOSE, B. Simultaneous biosorption of phenol and nickel (II) from binary mixtures into aerobically activated sludge, *Process Biochemistry*, v. 35, p. 301-308, 1999.

ALOYSIUS, R. KARIM, L.A. ARIFF, A.B. The Mechanism of cadmium removal from aqueous solution by non-metabolizing free and immobilized biomass of *Rhizopus oligosporus*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 15, p. 571-578, 1999.

BAI, R. S. ABRAHAM, T, E, Studies on enhancement of Cr (VI) Biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*, *Water Research*, v. 36, p. 1224-1236, 2002.

DIAS M.A, LACERDA, I.C. A. PIMENTEL, P.F. CASTRO, H.F. ROSA C.A. Removal of heavy metals by the *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix, *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 46-50, 2002.

GADD, G.M. WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution-a working biotechnology, *Bioresource Technology*, v. 11, p. 353-359, 1993.

GOMES, N.C.M. LINARDI, V.R. Removal of gold, silver and copper by living and nonliving fungi leach liquor obtained from the gold mining industry, *Revista de Microbiologia*, v.27, p. 218-222, 1996.

GOYAL, N. JAIN, S.C, BANERJEE, U.C. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals, *Advances in Environmental Research*, v. 7, p. 311-319, 2003.

KAPOOR, A. VIRAGHAVAN, T. Fungal Biosorption – An Alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review, *Bioresource Technology*, v. 53, p. 195-206, 1995.

KLICH, M.A, and PITT, J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. Commonwealth scientific and industrial research organization, North Ryde, New South Wales, Australia p. 116, 1988.

PETHKAR, A. V. KULKARNI, S. K. PAKNIKAR, K.M. Comparative studies on metal biosorption by two strains of *Cladosporium cladosporioides*, *Bioresource Technology*, v. 80, p. 211-215, 2001.

RAPER, K.B. and FENNELL, D.I. *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 686, 1965.

RIDVAN, S. ADIL, D. YAKUP, A. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanaerochaete chrysosporium*, *Bioresource Technology*, v. 76, p. 67-70, 2001.

ROMERO, C.M. GATTI, M.E. and BRUNO, E.D. (1999) Effects of heavy metals on microbial of water and sediment communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 15, p. 161-166, 1999.

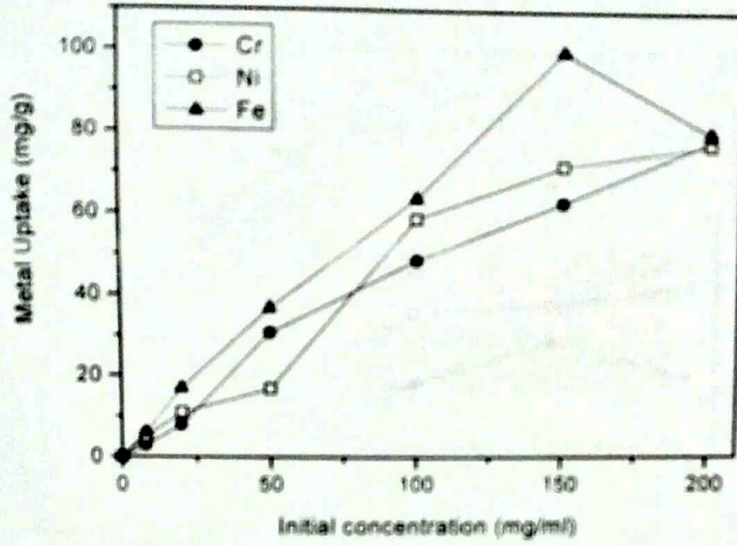
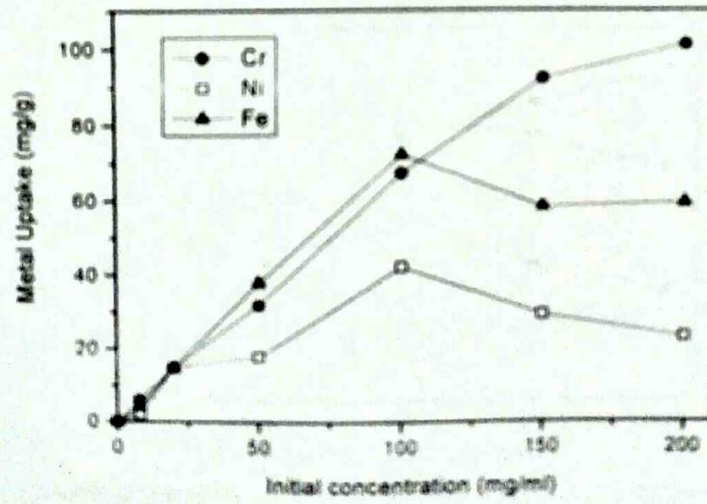
SIMON, G.P. *Ion Exchange Training Manual*, New York: Van Nostrand Reinhold, p. 227, 1991.

VOLESKY, B. A Biosorption and biosorbents In: VOLESKY, B. (Ed). *Biosorption of Heavy Metals*, Boca Raton: CRC Press, p. 3-6, 1990.

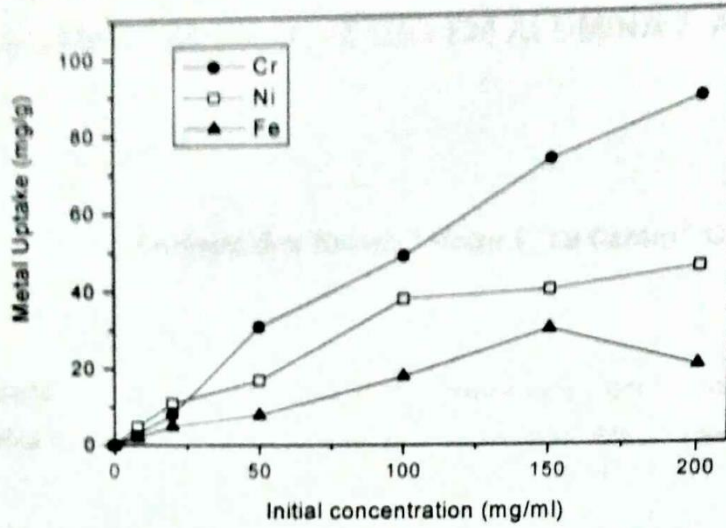
YOUNG, E., BANKS, C. J. The removal of lindane from aqueous using a fungal biosorbent: The influence of pH, temperature, biomass concentration, and culture age, *Environmental Technology*, v. 19, p. 619-625, 1998.

## Figure Captions

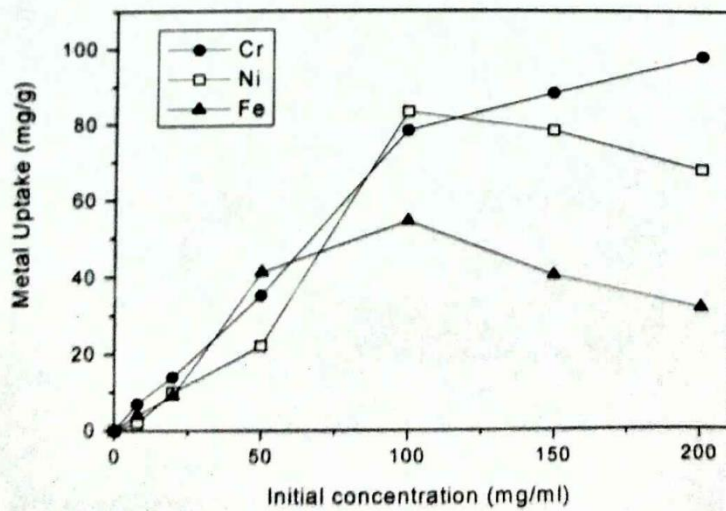
Figure 1 Biocccumulation for chromium, nickel and iron by four strains of filamentous fungi  
A= *Aspergillus terreus* UFMG-F01, B= *A Mycelia sterila* UFMG-02, C= *Aspergillus niger*  
UFMG-F03, D= *Phoma* sp. UFMG-F04.

**A****B**

C



D



## **BIOSSORÇÃO DE CROMO, NIQUEL E FERRO POR *Aspergillus terreus* UFMG-F01 IMOBILIZADO EM ALUMINA E ALGINATO**

**Maristella A. Dias, Armindo dos Santos,<sup>2</sup> Heizir f. de Castro,<sup>3</sup> Carlos A. Rosa<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, ICB, Universidade Federal De Minas Gerais  
Caixa Postal 486, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil, Fax: 553134992730,  
Email: [Carlorosa@icb.ufmg.br](mailto:Carlorosa@icb.ufmg.br).

<sup>2</sup> Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), CDTN, Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena,  
Caixa postal 116, Lorena, 12600-970, SP, Brasil.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade da biomassa morta de *Aspergillus terreus* UFMG-F01, imobilizada em alumina e alginato, de remover cromo, níquel e ferro de soluções sintéticas e efluentes industriais. Os testes de bioadsorção mostraram que o fungo teve maior especificidade pelo elemento cromo quando imobilizado com alumina e com alginato mostra especificidade pelo ferro. Os resultados obtidos em soluções sintéticas e no influente com alumina foram: remoção de 94% de cromo, 68% níquel e 87% de ferro em soluções sintéticas, remoção 70% de cromo, 48% de níquel e 87% de ferro em efluente industrial, pôs resultados com alginato foram: remoção de 67% de cromo, 60% de níquel e 83% de ferro em soluções sintéticas, remoção 32% de cromo, 20% de níquel e 58% de ferro em efluente siderúrgico. No efluente industrial a bioadsorção dos metais foi menor provavelmente devido á presença de vários tipos de metais que dificultam as ligações do metal a biomassa. Quando comparado os resultados da imobilização da biomassa em alumina com alginato, estes mostraram que o fungo imobilizado no primeiro suporte obteve os melhores resultados. *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alumina foi um bom bioadsorvente de cromo, níquel e ferro tanto em soluções sintéticas quanto em efluentes industriais.

**Palavra-chave:** Fungos, bioadsorção alumina, alginato, metais pesados, imobilização.



## 1. Introdução

Biossorção de metais pesados em soluções aquosas pode ser considerado uma tecnologia alternativa no tratamento de efluentes siderúrgicos. A capacidade de biossorver metais pode ser influenciada por vários fatores, tais como, pH, íons fortes, presença simultânea de vários metais, natureza orgânica e inorgânica dos ligantes presentes na solução (Pagnanelli et al. 2003). Fungos são organismos importantes na biossorção e têm sido largamente utilizados na indústria de bioconversão e biodegradação de compostos poluentes presentes em efluentes (Arica et al.2003) A biomassa de fungos do gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Thichoderma* podem remover metais pesados de soluções aquosas, podendo ser utilizada de células mortas oferece maiores vantagens, pois o sistema não fica sujeito a limitações de toxicidade dos metais, não requer nutrientes para o crescimento e pode ser reutilizado facilmente (Fu & Viraraghavan, 2002). A biomassa imobilizada possibilita, alta concentração de células e facilidade de manuseio em biorreator (Freman & Lilly, 1998)

A alumina é um polímero muito utilizado na indústria química, sendo um ótimo suporte coloidal devido à resistência e porosidade apresentadas nos processos de imobilização (Mercier et al. 2002). A utilização de suportes como a alumina, capaz de imobilizar biomassa microbiana permite aumentar o tempo de permanência no interior de biorreator favorecendo operações contínuas, sistemas estáveis e elevada eficiência para degradação de poluentes (Ortega et al. 2001). O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade do fungo *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alumina e alginato em remover metais pesados de soluções sintéticas e efluentes.

## **2. Matérias e Métodos**

### **2.1 Biomassa**

Foi utilizada biomassa fúngica inativa de *Aspergillus terreus* UFMG-F01. Este fungo foi isolado dos tanques de tratamento da siderúrgica, e mantido el laboratório em ágar de Sabouraud (Dias et al. 2002).

### **2.2 Soluções sintéticas**

Foram utilizadas soluções sintéticas de cromo ( $K_2Cr_2O_7$ ), níquel ( $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ) e ferro ( $Fe_2O_3$ ). As soluções foram preparadas em água destiladas e a concentração inicial de metais variou de 48 a 197 mg/l. Estas soluções sintéticas foram adicionadas no caldo Sabouraud para os experimentos de biossorção.

### **2.3. Efluentes**

O efluente utilizado foi diluído numa proporção 1;100 e adicionado no caldo Sabouraud. A concentração de metais pesados utilizados em cada 1ml de efluente diluído foi 70 mg/l para ferro, 60mg/l para cromo e 25mg/l para níquel

### **2.4. Preparação da biomassa para imobilização**

#### **- Fungo morto:**

Os fungos foram crescidos em caldo Sabouraud. Após o crescimento, os fungos foram filtrados e a biomassa foi seca ípr 24 horas. A biomassa seca foi moída em gral e homogeneizada em um Ultra turax. Foram utilizadas 60mg de biomassa seca para a imobilização em 10 mg de laumina, todos os experimentos foram realizados com o fungo morto, duplicata.

#### **- Sol Alumínio:**

Para a preparação das esferas de alumina via transformação sol-gel foi feito o sol de alumínio, que é uma dispersão coloidal constituída de na no partículas de um óxido de alumínio dispersas em um meio aquoso ácido. Durante o Processo Sol-Gel, o sol é precipitado através da reação com hidróxido de amônio, formando inicialmente um

aglomerado gelatinoso de hidróxido de amônio, formando inicialmente um aglomerado gelatinoso de hidróxido de alumínio hidratado, que após seco a uma temperatura entre 333 e 353° Kelvin é exposto ao ar, transformando-se em um tipo de alumina hidratada sólida, com boa resistência mecânica á compressão. Foi utilizado neste experimento 100 mg de solução de alumínio e 72,0 mg álcool polivinílico (PVA) (HOECHST). O PVA é um polímero proveniente do monômero acetato de vigila de forma de álcool polivinílico. Este composto é importante na imolbização, pois ajuda o gotejamento das colunas a fim de favorecer p impacto com a solução amoniacal devido á natureza elástica do PVA. Foi também utilizado 21 mg de etano0l, sendo que este atua como estabilizador da solução, impedindo a precipitação de alguns componentes da solução amoniacal 5M e duas com água destilada. As esperas foram mantidas em solução amonical 5M. A última etapa foi á secagem, onde as esferas foram lavadas por cinco vezes em água destilada e depois foram secas na estufa a 40°C por 24 horas.

## **2.5 Imobilização em alginato**

Para obtenção da suspensão polimérica 2,0 g de alginato de ´sódio (Sigma), foram adicionados a 80ml de água destilada. Após esperização a 121°C por 15 min, a suspensão foi adicionada alíquotas de 20 ml das suspensões celulares (1,2 g massa de células secas/frasco), e homogeneizadas por agitação.

As suspensões obtidas foram estruturadas, com o auxílio de uma seringa hipodérmica de vidro com agulha de 1 mm de diâmetro interno, em 200 ml de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,2 M sendo obtidas aproximadamente 70g de cápsulas (peso úmido). As capsulas obtidas foram mantidas imersas em solução gelificante a temperatura ambiente, por período de 10 min, e então lavadas com água destilada estéril para remoção do excesso da solução gelificante (Heibuth, 2002).

## 2.6 – Testes de biossorção com esferas de alumina e alginato em soluções sintéticas e efluentes

Os fungos foram testados quanto á capacidade remover metais de soluções sintéticas. Foi padronizado, 100mg de biomassa imobilizada em alumina e alginato no caldo Sabouraud com quantidade crescentes (1ml a 4ml) de sais metálicos (cromo, níquel e ferro) Estes foram colocados no snaker por dois dias, eo ph variou de 4 a 6. Logo após os fungos foram filtrados, e o sobrenadante cevado para análise de absorção atômica. Após dois dias sob agitação a temperatura ambiente, o conteúdo dos frascos foi filtrado e as concentrações residuais de íons metálicos determinadas através de espectrofotometria de absorção atômica. A quantidade de espécie sequestrada (Íon metálico) pelo adsorvente foi determinada pela diferença entre a concentração de metais em soluções antes (concentração inicial – Ci) e depois (concentração final Cf) da exposição do biossorvente, através da equação 1:

$$q = \frac{V ( C_i - C_f )}{m}$$

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados dos experimento utilizando o fungo imobilizado em alumina em soluções contendo cada metal separadamente estão apresentados na tabela 1. Os resultados mostraram que o fungo possui maior especificidade por ferro e cromo, pois removeu estes metais em maior quantidade, e teve menor afinidade pelo níquel. Isto pode ter ocorrido devido ao pH. O níquel é melhor adsorvido em pH mais alto, pois possui baixa solubilidade e têm sido relatado a sua hidrólise metal nos processos de bioissorção (Kadirvelu et al. 2002). Os experimentos de metais cromo e ferro são bem adsorvidos nesta faixa de pH de 2,0 a 4,0. Os metais cromo e ferro são bem adsorvidos nesta faixa de pH por estarem solúveis, sendo então mais fácil sua remoção pela biomassa fúngica. A tabela 2 mostra que a capacidade de bioissorção do fungo *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alumina em soluções sintéticas contendo os três metais diminui devido à competição dos metais pelos sítios livres.

A tabela 3 mostra que os fungos bioissorveram menor quantidade de metal quando comparado com os experimento realizado com soluções sintéticas. Isto pode ser devido ao fato de ocorrer menor competição por sítios ligantes na superfície da parede celular fúngica e ser mínimo o número de interferentes no meio utilizado. Nos experimentos com alginato, os resultados (Tabelas 4 e 5) mostram que a biomassa fúngica imobilizada foi capaz de bioissorver menor quantidade de metais em soluções sintéticas e em efluentes siderúrgicos quando comparado com o suporte alumina. No entanto, a biomassa imobilizada em alginato apresentou maior capacidade de remover o elemento ferro. Também foi mostrada que nos testes de bioissorção com a biomassa fúngica imobilizada em alginato, tanto em soluções de metais separadas quanto em soluções contendo os três metais, esta possui menor capacidade de remoção de metais quando comparada com os resultados utilizando alumina como suporte. A tabela 6 mostra que a bioissorção de metais, a partir de efluente industrial, utilizando o alginato como suporte a bioissorção foi baixa devido a pouca resistência deste suporte à composição do efluente.

Segundo Zouboulis et al. (2003), a presença de outros metais na solução pode interferir na bioissorção devido a sítios ligantes similares e a quantidade de grupos com amina, carboxilas e fosfato existentes. Os resultados obtidos com soluções sintéticas com alginato foram melhores pela baixa presença de interferentes e porque a

competição pelos sítios ligantes é menor quando comparados com a constituição complexa de um efluente. Mesmo diminuindo a capacidade de bioadsorção a afinidade da biomassa fúngica imobilizada em alginato continua sendo pelos elementos cromo e ferro.

Devido à presença simultânea de diferentes metais no ambiente têm-se observado que o processo de bioadsorção apresenta influência significativa na eficiência do processo. Isto têm levado ao estudo dos fatores que influenciam a bioadsorção dos diferentes metais em soluções sintéticas, já que nos efluentes, sempre se encontram misturas de metais e diversos interferentes (Zouboulis et al. 2003). Na imobilização da biomassa fúngica com o suporte alumina foi visto que este apresenta resistência e porosidade controlada, o que torna a bioadsorção dos metais pela biomassa fúngica morta mais estável e fácil manuseio. Além destas vantagens, o suporte não interfere na bioadsorção dos metais pela biomassa imobilizada. A capacidade da biomassa fúngica de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizada em alumina em remover metais é promissora, podendo ser uma alternativa para tratamento de efluentes industriais.

### **Agradecimentos**

Agradecemos o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao PADCT (0430/95).

### **Referências**

ARICA, M.Y., ARPA, C., ERGENES, A., BAYRAMOGLU,G.,GENÇ. O. Ca-alginate as a support for Pb (II) and Zn (II) bioadsorption with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, Carbohydrate Polymers, v.52, p. 167-174, 2003.

DIAS, M. A., LACERDA, I. C. A., PIMENTEL, P. F., CASTRO, H. F., ROSA, C. A. Removal of heavy metals by *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix, Letter in Applied Microbiology, v.34 p. 46-50, 2002.

FU., Y., VIRARAGHAVAN, T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*, *Bioresource Technology*, v.82, p.1139-1145, 2002.

FREEMAN, A., LILLY, D.M. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells, *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.335-345, 1998.

GADD, G. M. Biosorption, *Chemistry & Industry*, p. 421-426, 1990.

HEILBUTH, M. N. Seleção e caracterização de bactérias degradadoras de fonol. Isoladas de efluentes industriais. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2002. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia).

KADIRVELU, K., SENTHILKUMAR., P., THAMARAISELVI, V., SUBBURAM, V. Activated carbono prepared from biomass as adsorbent : elimination of Ni (II) from aqueous solution, *Bioresource Technology*, v.81, p.87-90, 2002.

ORTEGA., F. S.; ROCHA, K. M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V.C Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via "gelcasting" em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. *Cerâmica*, v.47, p 199-2033, 2001.

ZOUBOULIS, A.I., MATIAS, K.A, LOUKIDOU, M. SEBESTA, F. Metal biosorption by PAN- Immobilized fungal biomass in simulated wastewaters, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.212, p.185-195, 2003.

**TABELA 1.** Capacidade de remover metais pesados em mg/g de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alumina em soluções sintéticas separadas de ferro, níquel e cromo.

Concentrações Metálicas	Q*		
	Ferro	Níquel	Cromo
1ml	42	33	45
2ml	90	75	91
3ml	137	80	122
4ml	160	95	182

1ml: 48mg/l de metal, 2ml: 97 mg/l de metal, 3ml: 148mg/l de metal, 4ml: 197mg/l de metal

\*q = capacidade de remover metais em mg/g de biomassa

**TABELA 2.** Capacidade de remover metais pesados em mg/g de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alumina em solução sintética constituída de ferro, níquel e cromo.

Concentrações Metálicas	Q*
	Ferro + Níquel + Cromo
1ml	120
2ml	198
3ml	370
4ml	489

1ml: 48mg/l de metal, 2ml: 97 mg/l de metal, 3ml: 148mg/l de metal, 4ml: 197mg/l de metal

\*q = capacidade de remover metais em mg/g de biomassa



**TABELA 3.** Capacidade de remover metais pesados em mg/g de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alumina em efluentes contendo ferro, níquel e cromo.

Concentrações Metálicas	Q*		
	Ferro	Níquel	Cromo
1ml	61	12	42
2ml	116	18	96
3ml	158	23	132
4ml	200	29	187

1ml: 48mg/l de metal, 2ml: 97 mg/l de metal, 3ml: 148mg/l de metal, 4ml: 197mg/l de metal

\*q = capacidade de remover metais em mg/g de biomassa

**TABELA 4.** Capacidade de remover metais pesados em mg/g de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alginato em soluções sintéticas separadas de ferro, níquel e cromo.

Concentrações Metálicas	Q*		
	Ferro	Níquel	Cromo
1ml	40	29	32
2ml	95	46	77
3ml	114	68	96
4ml	139	82	118

1ml: 48mg/l de metal, 2ml: 97 mg/l de metal, 3ml: 148mg/l de metal, 4ml: 197mg/l de metal

\*q = capacidade de remover metais em mg/g de biomassa

**TABELA 5.** Capacidade de remover metais pesados em mg/g de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alginato em soluções sintéticas constituídas de ferro, níquel e cromo.

Concentrações Metálicas	Q*
	Ferro + Níquel + Cromo
1ml	92
2ml	119
3ml	261
4ml	317

1ml: 48mg/l de metal, 2ml: 97 mg/l de metal, 3ml: 148mg/l de metal, 4ml: 197mg/l de metal

\*q = capacidade de remover metais em mg/g de biomassa

**TABELA 6.** Capacidade de remover metais pesados em mg/g de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 imobilizado em alginato em efluentes contendo ferro, níquel e cromo.

Concentrações Metálicas	Q*		
	Ferro	Níquel	Cromo
1ml	41	5	22
2ml	64	11	41
3ml	95	19	53
4ml	137	24	69

1ml: 48mg/l de metal, 2ml: 97 mg/l de metal, 3ml: 148mg/l de metal, 4ml: 197mg/l de metal

\*q = capacidade de remover metais em mg/g de biomassa

## **5. DISCUSSÃO DA TESE**

## 5. DISCUSSÃO

A biossorção de metais pesados por fungos filamentosos é um processo alternativo e viável, devido à constituição da parede celular, e a facilidade de se obter biomassa fúngica. Os fungos possuem sítios específicos para metais pesados. Isto é importante devido à constituição diferenciada de metais que existe nos efluentes siderúrgicos. O mecanismo de especificidade dos fungos filamentosos por alguns metais pesados é conhecido na literatura e exemplificado através da saturação dos sítios livres na membrana celular de *Rhizopus Oligosporus* em solução aquosa de metais com cádmio (ALOYSIUS et al. 1999). Os autores mostraram que para a linhagem fúngica estudada, o aumento da concentração inicial de metais no meio de cultura aumento a capacidade de ligação da biomassa aos metais até o ponto de saturação dos sítios livres específicos para cada metal. O equilíbrio de biossorção só ocorre quando há saturação dos sítios livres específicos para cada metal. O equilíbrio de biossorção só ocorre quando há saturação dos sítios livres específicos da superfície da célula. O mecanismo e a cinética de espécies metálicas depende da biomassa fúngica da célula. O mecanismo e a cinética de espécies metálicas depende da biomassa fúngica e de condições experimentais particulares como meio de cultura, pH, grupos aniônicos presentes na superfície das células e permeabilidade da parede celular e o metabolismo de alguns metais pesados (SAY et al. 2001), ocorrendo particularidades de uma linhagem fúngica em relação a outra. Cada espécie fúngica possui sítios livres diferenciados que vão favorecer as ligações de apenas alguns metais dependendo também de condições experimentais (NOURBAKHSI et al. 2002).

Além destes fatores, a capacidade de concentração interna dos metais também é uma característica importante para a ligação dos metais à biomassa. Os fungos só podem biossorver metais em concentrações que não sejam tóxicas a seu crescimento. Existem metais essenciais as funções biológicas como K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Co, Mn e outros que não são essenciais como Cs, Cd, Pb, Al, Sn, Cr, Ni. Microrganismos podem biossorver os dois tipos de metais essenciais e não essenciais, entretanto a toxicidade dos elementos não essenciais é maior em relação aos elementos essenciais, pois é mais comum interações físico-químicas não específicas (YOUNG & BANKS, 1998). O metal essencial ao desenvolvimento do microrganismo pode ser removido numa quantidade maior, pois sua concentração interna não leva a toxicidade

pelos mesmo. Este fator junto aos demais estudados é que definem a capacidade de ligação da biomassa fúngica aos metais pesados (SAY et al. 2001).

Entre os fungos testados, aqueles que demonstraram maior capacidade para bioacumular e adsorver cromo foram: *Phoma* sp. UFMG-04, a linhagem *Mycelia sterila* UFMG-02 e *A. niger* UFMG-03; para adsorver níquel foram *A. terreus* UFMG-01. Os fungos filamentosos mostraram capacidade de ligações aos metais em escalas diferenciadas e os melhores resultados foram obtidos com o *A. terreus* UFMG-F01.

Nos experimentos com os fungos filamentosos foi mostrada a importância de se imobilizar a biomassa morta ou viva, pois este processo protege a biomassa dos efeitos tóxicos do meio, facilita a separação da biomassa imobilizada do meio líquido, torna o custo do processo menos oneroso e facilita a bioissorção (BAI & ABRAHAM, 2003). O suporte utilizado não pode mudar as características da biomassa, e nem ter baixa resistência em ambientes tóxicos, pois pode prejudicar a capacidade da biomassa de remover metais pesados (BAI & ABRAHAM, 2003).

O fungo *Aspergillus terreus* UFMG-F01 vivo e morto foi imobilizado em poliuretano, alginato e alumina, e testado quanto a sua capacidade de bioissorver metais pesados em soluções sintéticas e efluentes siderúrgicos. O fungo foi um ótimo bioissorvente dos três metais pesados: cromo, níquel e ferro. A linhagem de *Aspergillus terreus* UFMG-F01 teve alta capacidade de bioissorver em ambas preparações da biomassa, imobilizada ou não, devendo ser considerado um bom bioissorvente para tratamento de efluentes.

Como descrito por DIAS et al. (2002), o *A. terreus* UFMG-F01 teve grande afinidade aos metais pesados (Cr, Ni e Fe) tanto na forma livre como na imobilizada. Na imobilização com o poliuretano o fungo vivo teve grande adesão ao suporte. O poliuretano apresentou resistência às condições tóxicas do efluente industrial utilizado, além de manter o microrganismo vivo no interior do suporte. A biomassa fúngica imobilizada neste suporte foi capaz de bioissorver os metais cromo, níquel e ferro a partir de efluentes siderúrgicos. Quando foi testada a biomassa imobilizada em alginato, os resultados mostraram que o fungo adsorveu os metais a partir de soluções sintéticas do que do efluente siderúrgico. A biomassa imobilizada em alginato não apresentou resistência quando exposta ao efluente siderúrgico pois as esferas perderam a forma e a bioissorção ficou reduzida para todos os metais, quando comparado com os outros suportes utilizados.

O suporte alumina apresentou resistência às condições tóxicas do efluente não perdendo a forma de esfera, porosidade e alterações na capacidade de bioadsorção dos metais. Isto pode ser devido a capacidade do suporte de não influenciar na composição dos sítios da biomassa fúngica e com isto facilitar a remoção de metais pesados.

Entre os suportes testados ficou demonstrado que o suporte alumina apresentou melhores condições para os testes de bioadsorção com biomassa morta. Os melhores resultados para bioadsorção de metais utilizando biomassa viva foram obtidos com o suporte poliuretano, pois este não impede o crescimento de células fúngicas quando comparado a outros fungos filamentosos utilizados neste trabalho o *A. terreus* demonstrou possuir um potencial maior para o tratamento de efluentes siderúrgicos. Os resultados deste estudo indicam a possibilidade de tratamento de efluentes industriais utilizando fungos filamentosos.

## 6. CONCLUSÕES

Dos quinze fungos isolados dos tanques dos efluentes siderúrgicos, nove foram capazes de remover os metais pesados, cromo, ferro e níquel de soluções sintéticas e efluentes siderúrgicos.

As linhagens *Aspergillus terreus* UFMG-F01, *Mycelia sterila* UFMG-F02, *Aspergillus niger* UFMG-F03 e *Phoma* sp UFMG-F04 apresentaram a maior capacidade de remoção dos metais pesados estudados.

As melhores condições cinéticas para a remoção dos metais estudados nos testes de bioadsorção pela biomassa fúngica, viva ou morta, dos quatro fungos selecionados, foram: pH 4,0, concentração de metais de 50 a 400 mg e temperatura de 35°C.

A biomassa de *A. terreus* UFMG-F01, viva ou morta, e não imobilizada, foi capaz de bioadsorver os três metais estudados, tendo maior afinidade pelos elementos cromo e ferro.

A biomassa viva de *A. terreus* UFMG-F01, aderiu eficientemente ao suporte poliuretano e mostrou maior afinidade pelos metais cromo e ferro presentes no efluente siderúrgico.

A biomassa fúngica morta de *A. terreus* UFMG-F01, imobilizada em alumina, apresentou os melhores resultados para remoção de metais de solução sintética e efluente siderúrgico. Isto pode ser devido a resistência do suporte às condições adversas do efluente industrial utilizado, e também por este suporte apresentar esferas com porosidade controlada e não interferir com os sítios de ligação dos metais presentes na biomassa fúngica.

A técnica sol-gel utilizada para imobilizar a biomassa morta da linhagem *A. terreus* UFMG-F01, foi eficiente no presente estudo podendo, portanto, ser usada em experimentos de imobilização de biomassa para a bioadsorção de metais.

A bioadsorção de metais pela biomassa fúngica de *A. terreus* UFMG-F01 a partir de soluções sintéticas foi maior do que aquela obtida a partir de efluentes siderúrgicos,

provavelmente devido a menor complexidade destas soluções e facilidade no controle das condições ideais para o processo de remoção de metais.

A biomassa fúngica morta de *A. terreus* UFMG-F01 imobilizada em alginato teve menor capacidade de bioabsorção dos metais pesados estudados, quando comparada com os suportes de alumina e poliuretano, No suporte alginato, a biomassa fúngica teve maior afinidade ao ferro nos testes de bioabsorção em soluções sintéticas e efluentes siderúrgicos.

A biomassa de *A. terreus* UFMG-F01 imobilizada em alumina mostrou ser um excelente bioabsorvente de cromo, ferro, níquel com potencial aplicação biotecnológica no tratamento de efluentes siderúrgicos.



## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOYSIUS, R., KARIM, M.I.A; ARIFF, A. B.. The mechanism of cadmium removal from aqueous solution by non metabolizing free and immobilized live biomass of *Rhizopus oligosporus*. *World journal of Microbiology & Biotechnology*, v.5 p.571-578, 1999.
- ANSELMO, A.M.; MATEUS, M.; CABRAL, J.M.S.; NOVAIS, J.N. Degradation of phenol by immobilized cell of *Fusarium floccifer*. **Biotechnol Lett.** V 7 p. 889-894, 1985.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZONI, W. **Biotecnologia – Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1983.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 3000 – Metals. In; Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 ed. Washington: **APHA**. p. 3-18, 1992.
- ATKINSON, B.G.M & PINCHES, A. Process Intensification Using Cell Support Systems. **Process Biochem.**, v 20, p24-32, 1980.
- AXTELL, R.C. & GUZMAN, D.R. Encapsulation of the mosc fungal pathogen *Lagenidium giganteum* calcium alginate. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 3, p. 450-459, 1987.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculation carrier slow release of bacteria that affect plant growth. **Appl. Env. Microbiol.**, v.51, p 1089-1098, 1986.
  
- BEDELL. G & DARNALL, D, W, Immobilization of nonviable, biosorbent, algal biomass for the recovery of metal ions in: Volesky, 13 ( Ed. )

**Biosorption of heavy metals.** Boca Raton: CRC press, Cap 32, p. 313-326, 1990.

- BRADY, D. & DUNCAM, J.R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, v. 41, p. 149-154, 1994.
- BRANDY, D., STOLL A. DUNCAM, J.K. Biosorption of heavy metal cations by non viable yeast biomass. **Environ. Technol.**, v. 15, p. 429-438, 1994.
- BRADY, J.M. & TOBIM, J.M. Binding of hard and soft metal ions to *Rhizopus arrizus* biomass. **Enz. Microb. Technol.**, v. 17, p. 791-796, 1995.
- CABRAL, J .P.S. Selective binding of metal ions to *Pseudomonas syringae* cells, *Microbios*, v. 71, 9. 47-53, 1992.
- CASSIDY, M.B., LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Microbiology*. v. 16, p. 79-101, 1996.
- CASTRO, H.F. Biocatalyst and substrate properties for alcohol production, Ph.d. Thesis, university of Manchester, England, 1985.
- CHEN, J.M. & HAO, J. Biological Removal of Aqueous Hexavalent Chromium, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 69, p. 70-76, 1997.
- CHIBATA, L.; T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A. (Eds) *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Washington D.C. : American Society of Microbiology, cap. 18, p. 217-229, 1986.
- CHONG, K.H. & VOLESKY, B, Metal Biosorption Equilibria in a ternary System. *BIOTECHNOL and BIOENG.* V. 49, p. 629-638, 1996.
- CHONG, K.H. Biosorption of heavy metal montreal: Department of Chemical Engineering, McGill University, ( Dissertation Course Load for Selected Topics in Chemical Engineering ) p. 43, 1993.

- CONNICK, W.J. Controlled release of the herbicides 2,4- D and dicholobenil from alginate gels. *J. Appl. Poly. Sci.*, v. 27, p. 3341-3348, 1982.
- COSTA, A.C E FRANÇA, P.F. The use of seaweeds as immobilization supports for microganisms used in continuos cadmium biosorption. *Biotechnology Techniques*. V. 10, p. 761-766, 1996.
- CURTUS, H. *Biologia*. Trad. H. Sauaia. 2 ed, Rio De Janeiro: Guanabara Koogan S.A., Glossário, p. 939, 1977.
- DARNALL, D.W.GREENE, D.; HENZIL, M.T.; HOSEA, J.M.; MCPHERSON, R.A.; SNEDDON, J & ALEXANDER, M.D.; Selective recovery of gold and other metal ions from na algal biomass. *Environ. Sci. Techonol.*, v. 20, p. 206-208, 1986.
- FRAVEL, D.R.; MAROIS. J.J LUMSDEN , R.D.; CONNICK, jr, encaosulatioes of pontecial biocontrol agents in na alginate- clay matriz. **Phytoparthology**. V.75, p. 774-77, 1985,
- FRY, I.V. & MEHLHORN, R.J. Polyurethane and alginate- immobilized algal biomass for the removal of aqueus toxic metals, In: **Emerging techonology for Bioremediation** if /metals ( Means JL and RE hindree, eds), p. 130-134, CRC press, Florida, USA, 1994.
- FOUREST, E. & ROUX, J.C. A Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. **Appl Microbiol. Biotechonol.**, 37,p. 399-403, 1992.
- FURST, A, metals interaction in carcinogenesis, in: Fishbein, L. Furst, And Mehaim, M.A (eds), *Genotox and Carcinogenic Metals : Environment and exposure*, Scientic publishing co., Princeton, New Jersey, p. 295-327, 1987.
- GADD, G.M. The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and ohysiololy of the process and aplications for biotechbnology. In: *Imobilization of ions*,

biosorption. Ens. A H, ECCLESS & S. Hunt, EILIS HORWOOD, CHICHESTER, p. 135-147, 1986.

- Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganismis. Experiencia. V. 46, p. 834-840, 1990.
- Biosorption, J Chem. Technol Biotechnol., v. 55, n. 3, p. 302-304, 1992.

GADD, G.M. & WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? TIBTECH., v. 11, p. 353-359, 1993.

- GOMES, N.C.M. Acumulação e recuperação de metais por uma linhagem de Aspergillus em solução de uma mineração de ouro. Dissertação de mestrado do programa de Pós- graduação em Microbiologia da UFMG, Belo horizonte, MG, 1995.
- GHOMMIDH, C.; NAVARRO, J.M., DURAND, G. A STUDY of acetic acid production by immobilized acetobacter ai cells: ocygen transfer, Biotechnology and Bioengineering, v. 24, p, 122-127, 1982.
- HARDTMEIER, W. Immobilized Biocatalysts: Na introduction. Editora Springer-Verlag, Berlin. Cap. 2, p. 123-130, 1988.
- KYISCH, J. & SZAJÁNI, B. Effects of immobilization on biomass production and acetic acid fermentation of Acetobacter aceti as a function of temperature and pH. Biotechnology Letters, v. 18, p. 393-396, 1996.
- KUYUCAK, N. VOLESKY, B. New algal bisorbent for a gold recovery process, In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON BIOHYMETALLURGY. Warwick, Biohydrometallurgy proceedings of the international Symposium. Warwick: STL, p. 453-463, 1988.

- LEFEBVRE, J. & VICENT, J.C. Diffusion- reaction- growth ling in gel- immobilized cell systems: model and experiment. En Microb. Techonol. v. 17,p. 276-284, 1995.
  
- MASCASKIE, L.E & DEAN, A.C. R. Microbial metabolism, desolubilization and depositios of heavy metals: ,metal uptake by immobilized cells and application to the detoxication of liquid waster Treatment. V. 12, p. 159- 201, ed. A. Mirzrahi. Alan R. Liss, New York, 1989.
  
- MATTUSCHKA, B. & STRAUBE, G. Biosorption of Metals by a Waster Biomass, J. Chem. Tech. Biotechnol., v. 58, p. 57-63, 1993.
  
- MERIAN, E. A Metals and Their Compouds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance. 2 ed. New York: VHC, caps. I. 10,I.16, I 17, II. 14, II.22, p. 491-495, 585-603, 853-861, 945-957, 1101-1121, 1997.
  
- MICHAEL, Z.C.; HU, C.; REEVES, M. Biosorption of Uranium by Pseudomonas aeruginosa Strain CSU Immobilized in novel Matrix, Biotecgnol. Prog., 13, p. 60-70, 1997.
  
- MOSBACH, K. Immobilized Enzymes Methods in Enxymology. V44, Acadenuc Press, New York, 1976.
  
- NILSSOM, I., OHLSON, S. HAGGSTROM, L. MOLIN N., MOSBACH, K. Denitrification of Water Using immobilized Pseudomonas denitrificans Cells. Er, j. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 10, p. 261-274, 1980.