



JULIA FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFILTRO PARA
BIOSSORÇÃO DE COBRE POR *Cladosporium
cladosporioides* (Fres.) de Vries**

LAVRAS – MG

2010

JULIA FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFILTRO PARA BIOSSORÇÃO DE
COBRE POR *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun

LAVRAS – MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Júlia Ferreira da.

Desenvolvimento de biofiltro para bioissorção de cobre por
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries / Júlia Ferreira da
Silva. – Lavras : UFLA, 2010.

140 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Bibliografia.

1. Efluentes. 2. Tratamento biológico. 3. Fungos. 4. Metais
pesados. 5. Biofilme. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 628.168

JULIA FERREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFILTRO PARA BIODISSORÇÃO DE
COBRE POR *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 08 de abril de 2010.

Profa. Dra. Teresa Cristina Brasil Paiva	USP
Prof. Dr. Luiz Fernando Coutinho de Oliveira	UFLA
Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Prof. Dr. Carlos José Pimenta	UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun
Orientadora

**LAVRAS – MG
2010**

Ao meu pai Nelson (in memorian), à minha mãe Eni, à minha filha Emília, aos meus irmãos Andréa, Márcio, Sérgio, Silvana e Rita de Cássia, aos meus sobrinhos, cunhados e cunhadas, primos e tios que muito me apoiaram.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Sara Chalfoun que muito me apoiou, deu bons conselhos, foi companheira e amiga e sempre esteve à disposição para resolver meus problemas e tirar minhas dúvidas.

Ao professor Cláudio Milton Montenegro Campos que foi muito amigo, participou e colaborou muito para que esta tese fosse desenvolvida, disponibilizando o laboratório para iniciar meus experimentos.

À professora Maria das Graças e seus orientados por terem cedido seu tempo e colaborado na execução das análises realizadas no Laboratório de Análise Físico-química de Aguardente do Departamento de Química.

Ao professor Eduardo Alves, à Heloísa, Douglas e Fabiano, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, por me auxiliarem nas análises de microscopia.

Ao professor Francisco do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura – USP/Piracicaba, por gentilmente ter cedido o laboratório para realização da microanálise de raios-X.

À Sara, Marcelo e professor Carlos Pimenta, por gentilmente terem cedido as dependências da Biofábrica para a última etapa do trabalho.

À minha filha Emília que, ainda uma criança, já tem tantas horas de laboratório e seminários e ainda, pela paciência em me acompanhar na realização deste trabalho.

À minha mãe, pelo apoio incondicional em todas as horas, durante mais uma jornada de minha vida.

Aos meus irmãos que muito me ajudaram a vencer mais uma etapa.

À Cláudia Labory e João Cândido por terem me estendido a mão no momento mais crucial desta jornada e aos seus filhos Wladmir e Vinícius pelo carinho que me dispensaram, não me deixando sentir triste nas horas vagas.

Ao Serginho e a Diva por terem “adotado” a Emília na fase final deste trabalho e terem cuidado muito bem dela, não deixando que nada lhe faltasse.

Ao Erlon, estudante nota 10, pela ajuda, conselhos, companherismo e acompanhamento durante todas as etapas deste trabalho, tendo me auxiliado muito nos experimentos e na escrita dessa tese, especialmente no capítulo de isoterma de adsorção, que sem seu empurrão e seus palpites este capítulo não teria saído.

Ao Alexsander do Laadeg que me ajudou muito na montagem dos experimentos e ao Wesley (Laadeg) pela companhia e auxílio nos experimentos.

A Vicentina que sempre me guiou nos laboratórios da EPAMIG, me ajudou e pôs a mão na massa sempre que precisei de sua ajuda.

A Deila e Marcelo que foram companheiros nesta jornada.

A todos os meus amigos que indiretamente participaram dessa tese, com sua amizade, carinho, suporte financeiro e uma palavra amiga sempre.

"Só Deus pode criar
Mas você pode valorizar o que Ele criou
Só Deus pode dar a vida
Mas você pode transmiti-la e respeitá-la
Só Deus pode dar a paz
Mas você pode semear a união
Só Deus pode dar a força
Mas você pode apoiar quem desanimou
Só Deus pode infundir esperança
Mas você pode restituir a confiança ao irmão
Só Deus pode dar o amor
Mas você pode ensinar seu irmão a amar
Só Deus pode dar a alegria
Mas você pode sorrir a todos
Só Deus é o caminho
Mas você pode indicá-lo aos outros
Só Deus é a luz
Mas você pode fazê-la brilhar
Só Deus é a vida
Mas você pode dar aos outros a alegria de viver
Só Deus pode fazer o impossível
Mas você sempre poderá fazer o que é possível
Só Deus pode fazer milagres
Mas você pode fazer sacrifício
Só Deus pode fazer a semente do bem germinar
Mas você pode plantá-la no coração humano."

(Autor desconhecido)

RESUMO GERAL

Nos últimos anos grande atenção tem sido dada ao tratamento de efluentes contendo metais pesados, visto que a contaminação das águas por estas substâncias ocorre frequentemente e cada vez com maior quantidade empregada nos processos industriais. O crescimento de fungos em meios suportes colocados dentro de reatores (biofiltros) produz uma remoção de metais eficiente e de baixo custo, podendo ser utilizada para diversos metais com o uso de diferentes espécies. Em razão das vantagens apresentadas pela bioadsorção, nesta pesquisa objetivou-se desenvolver biofiltros preenchidos com diferentes meios suportes inoculados com o fungo *Cladosporium cladosporioides*, para avaliar a capacidade de adsorção de cobre. O inóculo utilizado foi o micélio do fungo *Cladosporium cladosporioides*, isolado G088, pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do EcoCentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pré-cultivado em meio solidificado BDA (batata-dextrose-agar), cultivado em placas de Petri de 150 mm no meio BDA, com temperatura de 25° C por 10 dias. Foram utilizados microscopia eletrônica de varredura aliada à técnica de micro análise de raios-X com EDS (Energy Dispersive Spectrometry), sendo o fungo imerso em soluções de sulfato de cobre nas concentrações de 0, 10, 20 e 50 mg L⁻¹. Depois, por meio de modelos de isoterma de adsorção e pela cinética de adsorção, a bioadsorção foi avaliada e, monitorados os biofiltros preenchidos com os meios suportes argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado amarelo 5/8", o processo de bioadsorção por *Cladosporium cladosporioides* foi estudado. O fungo *Cladosporium cladosporioides* foi capaz de adsorver o metal cobre na forma de sulfato de cobre, como confirmado pela microanálise de raios-X. A melhor adsorção do metal ocorreu quando o fungo foi imerso na solução com concentração de 20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre. O cobre bivalente, na forma de sulfato de cobre foi adsorvido por *Cladosporium cladosporioides* nos meios suportes utilizados: escória de alto forno, argila expandida e tubo corrugado amarelo 5/8" e a concentração de cobre de 6,27 mg L⁻¹, ou 20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre foi a melhor concentração no processo de bioadsorção pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado nos meios suportes utilizados. O biofiltro foi eficiente para o cultivo do fungo e deve ser utilizado como polimento para efluentes contendo metal, ou seja, deve ser utilizado após o tratamento biológico ou químico, quando a concentração de matéria orgânica já tenha atingido os níveis de tratamento desejáveis.

Palavras-chave: Reatores. Metais pesados. Tratamento de efluentes. Meio suporte.

GENERAL ABSTRACT

The treatment of effluents containing heavy metals has attracted great attention in the last decades as water contamination with these substances occurs frequently and in increasingly larger amounts in industrial processes. Fungi growth in support media placed inside the reactors (biofilters) produces an effective, low-cost metal removal, and it can be used for several metals by using different species. In view of the biosorption advantages, this work aimed to develop biofilters filled with different support media inoculated with the fungus *Cladosporium cladosporioides* to evaluate copper absorption capacity. The inoculum used was the mycelium of the fungus *Cladosporium cladosporioides*, isolate G088, from the collection of the Laboratory of Plant Pathology and Microbiology of EPAMIG EcoCenter, pre-cultivated in solidified PDA (potato-dextrose-agar) medium, cultivated in 150 mm Petri dishes in PDA medium, at 25° C for 10 days. Scanning electron microscopy combined with x-ray microanalysis with EDS (Energy Dispersive Spectrometry) was used, with the fungus being immersed in copper sulfate solutions at concentrations of 0, 10, 20 and 50 mg L⁻¹. By means of adsorption isotherm models and adsorption kinetics, biosorption was evaluated and after the biofilters filled with the support media expanded clay, alkali-activated slag and 5/8 yellow corrugated pipe were monitored, the biosorption process by *Cladosporium cladosporioides* was studied. The fungus *Cladosporium cladosporioides* was capable of adsorbing the metal copper in the form of copper sulfate, as confirmed by X-ray microanalysis. The best metal adsorption occurred when the fungus was immersed in solution with concentration of 20 mg L⁻¹ of copper sulfate. Bivalent copper, in the form of copper sulfate was adsorbed by *Cladosporium cladosporioides* in the following support media: alkali-activated slag, expanded clay, and 5/8" yellow corrugated pipe with copper concentration of 6.27 mg L⁻¹, or 20 mg L⁻¹ of copper sulfate being the best concentration obtained in the biosorption process by the fungus *Cladosporium cladosporioides* inoculated in the support media used. The biofilter was efficient for fungus cultivation and must be used as polish for heavy metal-containing effluents, i.e., it must be used after biological or chemical treatment, when the organic matter concentration has already reached the desired treatment levels.

Keywords: Reactors. Heavy metals. Effluent treatment. Support medium.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 Mecanismos de biossorção: (a) classificação de acordo com a dependência no metabolismo celular, (b) classificação de acordo com o local onde o metal removido é encontrado..... 37
- Figura 2 Eletromicrografia ótica do fungo *Cladosporium cladosporioides*..... 40

Capítulo 2

- Figura 1 Espectro da microanálise de raios-X da composição das amostras de *Cladosporium cladosporioides* em diferentes concentrações de sulfato de cobre. A) 0 mg L⁻¹; b) 10 mg L⁻¹; C) 20 mg L⁻¹ e D) 50 mg L⁻¹..... 59
- Figura 2 Crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*, após imersão na solução de sulfato de cobre, cultivado em meio solidificado BDA e incubado a 25 °C. (a) aos 10 dias; (b) aos 14 dias..... 61
- Figura 3 Eletromicrografia de varredura das amostras de *Cladosporium cladosporioides* para concentração de 20 mg L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O. Setas para direita indicam esporos, setas para esquerda indicam hifas..... 61

Capítulo 3

- Figura 1 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 0,25; 0,50 e 0,75 h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno..... 73

Figura 2	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno.....	73
Figura 3	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 3,0; 4,0 e 5,0h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno.....	74
Figura 4	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 6,0 12,0 e 24h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno.....	74
Figura 5	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno para a concentração de 3,53 mgCu ²⁺ L ⁻¹ (10 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	78
Figura 6	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno para a concentração de cobre de 6,27 mg L ⁻¹ (20 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	78
Figura 7	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno para a concentração de cobre de 13,06 mg L ⁻¹ (50 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	79
Figura 8	Efeito do tempo de contato com a variação das concentrações iniciais de cobre na velocidade de adsorção para fungo inoculado em escória de alto forno.	80
Figura 9	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 0,25 e 0,50h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida.....	81

Figura 10	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida.....	82
Figura 11	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 3,0; 4,0 e 5,0h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida.....	82
Figura 12	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 6,0 12,0 e 24h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida.....	83
Figura 13	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida para a concentração de cobre de 3,53 mg L ⁻¹ (10 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	85
Figura 14	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida para a concentração de cobre de mgCu ²⁺ L ⁻¹ (20 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	86
Figura 15	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida para a concentração de cobre de 13,06 mg L ⁻¹ (50 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	86
Figura 16	Efeito do tempo de contato com a variação das concentrações iniciais de cobre na velocidade de adsorção para fungo inoculado em argila expandida.....	87
Figura 17	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 0,25; 0,50 e 0,75 h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8”.....	88

Figura 18	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5,0h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8”.....	89
Figura 19	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 3,0; 4,0 e 5,0h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8”.....	89
Figura 20	Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 6,0 12,0 e 24h para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8”.....	90
Figura 21	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8” para a concentração de cobre de 3,53 mg L ⁻¹ (10 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	92
Figura 22	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8” para a concentração de cobre de 6,27 mg L ⁻¹ (20 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	93
Figura 23	Cinética de adsorção de cobre pelo fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8” para a concentração de cobre de 13,06mg L ⁻¹ (50 mg L ⁻¹ de sulfato de cobre).....	93
Figura 24	Efeito do tempo de contato com a variação das concentrações iniciais de cobre na velocidade de adsorção para fungo inoculado no tubo corrugado amarelo 5/8”.	94
Capítulo 4		
Figura 1	Desenho esquemático do biofiltro (medidas em cm).....	107

Figura 2	Biofiltros prismáticos construídos em vidro de 20 mm de espessura.....	107
Figura 3	Biofiltros contendo os meios suportes argila expandida, pedra pomes e escória de alto forno sem inoculação.....	110
Figura 4	Biofiltros com o cultivo de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em meio suporte argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado 5/8”.....	111
Figura 5	Variação da temperatura, durante o monitoramento, dos biofiltros preenchidos com diferentes meios suportes inoculados com <i>Cladosporium cladosporioides</i>	117
Figura 6	Variação do pH da solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ durante o monitoramento dos biofiltros preenchidos com os meios suportes não inoculados.....	118
Figura 7	Variação do pH, durante o monitoramento dos biofiltros preenchidos com os diferentes meios suportes inoculados com o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	119
Figura 8	Quantidade de oxigênio dissolvido (OD) observada nos biofiltros com os diferentes meios suportes inoculados com o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	120
Figura 9	Meio suporte pedra pomes antes de ser colocada no biofiltro contendo a solução de CuSO_4 e após ser retirada da solução.....	124
Figura 10	Concentração de cobre no líquido dos biofiltros preenchidos com os diferentes meios suportes durante o monitoramento na segunda etapa da pesquisa.....	126

Figura 11	Concentração de cobre, em porcentagem, na solução e no biofilme de <i>Cladosporium cladosporioides</i> cultivado em argila expandida nos diferentes tempos de contato.....	128
Figura 12	Concentração de cobre, em porcentagem, na solução e no biofilme de <i>Cladosporium cladosporioides</i> cultivado em escória de alto forno nos diferentes tempos de contato.....	128
Figura 13	Concentração de cobre, em porcentagem, na solução e no biofilme de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em tubo corrugado amarelo 5/8” nos diferentes tempos de contato.....	129
Figura 14	Eletromicrografia de varredura do reagente sulfato de cobre (A e B) e do reagente sulfato de cobre diluído na concentração de 20 mg L ⁻¹	132
Figura 15	Eletromicrografia de varredura do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> antes de ser mergulhado em solução de sulfato de cobre.....	133
Figura 16	Eletromicrografia de varredura do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado no meio suporte argila expandida depois do contato com a solução de sulfato de cobre por 60 dias na concentração de 20 mg L ⁻¹	134
Figura 17	Eletromicrografia de varredura do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado no meio suporte escória de alto forno depois do contato com a solução de sulfato de cobre na concentração de 20 mg L ⁻¹ por 60 dias.....	135

Figura 18 Eletromicrografia de varredura do fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado no meio suporte tubo corrugado amarelo 5/8” depois do contato com a solução de sulfato de cobre na concentração de 20 mg L⁻¹ por 48 dias.....

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 1	Concentração de cobre das soluções sintéticas de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), no tempo zero.....	72
Tabela 2	Equações de regressão e comparação dos coeficientes de regressão (R^2) para os diferentes tempos de contato estudados.....	75
Tabela 3	Efeito do tempo de contato (T_c) nas constantes de Freundlich K_d (constante de equilíbrio de adsorção) e n (constante relacionada à intensidade de adsorção).....	77
Tabela 4	Equações de regressão e comparação dos coeficientes de regressão (R^2) para os diferentes tempos de contato estudados.....	84
Tabela 5	Efeito do tempo de contato (T_c) nas constantes de Freundlich K_d (constante de equilíbrio de adsorção) e n (constante relacionada à intensidade de adsorção).....	84
Tabela 6	Equações de regressão e comparação dos coeficientes de regressão (R^2) para os diferentes tempos de contato estudados.....	91
Tabela 7	Efeito do tempo de contato (T_c) nas constantes de Freundlich K_d (constante de equilíbrio de adsorção) e n (constante relacionada à intensidade de adsorção).....	91

Capítulo 4

Tabela 1	Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos: Acidez total (AT), sólidos totais (ST), demanda bioquímica de oxigênio (DBO ₅), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (NTK) e fósforo (P) do efluente sintético do biofiltro contendo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em argila expandida.....	121
Tabela 2	Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos: Acidez total (AT), sólidos totais (ST), demanda bioquímica de oxigênio (DBO ₅), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (NTK) e fósforo (P) do efluente sintético do biofiltro contendo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em tubo conduíte.....	122
Tabela 3	Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos: Acidez total (AT), sólidos totais (ST), demanda bioquímica de oxigênio (DBO ₅), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (NTK) e fósforo (P) do efluente sintético do biofiltro contendo <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado em escória de alto forno.....	123
Tabela 4	Estatística descritiva da concentração de sólidos observada no efluente dos biofiltros sem inoculação dos meios suportes durante o monitoramento.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	graus centígrados
AT	acidez total
a_w	atividade de água
BDA	batata-dextrose-ágar
C.V.	coeficiente de variação
Cd	cádmio
cm ²	centímetro quadrado
Cu	cobre
CuSO ₄ .5H ₂ O	sulfato de cobre pentahidratado
CYA	extrato de levedura, sacarose, Agar, água destilada, concentrado Czapech e solução metal de Czapech
d ⁻¹	por dia
DBO ₅	demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dp	desvio padrão
DQO	demanda química de oxigênio
h	hora
H ₂ S	ácido sulfídrico
K	coeficiente de reação (dia ⁻¹)
<i>Kd</i>	constante de equilíbrio de adsorção da isoterma de Freundlich
kJ mol ⁻¹	quilojoule por mol
L	litros
M	molar
MA	malte-ágar
mg	miligrama

mg cm ⁻²	miligrama por centímetro quadrado
mg L ⁻¹	miligrama por litro
MS	material suporte
<i>n</i>	constante relacionada à intensidade de adsorção da Equação de Freundlich
NTK	Nitrogênio Total Kjeldal
O ₂	oxigênio
OD	oxigênio dissolvido
P	fósforo
Pb	chumbo
pH	potencial hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila (<i>Polyvinyl chloride</i>)
R ²	coeficiente de regressão
S	quantidade de cobre adsorvida na fase sólida
ST	sólidos totais
STV	sólidos totais voláteis
SVT	sólidos voláteis totais
Tc	tempo de contato
UTm	unidade de turbidez
UV	ultravioleta

LISTA DE SIGLAS

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPAM	Conselho de Política Ambiental
EDS	Energy Dispersive Spectrometry
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
FAPEMIG	Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais
LAADeg	Laboratório de Análise de Água do Departamento de Engenharia
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
NAP/MEPA	Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura
UFPA	Universidade Federal de Lavras
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	26
1	INTRODUÇÃO	26
2	REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1	O elemento cobre	28
2.2	Águas contaminadas por metais pesados	30
2.3	Processos de adsorção e de biossorção	32
2.4	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	40
2.5	Biofiltros	42
2.6	Material suporte utilizado no biofiltro	44
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO 2 Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-x (eds) como métodos de investigação da biossorção de cobre por <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) De Vries.....	52
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1	Microrganismo	56
2.2	Solução sintética	56
2.3	Preparo para microscopia eletrônica de varredura	57
2.4	Desenvolvimento do microrganismo	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4	CONCLUSÕES	62

	REFERÊNCIAS.....	63
	CAPÍTULO 3 Modelagem da cinética de biossorção de cobre por <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries desenvolvido em diferentes meios suportes.....	64
1	INTRODUÇÃO.....	66
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1	Inóculo.....	69
2.2	Meio suporte.....	69
2.3	Solução de sulfato de cobre.....	70
2.4	Isoterma de adsorção.....	70
2.5	Cinética de adsorção.....	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1	Meio suporte escória de alto forno.....	72
3.1.1	Cinética de adsorção de cobre por <i>Cladosporium cladosporioides</i> no meio suporte escória de alto forno.....	77
3.2	Meio suporte argila expandida.....	81
3.2.1	Cinética de adsorção de cobre por <i>Cladosporium cladosporioides</i> no meio suporte argila expandida.....	85
3.3	Tubo corrugado amarelo 5/8”.....	88
3.3.1	Cinética de adsorção de cobre por <i>Cladosporium cladosporioides</i> no meio suporte tubo corrugado amarelo 5/8”.....	92

4	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	 CAPÍTULO 4 Biossorção de cobre por <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries em biofiltro com diferentes meios suportes.....	 98
1	INTRODUÇÃO.....	100
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1	Local de Execução.....	102
2.2	Inóculo.....	103
2.3	Meio Suporte.....	103
2.4	Inoculação do meio suporte (MS).....	105
2.5	Preparo do efluente sintético.....	106
2.6	Construção do biofiltro.....	106
2.7	Análises de cobre.....	108
2.8	Monitoramento do biofiltro com os meios suportes não inoculados.....	109
2.9	Monitoramento do biofiltro com os meios suportes inoculados.....	111
2.10	Análises de microscopia.....	112
2.11	Avaliação microbiológica.....	113
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
3.1	Meio Suporte.....	114
3.2	Desempenho dos biofiltros.....	116

3.2.1	Temperatura.....	116
3.2.2	pH.....	117
3.2.3	Atributos físico-químicos.....	119
3.3	Avaliação da concentração de cobre.....	125
3.4	Análises de microscopia.....	131
3.5	Avaliação microbiológica.....	136
4	CONCLUSÕES.....	137
	REFERÊNCIAS.....	138

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A poluição do meio aquático por metais pesados pode causar alterações das características físicas (turbidez, cor, temperatura, viscosidade, tensão superficial), químicas (demanda química de oxigênio (DQO), pH, acidez, alcalinidade, força iônica, oxigênio dissolvido (OD), grau de toxicidade, nutrientes) ou biológicas (espécies de fitoplâncton e zooplâncton), comprometendo a sua qualidade para o consumo humano e para outros tipos de atividades, dependendo do grau de poluição ou contaminação (BARROS, 2006; CLARISSE; AMORIM; LUCAS, 1999).

Grandes quantidades de efluentes contendo elevados níveis de metais tóxicos são resultantes do aumento do uso de metais e de produtos químicos nos processos industriais. Indústrias de corantes, têxteis, de alimentos, petroquímicas, além das agroindústrias, lançam seus efluentes nos cursos d'água, na maioria das vezes sem um tratamento prévio adequado. A presença de metais tóxicos atribui problemas de disposição no meio ambiente, decorrente da sua natureza não degradável e persistente. Essa persistência garante os efeitos ao longo do tempo, mesmo depois de interrompidas as emissões (AHLUWALIA; GOYAL, 2007; SRIVASTAVA; MAJUMDER, 2008).

Por possuírem características que lhes conferem as propriedades de bioacumulação e de biomagnificação na cadeia alimentar, ou seja, a absorção metabólica e a translocação ativa para dentro da célula que resultam em acumulação celular, os metais pesados apresentam potencial risco à saúde humana e a outras formas de vida, causam incômodos e, algumas vezes, danos irreversíveis ao sistema vital do corpo. Há que se considerar, ainda, a

permanência no ambiente e as distorções nos processos metabólicos dos seres vivos (AHLUWALIA; GOYAL, 2007; JORDÃO; PEREIRA; PEREIRA, 2002).

Métodos convencionais de tratamento de efluentes contendo metais pesados produzem quantidades significativas de subprodutos com características recalcitrantes, além de serem técnicas onerosas e de difícil reprodução (BARROS, 2006).

Novos métodos para o tratamento de efluentes contendo metais pesados, com o uso de microrganismos como despoluidores, precisam ser desenvolvidos, sendo necessário que sejam menos onerosos e mais eficientes para a diminuição da contaminação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Entender o mecanismo pelo qual os microrganismos acumulam metais é fundamental para o desenvolvimento de processos microbiológicos para remoção e recuperação de metais de soluções aquosas (FARKAS, 1980).

Este trabalho está estruturado em quatro capítulos: o Capítulo I contém a revisão de literatura dos assuntos discutidos na tese e os objetivos; o Capítulo II demonstra a bioadsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*; o Capítulo III estuda as isotermas e a cinética de bioadsorção e o Capítulo IV avalia a bioadsorção em escala de bancada, com o estudo do comportamento do fungo inoculado nos meios suportes pré-estabelecidos dentro de um reator (biofiltro).

Conduziu-se esta pesquisa com o objetivo de desenvolver biofiltros preenchidos com os meios suportes pré-estabelecidos argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado amarelo 5/8", inoculados com o fungo *Cladosporium cladosporioides* para avaliar a capacidade de adsorção de cobre pelo fungo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O elemento cobre

O elemento cobre possui este nome por ser originado do termo em latim *cuprum*, que significa ilha de Chipre, famosa por suas minas de cobre, sendo um metal dúctil e marrom avermelhado (MACÊDO, 2006). É considerado metal pesado por possuir densidade de $8,96 \text{ g cm}^{-3}$, sendo que diversos compostos são capazes de reagir com ele; sua concentração na fase líquida é determinada pela solubilidade da forma menos solúvel presente no sistema (KING, 1996).

O cobre pode existir em águas naturais em forma dissolvida como íon cúprico ou na forma de complexo com ânions inorgânicos ou ligantes orgânicos, como por exemplo, carbonatos, cloretos ácidos húmicos ou fúlvicos. Duas séries de compostos são originadas do cobre: os cuprosos, em que ele funciona como monovalente e os cúpricos, em que funciona como bivalente (MACÊDO, 2006). O cobre provém de águas residuárias de indústrias como a galvanoplastia, mineração, elétrico e eletrônicos, produção de ferro e aço, indústria de metais não-ferrosos, indústrias de materiais de impressão e fotográficos, metalúrgicas e indústrias de acabamento (MUKHHOPADHYAY; NORONHA; SURAISSHUMAR, 2007).

Sendo considerado como um dos elementos mais potencialmente tóxicos (CAMARGO; ALLEONI; CASAGRANDE, 2001), o cobre é um micronutriente, está incluído no ciclo bioecológico e apresenta papel essencial na nutrição das plantas animais e humanos, no entanto, quando sua concentração é elevada, torna-se tóxico (KING, 1996; SILVEIRA; ALLEONI, 2007), pois quando plantas e animais são expostos a concentrações elevadas de cobre indisponível, a bioacumulação, ou seja, a acumulação celular que resulta da

absorção metabólica e da translocação ativa para dentro da célula, com possíveis reações tóxicas, pode ocorrer (MACÊDO, 2006).

O cobre é um nutriente essencial, utilizado em várias funções fisiológicas e bioquímicas, é um metal redox fortemente ativo, encontrado em pequenas quantidades no organismo humano, tanto na forma de íon cúprico (Cu II) – predominante – como na de íon cuproso (Cu I)(1) – no interior das células (LINDER, 1996).

A deficiência de cobre pode provocar anemia (HART, 1928), bem como diminuição na produção de energia e anormalidades nos metabolismos da glicose (o que pode contribuir em alguns casos para o desenvolvimento de diabetes) e do colesterol (podendo causar problemas cardíacos) (KLEVAY, 2000). Dessa forma, a deficiência de cobre compromete vários sistemas de defesa do organismo. Em contrapartida, como a diminuição do cobre está associada ao estresse oxidativo, sua elevação também causa toxicidade relacionada com a peroxidação lipídica de membranas, provocando dano celular, oxidação protéica e danos ao DNA (CHAO; ALLEN, 1992; NELSON; HUANG; MATHIAS, 1992; SAARI, 2000).

Geralmente, casos de intoxicação humana por cobre são decorrentes da ingestão de bebidas contaminadas pelo metal ou da alta ingestão de sais do mesmo (URIU-ADAMS; KEEN, 2005) e podem representar alto risco, principalmente para indivíduos portadores da doença de Wilson (BREWER, 2000; EIFE, 1999), que é uma doença autossômica recessiva, caracterizada por deficiência na proteína transportadora de cobre: a ceruloplasmina (MORO et al., 2007).

2.2 Águas contaminadas por metais pesados

A contaminação do meio ambiente é o principal problema advindo das ações do homem (MUKHPADHYAY; NORONHA; SURAISSHUMAR, 2007).

As ações antrópicas em uma bacia hidrográfica resultam, em geral, em grandes quantidades de efluentes contendo elevados níveis de metais pesados tóxicos que, quando dispostos no meio ambiente, acarretam problemas, em razão da sua natureza não degradável e persistente. Significantes quantidades de metais pesados são liberadas para o ambiente advindas das atividades humanas tais como mineração, aplicação de resíduos de indústrias, aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes, uso de lodo urbano, dentre outras (CAMARGO; ALLEONI; CASAGRANDE, 2001). Os íons de metais tóxicos apresentam potencial risco à saúde humana e a outras formas de vida. Os metais tóxicos causam incômodos e algumas vezes, danos irreversíveis ao sistema vital do corpo, podendo interferir na atividade enzimática e na formação das células vermelhas (GUINESE; ESTEVES; CAVALHEIRO, 2007; AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

Os metais pesados reduzem a capacidade autodepurativa das águas, em razão da ação tóxica exercida por estes elementos sobre os microrganismos responsáveis pela depuração natural em sistemas aquáticos (BRANCO, 1986).

Os efluentes contendo metais podem levar ao aumento de nutrientes nos cursos d'água, podendo aumentar a fertilidade dos sedimentos na coluna de água e, conseqüentemente, levar à eutrofização, ou seja, ao excesso de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) na água, que, com o tempo, produz deficiência de oxigênio nas águas, causando morte da vida aquática (GUINESE; ESTEVES; CAVALHEIRO, 2007).

Esse aumento de nutrientes pode ser decorrente dos principais grupos químicos da biomassa microbiana, capazes de participar na bioissorção, que são

os grupos eletronegativos como os grupos hidroxila ou sulfidril, aniônicos como os grupos carboxila e fosfato e grupos contendo nitrogênio como os aminoácidos. Os grupos carboxila e fosfato são considerados como importantes sítios de ligação para muitos metais tóxicos (REMACLE, 1990), enquanto os grupos amino da quitina são considerados como importantes sítios de ligação em *Rhizopus arrhizus*. (TOBIN; WHITE; GADD, 1994).

Os elementos arsênio, cádmio, cobre, cromo, mercúrio, níquel, chumbo, zinco, dentre outros, são poluentes cujos efeitos incluem toxicidade, inibição do tratamento biológico, problemas na disposição do lodo na agricultura e contaminação da água subterrânea (SPERLING, 2006). Por não serem biodegradáveis, a dificuldade na remoção dos metais pesados em águas contaminadas é maior (GUINESE; ESTEVES; CAVALHEIRO, 2007).

O nível de metais nas águas naturais brasileiras é definido pela Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 357 de 17 de março de 2005, que, no Art. 3º do Capítulo II, Classificação dos Corpos de Água, classifica as águas doces, salobras e salinas do Território Nacional, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes de qualidade e, no Artigo 7º, estabelece limites individuais, para cada substância, em cada classe, para os padrões de qualidade das águas determinados nesta Resolução. Assim, os limites para o metal cobre são (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005):

- a) para águas doces de classes I e II - Cobre dissolvido = 0,009 mg L⁻¹;
- b) para águas doces de classe III - Cobre dissolvido = 0,013 mg L⁻¹;
- c) para lançamento de efluentes - Cobre dissolvido = 1,0 mg L⁻¹

No Estado de Minas Gerais, o Copam – Conselho de Política Ambiental, estabelece na sua Deliberação Normativa de 17 de dezembro de 1986, as seguintes concentrações limites para o cobre (CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL -COPAM, 1986):

- a) para águas de classes I e II – $0,02 \text{ mg L}^{-1}$;
- b) para águas de classe III – $0,5 \text{ mg L}^{-1}$;
- c) para lançamento de efluentes - $0,5 \text{ mg L}^{-1}$

A remoção de metais pesados das águas residuárias é importante para a proteção do meio ambiente e da saúde humana (MUKHPADHYAY; NORONHA; SURAISSHUMAR, 2007)

Os métodos de tratamentos convencionais de efluentes contendo metais pesados envolvem processos físico-químicos de floculação e/ou precipitação, eletrólise e cristalização (BARROS, 2006). Os métodos químicos convencionais para remoção de metais de soluções aquosas incluem precipitação química, oxidação ou redução química, osmose reversa, filtração, tratamento eletroquímico, dentre outros. Esses processos podem ser ineficientes e extremamente caros, especialmente quando os metais na solução estão entre 1 e 100 mg L^{-1} (NOURBAKHS et al., 1994).

2.3 Processos de adsorção e de biossorção

A adsorção é um processo espontâneo de ligação que ocorre quando uma superfície de um sólido é exposta a um gás ou a um líquido. As moléculas e átomos podem se ligar de duas maneiras a uma superfície sólida: química e fisicamente (ATKINS, 1999).

Em razão das diferentes forças de interações envolvidas no fenômeno de adsorção, pode-se classificá-la em adsorção física (fisissorção) ou química (quimissorção). A adsorção física, ou adsorção de van der Waals, é um fenômeno reversível, que ocorre como resultado de forças intermoleculares de atração relativamente fracas entre as moléculas do sólido (adsorbato) e a substância adsorvida (adsorvente). Esta substância adsorvida não penetra dentro da estrutura do cristal do sólido e não se dissolve nele, mas permanece inteiramente sobre a superfície. As interações de Van der Waals são mais fracas e a energia liberada quando uma partícula é adsorvida fisicamente é baixa e próxima de 20 kJ mol^{-1} . Por outro lado, a adsorção química é o resultado da interação química entre o sólido e a substância adsorvida, sendo frequentemente irreversível. As moléculas unem-se à superfície do adsorvente por ligações químicas (geralmente covalentes) e tendem a se acomodar em sítios que propiciem o número de coordenação máximo com o substrato. Há, ainda, a formação de uma ligação química entre a molécula do adsorbato e a superfície do adsorvente, o que direciona o fenômeno na constituição de uma monocamada de moléculas adsorvidas. A energia liberada na adsorção química é muito maior do que na adsorção física, com valores perto de 200 kJ mol^{-1} (ATKINS, 1999; IMMICH, 2006).

A biossorção é uma propriedade de certos tipos de biomassa microbiana para ligar e concentrar metais pesados de soluções aquosas diluídas, sendo a abordagem mais promissora para remoção de metais por fungos. Compreende a ligação de metais (ou outros solutos, colóides ou suspensões) na biomassa por processos que não envolvem energia ou transporte metabólicos, embora esses processos possam ocorrer simultaneamente onde a biomassa viva for usada. A biomassa exibe esta propriedade, atuando justamente como uma substância química, como um trocador de íons de origem biológica. Diversos processos químicos podem estar envolvidos na biossorção, incluindo adsorção, troca iônica

e ligação covalente. Essa é uma propriedade da estrutura da parede celular de certas algas, fungos e bactérias. Pode, portanto, ocorrer em qualquer biomassa viva ou morta. Estudos na área de bioissorção sugeriram que esta é uma alternativa ideal para a descontaminação de efluentes contendo metais (VOLESKY, 1990), porque os microrganismos e os metais interagem de modo muito intenso por dois processos distintos: a bioacumulação e a bioissorção. A acumulação celular consiste na absorção metabólica e na translocação ativa para dentro da célula, resultando na bioacumulação, geralmente para garantir as funções biológicas, enquanto a sorção no envelope celular se dá por meio de processos não metabólicos, resultando na bioissorção (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As paredes celulares fúngicas possuem uma carga negativa em razão do arranjo dos grupos carboxila e fosfato. O ácido teicóico do grupo fosfato na parede celular do fungo é o responsável primário pela ligação do metal (SAY; DENIZLI; ARICA, 2001).

As paredes celulares da biomassa microbiana são compostas, principalmente, por polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Oferecem abundante sorção, troca iônica e sítios de ligações covalentes que incluem carboxila, hidroxila, sulfidril, grupos amino e fosfatos (REMACLE, 1990). Para explorar os mecanismos de bioissorção é necessário identificar os grupos funcionais envolvidos no processo de bioissorção (SAG; KUTSAL, 2001).

Segundo Pethkar, Kulkarni e Paknikar (2001), uma atribuição definitiva do emprego de cada grupo funcional na ligação de metal ainda não foi possível. O que pode ser decorrente dos diferentes mecanismos de bioissorção operando em conjunto, com um microrganismo em particular. Na maioria dos casos, diferentes metais são adsorvidos por microrganismos, o que torna difícil estabelecer o emprego dos grupos funcionais.

Say, Denizli e Arica (2001) constataram que o pH do meio afeta a solubilidade dos metais e a ionização dos grupos funcionais (grupos carboxila, fosfato e amino). Segundo esses autores, os grupos carboxila e fosfato carregam cargas negativas que permitem aos componentes da parede celular fúngica serem potentes catalizadores de cátions, com máxima adsorção dos metais cádmio (II), chumbo (II) e cobre (II) por biomassa fúngica de *Phanerochaete chrysosporium* com pH em torno de 6,0.

O sequestro de metais por biomassa fúngica pode ser atribuído, principalmente, à parede celular. A parede celular microbiana é rica em polissacarídeos e glicoproteínas como glucana, quitina, mananas e fosfo-mananas, sendo que estes polímeros formam abundantes fontes de ligação dos metais. A quitina e a quitosana estão presentes em toda estrutura da parede celular fúngica, sendo que a ligação de produtos tóxicos e íons de metais pesados por estes polissacarídeos é uma consequência direta da base energética do grupo amino (FRANCO et al., 2004). Em geral, a parede celular fúngica pode ser considerada como um sistema bifásico que consiste de uma estrutura de quitina embebida em uma matriz polissacarídica amorfa, onde mais de 90% da sua massa seca consiste de polissacarídeos (frequentemente complexos, com proteínas, lipídios e outras substâncias, como por exemplo pigmentos) (AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

Na parede da célula fúngica, vários tipos de sítios ionizáveis afetam a capacidade de adsorção do metal: grupos fosfatos, carboxílicos e proteínas e grupos ligantes, contendo nitrogênio em proteína, bem como na quitina ou quitosana (VOLESKY, 1990).

Franco et al. (2004) extraíram a massa micelial de quitina e quitosana do fungo *Cunninghamella elegans* e avaliaram a aplicação desses polissacarídeos na remoção dos metais cobre, chumbo e ferro preparados em solução aquosa e observaram que a produção de polissacarídeos foi de 23,8 e 7,8% para quitina e

quitosana, respectivamente. A quitosana mostrou maior índice de adsorção para o íon cobre e a quitina para o ferro.

O processo de biossorção envolve uma fase sólida (sorvente) e uma fase líquida (solvente, normalmente água) contendo produto dissolvido a ser sorvido (sorbato, por exemplo, íons metálicos). A afinidade do sorvente para o sorbato determina a sua distribuição entre as fases sólida e líquida. A qualidade do material sorvente é julgada pela forma como o sorbato pode atrair e reter uma forma imobilizada. Em razão da maior afinidade do sorvente para diferentes sorbatos, estes são atraídos para o sólido, sendo ligados por uma série de mecanismos. Esse processo continua até que o equilíbrio seja estabelecido entre o sorbato dissolvido e os sólidos vinculados (a uma concentração residual, final ou de equilíbrio) (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

Em razão da complexidade da estrutura dos microrganismos há muitas maneiras para que o metal seja capturado pela célula. De acordo com a dependência do metabolismo das células, os mecanismos de biossorção podem ser divididos em: (1) metabolismo dependente e (2) metabolismo não dependente (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). De acordo com o local onde o metal removido da solução é encontrado, a biossorção pode ser classificada como: (1) acumulação extracelular, (2) sorção na superfície da célula, (3) acumulação intracelular (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Na Figura 1, apresentam-se, esquematicamente, os vários mecanismos de biossorção.

No caso de interação físico-química entre o metal e os grupos funcionais da superfície da célula, baseado na adsorção física, troca iônica e complexação há uma sorção na superfície da célula, a qual não é dependente do metabolismo. Esse fenômeno físico-químico da biossorção de metal, metabolismo não dependente, é relativamente rápido e pode ser reversível. Na presença de cada um dos mecanismos, a biomassa tem todas as características químicas de uma

resina de troca iônica ou de um carvão ativado, o que implica muitas vantagens na aplicação industrial da bioissorção (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997).

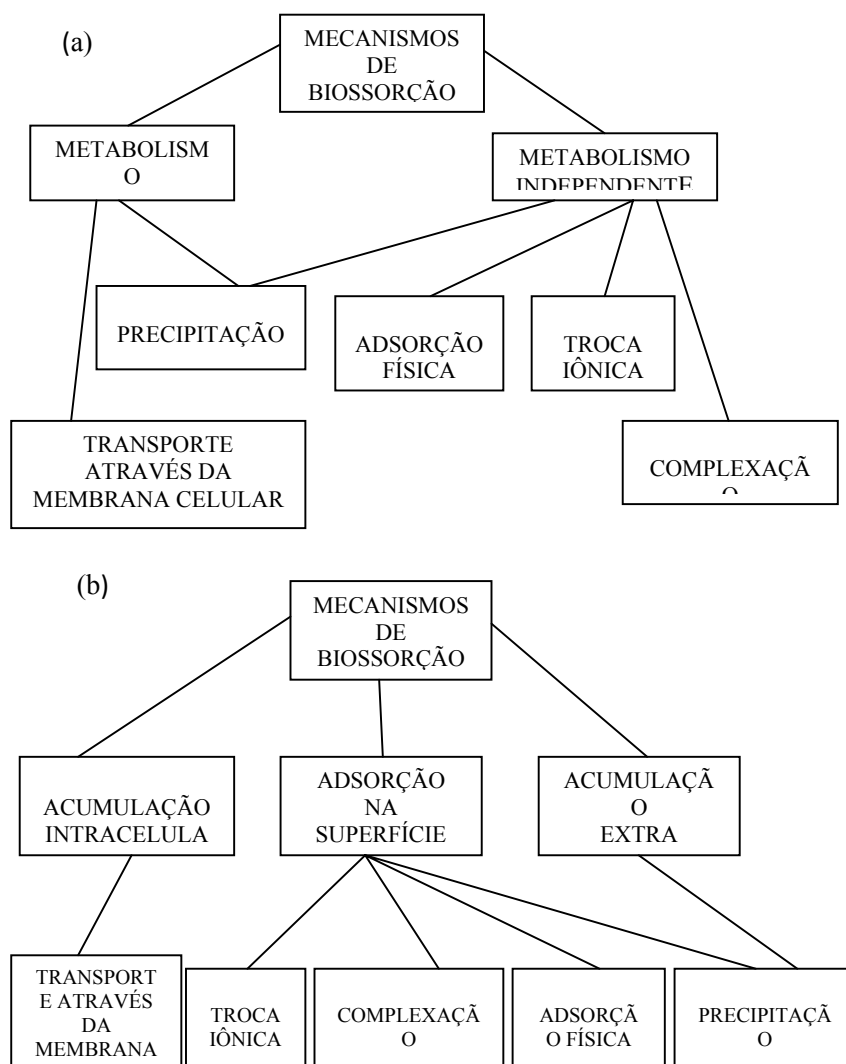


Figura 1 Mecanismos de bioissorção: (a) classificação de acordo com a dependência no metabolismo celular, (b) classificação de acordo com o local onde o metal removido é encontrado

Fonte Veglio; Beolchini (1997)

O transporte de metal por meio da membrana celular é dependente do metabolismo da célula, o que implica que este tipo de bioissorção ocorra apenas com células viáveis. No caso da precipitação, a classificação não é única, pelo fato de a precipitação do metal poder ocorrer na solução ou na superfície celular. No entanto, isto pode ser dependente do metabolismo celular se, na presença de metais tóxicos, o microrganismos produzir compostos que favoreçam o processo de precipitação. Do outro lado, a precipitação pode não ser dependente do metabolismo celular se ocorrer após uma interação química entre o metal e a superfície celular (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Tsezos e Volesky (1982) verificaram que a bioissorção de urânio pela biomassa fúngica de *Rhizopus arrhizus* foi baseado na adsorção física, associada com a presença de forças de van der Waals, na estrutura da quitina da parede celular.

De acordo com Volesky (1990), uma característica da bioissorção é a sua ocorrência mesmo quando a célula é metabolicamente inativa, ou seja, quando a mesma já está morta, podendo ser empregada como alternativa para as tecnologias existentes de remoção aplicadas em tratamento de águas residuárias, o que elimina o problema de toxicidade de íons metálicos para a célula.

A biomassa microbiana inativa pode servir como base para o desenvolvimento de materiais bioissorventes que podem ser usados para captura e recuperação de metais pesados, desde que esses novos bioissorventes possam ser regenerados, reutilizados, seletivos, eficientes, baratos e competitivos com produtos artificiais, e que também apresentem a aplicação potencial no controle ambiental dos metais e nas operações de recuperação metálica (VOLESKY, 1990).

Diferentes tipos de microrganismos têm sido usados como adsorventes de metais pesados, tais como fungos, bactérias e leveduras, os quais têm sido testados para bioissorção ou remoção de metais. Os processos de bioissorção são

aplicáveis a efluentes contendo baixas concentrações de metais pesados por um longo período (AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

Comparado com os métodos convencionais para a remoção de metais tóxicos de efluentes industriais, como a precipitação com cal, troca iônica e precipitação com biossulfato (H_2S produzido por bactérias redutoras de sulfato), o processo de bioissorção oferece as vantagens de baixo custo operacional, minimização do volume de químicos e/ou lodo biológico a serem eliminados, alta eficiência na desintoxicação de efluentes muito diluídos. Essas vantagens têm sido os principais incentivos para o desenvolvimento, em grande escala, de processo de bioissorção para reduzir a poluição por metais pesados (KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998).

Pethkar e Paknikar (1998) usaram o fungo *Cladosporium cladosporioides* para a bioissorção de ouro em solução e conseguiram uma adsorção de 100 mg de ouro por grama de solução. A máxima bioissorção de ouro (80%) ocorreu sob condições ácidas (pH 1-5). Os autores concluíram que este processo é um eficiente método para recuperação de ouro de soluções aquosas.

O fungo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium*, capaz de degradar xenobióticos, que são compostos químicos estranhos aos seu sistema biológico, foi utilizado por Say, Denizli e Arica (2001) para a remoção dos metais cádmio (II), chumbo (II) e cobre (II) de águas residuárias artificiais em reatores batelada. Os autores constataram que a capacidade de bioissorção da biomassa aumentou com o aumento da concentração inicial do metal até um valor de saturação, que foi de 300 mg L^{-1} para todos os metais, verificaram também uma forte ligação do metal à biomassa fúngica seca e, a ordem de afinidade baseada na acumulação pelo bioissorvente foi a seguinte: $\text{Cu (II)} > \text{Pb (II)} > \text{Cd (II)}$, sendo que a capacidade de adsorção da biomassa fúngica ficou

entre 20,33 e 69,77 mg g⁻¹. Seus resultados indicaram que existem possibilidades de limpar o meio ambiente com o uso de fontes naturais.

Mukhopadhyay, Noronha e Suraishhumar (2007) estudaram a biossorção de cobre por biomassa pré-tratada de *Aspergillus Níger* e observaram que a sorção foi influenciada pela quantidade de biomassa, pela concentração inicial do metal e pelo pH da solução, sendo que seus dados de adsorção indicaram a capacidade da superfície da biomassa em adsorver o cobre (II).

Corso e Jesus (2000) utilizaram *Aspergillus oryzae* para remover alguns tipos de corantes azóicos em solução aquosa. Os testes de biossorção em diferentes valores de pH (2,5; 4,5 e 6,5) com o corante Procion Violet H3R com concentração inicial de 62,50 µg mL⁻¹ e a forma paramorfológica de *Aspergillus oryzae* não autoclavada e autoclavada, indicaram que o pH mais ácido foi o que melhor conseguiu remover este corante de solução aquosa e que os pellets autoclavados foram melhores substratos do que a biomassa fúngica viva. Segundo os autores, do ponto de vista de biossorção, as biomassas de *Aspergillus oryzae* oferecem condições de serem utilizadas como substrato biossorvente, no tratamento de efluentes industriais que contenham este azo-composto.

2.4 *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

Cladosporium cladosporioides é um dos fungos mais comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo (PEREIRA et al., 2005). O gênero *Cladosporium* é classificado no filo Ascomycota (ascomiceto, da ordem Eurotides, endofítico, vive nos grãos). Os conídios dessa espécie são bem adaptados à dispersão aérea, pequenos, pigmentados e muito resistentes à luz solar. Em forma, os conídios se assemelham às células de leveduras, no entanto,

apresentam paredes espessas, de cor verde oliva e ásperas (PITT; HOCKING, 1999).

O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Figura 2) é encontrado em uma variedade de alimentos, incluindo trigo, arroz, sorgo e vegetais frescos. É capaz de crescer entre temperaturas de - 5 e 32 °C e atividade de água (a_w) de 0,86 a 25 °C, sendo resistente ao calor do microondas (PITT; HOCKING, 1999). Pode ser isolado, ainda, do ar, solo, frutas estocadas, grãos, gêneros alimentícios, entre outros. A temperatura ótima para seu crescimento varia de 18° a 28 °C (VIEIRA et al., 2006).

Além dos alimentos já citados, a incidência do fungo *Cladosporium cladosporioides* em culturas cafeeiras é bem conhecida, sendo facilmente isolado do solo, fruto, folhas e frutos do cafeeiro. O aumento gradual da incidência do fungo nos frutos do cafeeiro coincide com a conversão dos compostos fenólicos em açúcares facilitando a colonização interna do fruto. A presença deste fungo pode estar associada à bebida de boa qualidade (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

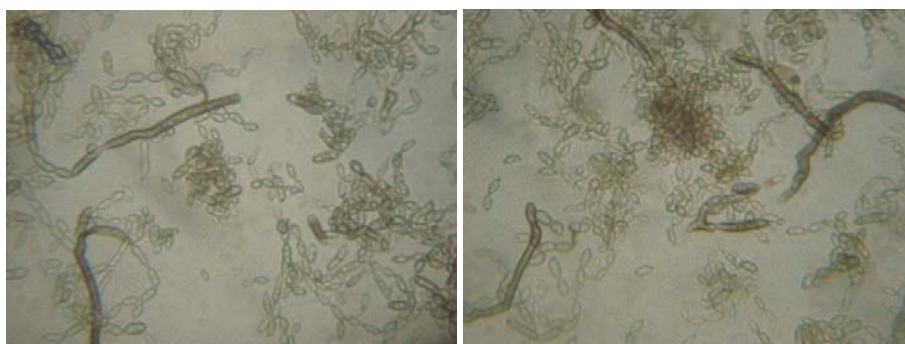


Figura 2 Eletromicrografia ótica do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Foto da autora).

As principais características distintivas encontradas por Pereira, Pfenning e Castro (2005), que permitiram a identificação da espécie *Cladosporium cladosporioides*, em frutos do cafeeiro, foram a cicatriz proeminente dos conídios, conidióforos sem nódulos, conídios sem septos ou apenas com um septo e formato do conídio elipsoidal ou limoniforme.

O fungo é encontrado como saprófita, ou seja, que se alimenta absorvendo substâncias orgânicas normalmente provenientes de matéria orgânica em decomposição; contaminante do ar e alimentos, endofítico, ou seja, vive no interior de uma planta; com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica sendo também forte competidor com outros microrganismos (PITT; HOCKING, 1999). As colônias em meio nutriente malte-ágar (MA) crescem radialmente com coloração verde-oliva até marrom-esverdeado, textura aveludada, reverso em meio MA preto. O tamanho das colônias após 10 dias a 25 °C em meio extrato de malte-ágar (MEA) nunca ultrapassa 30 mm (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

2.5 Biofiltros

O processo de biofiltração envolve muitos fenômenos físicos, químicos e microbiológicos. O leito do filtro consiste de substâncias relativamente inertes que possuem áreas de atração na superfície e adicional suprimento nutricional. Parâmetros críticos operacionais no desempenho do biofiltro incluem a inoculação microbiana, o pH do meio, a temperatura, a umidade e o conteúdo nutricional (CHERNICHARO, 2007).

A busca por novos métodos de tratamento tem levado ao desenvolvimento de metodologias que são baseadas na utilização de substratos orgânicos naturais na remoção dos metais pesados em um processo de sorção. Esses tratamentos são caracterizados pelo uso de sistemas de reatores com

pequenos volumes e altas concentrações de substratos orgânicos em seu interior, podendo ser constituído por bactérias e fungos (METCALF; EDDY, 1991).

Os microrganismos desenvolvem um biofilme na superfície do meio suporte ou são suspensos no líquido ao redor das partículas do meio e o ponto principal para o sucesso de operação do biofiltro é o controle e manutenção de uma biomassa altamente ativa na superfície do meio filtrante. A eficiência da remoção é controlada por alguns parâmetros como pH, temperatura, concentração de O₂, concentração inicial de poluentes tóxicos, etc (SRIVASTAVA; MAJUMDER, 2008).

Srivastava e Majumder (2008) fizeram uma revisão com o objetivo de analisar vários métodos físico-químicos e biológicos usados para o tratamento de águas residuárias industriais contendo metais pesados, e também para comparar a melhora na eficiência do processo de biofiltração por métodos emergentes, como a aplicação de engenharia genética para o tratamento de metais pesados. Os autores concluíram que há grandes possibilidades para a aplicação efetiva de biofiltros para a remoção de metais tóxicos de águas contaminadas, enfatizando que o sucesso da técnica microbiana pode aumentar a eficiência de remoção e reduzir os custos do tratamento, por ela ser capaz de remover metais pesados a níveis de partes por bilhão (ppb), podendo ser aplicada para o tratamento de águas residuárias de indústrias químicas, farmacêuticas, de fertilizantes, têxteis, papel, despolpamento, corantes e pigmentos, etc.

Para Srivastava e Majumder (2008), os biofiltros são os últimos e mais promissores desenvolvimentos de processos biológicos para o tratamento de efluentes contaminados com metais pesados.

2.6 Material suporte utilizado no biofiltro

No interior do reator, o material suporte (ou meio suporte) atua como dispositivo para separar os sólidos dos gases e ainda promover a retenção desses sólidos. O meio suporte facilita a uniformização do escoamento no reator e do grau de mistura, melhorando o contato entre os constituintes do afluente e os sólidos biológicos, evitando o aparecimento de zonas mortas e também permitindo o acúmulo de grande quantidade de biomassa, que se adere formando o biofilme, além de evitar a biomassa difusa que provoca entupimento nas mangueiras. Há, por conseguinte, um aumento do tempo de retenção celular e a formação de uma barreira física, o que evita que os sólidos sejam carreados para fora do sistema de tratamento, fenômeno conhecido como *wash out* (CHERNICHARO, 2007).

Diversos materiais podem ser utilizados como meio suporte em reatores biológicos, incluindo: quartzo, blocos cerâmicos, concha de ostras e de mexilhões, anéis plásticos, escória de alto-forno, cilindros vazados, granito, esferas de polietileno, bambu, etc. (CHERNICHARO, 2007).

Para Andrade Neto et al. (1999), é importante que o meio suporte tenha as seguintes características: a) estruturalmente resistente e eficientemente leve; b) biológica e quimicamente inerte; c) facilite a distribuição do fluxo e dificulte a obstrução e; d) preço baixo e de fácil aquisição.

Luiz (2007) cita que o meio suporte deve ter ainda: a) elevada porosidade, para garantir maior área disponível para o crescimento dos microrganismos; b) maior área superficial específica, para permitir maior aderência da biomassa e, c) não deve ter formato achatado ou que propicie encaixe ou superposição do material, para evitar a redução do espaço microporoso formado nos interstícios.

Os agregados artificiais, aqueles que sofrem um processo de industrialização após sua extração da natureza até atingir propriedade específica, podem ser citados como materiais com potencial para serem utilizados como meio suporte (CHERNICHARO, 2007).

Lourenço (2006) utilizou anéis plásticos corrugados provenientes de eletroduto como meio suporte. O autor fez o cálculo da área média dos anéis, da superfície específica e depois determinou as massas inicial e final do meio suporte para determinar a massa de biofilme, que foi de 10.493 mg que, relacionada à superfície específica do meio suporte, de 29.973,6 cm², resultou no valor aproximado de 0,35 mg cm⁻². O processo de adesão do lodo ao meio suporte foi dificultado pela textura bastante lisa dos anéis, apesar da superfície irregular e dos pequenos canais que facilitaram o acúmulo de lodo.

Luiz (2007) utilizou três reatores confeccionados em PVC, com altura de 1,5 m, preenchidos com meio suporte com 1,0 m de altura sobre o fundo falso. Os materiais suportes utilizados para imobilização dos sólidos biológicos foram escória de alto forno, espuma de poliuretano e brita de granito gnaisse N° 2, com porosidades de 53, 95 e 48%, respectivamente. A autora concluiu que, dentre os três meios suportes utilizados, a espuma de poliuretano foi a que promoveu melhor adesão de biomassa, com concentração média de sólidos voláteis totais (SVT) de 1.301 mg g⁻¹ de espuma.

A argila expandida é um agregado leve, de baixa densidade, obtido pela mistura da argila e de folhetos (rocha argilosa folheada) que se expandem sob temperatura elevada, de 1.100 °C, indicada para concretos refratários e como isolante térmico, até 800° C, formando grãos arredondados de tamanhos variados, que têm uma casca abrasiva e impermeável, que possibilita sua flutuação. Mecanicamente consistente, durável e quimicamente estável, a argila expandida – conhecida internacionalmente por "Haydite" é um material prático, que atende a três mercados distintos, com produtos específicos para a construção

civil (é livre de qualquer substância que possa ter efeito adverso no cimento ou nas ferragens do concreto), lavanderias industriais (na estonagem de jeans), e para jardinagem e paisagismo (CINASITA, 2010).

De acordo com Lapa et al. (2004), configurações contendo biomassa em suspensão, granulada (auto-imobilizada) ou immobilizada em suporte inerte, têm sido estudadas para tratamento de diversos tipos de águas residuárias, porque a imobilização da biomassa melhora a retenção de sólidos e elimina a etapa de sedimentação, permitindo, assim, a redução do tempo de operação de um reator anaeróbio operado em batelada sequencial, de leito fixo, em escala de bancada. Os autores fizeram uma pesquisa em que o leito suporte da biomassa foi formado por matrizes de pedra pome sintética, sendo que a utilização da pedra pome sintética como material suporte foi decorrente do fato de ser um material barato, de fácil obtenção e que, a princípio, apresentava características propícias à aderência de microrganismos. No decorrer dos estudos, descobriram que a pedra pome sintética possuía exatamente o mesmo sistema de produção que o concreto celular autoclavado. Verificaram que sua superfície é muito porosa e irregular e que os poros têm diversos tamanhos, formas e profundidades, em alguns pontos foi possível identificar-se cristais de cimento. Nos resultados obtidos, encontraram que a pedra pome sintética possui alta porosidade, aproximadamente 73 %, assim como alta área total de poros, aproximadamente, $56 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. A densidade real encontrada desse material foi de, aproximadamente, $2,64 \text{ g cm}^{-3}$. As fases cristalinas do material suporte, identificáveis via difração de raios-X, foram quartzo (SiO_2), tobermorita [$\text{Ca}_5\text{Si}_6(\text{O}, \text{OH}, \text{F})_{18}\text{-5H}_2\text{O}$] e calcita (CaCO_3).

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 2243-2257, 2007.
- ANDRADE NETO C. O. et al. Filtros anaeróbios. In: CAMPOS, J. R. (Coord.). **Tratamento de esgoto doméstico por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 139-154.
- ATKINS, P. **Físico-química**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. v. 3.
- BARROS, A. J. M. Thermogravimetric study of the sorption process of heavy metals in organic solid waste. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, apr./jun. 2006. Doi: 10.1590/S1413-41522006000200012.
- BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3. ed. São Paulo: CETESB; ASCETESB, 1986. 616 p.
- BREWER, G. J. Is heterozygosity for a Wilson's disease gene defect and important underlying of infantile an childhood Cooper toxicosis syndromes. **Jornal of Trace Elements in Experimental Medicine**, Hoboken, v. 13, p. 249-254, 2000.
- CAMARGO, A. O.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Reações e elementos tóxicos do solo na agricultura. In: EVARISTO, M. et al. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq; FAPESP; POTAFOS, 2001. p. 89-150.
- CHAO, P. Y.; ALLEN, K. G. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 12, n. 2, p. 145-150, 1992.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Polytécnica, 2007. v. 5, 379 p.
- CINASITA. **Fabricação e comércio de argila expandida**. Disponível em: <www.cinasita.com.br>. Acesso em: 2 jan. 2010.

CLARISSE, M. D.; AMORIM, M. C. V.; LUCAS, E. F. Despoluição ambiental: uso de polímeros na remoção de metais pesados. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v. 715, p. 16-24, 1999.

CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL. **Deliberação Normativa COPAM n.º 10**, de 17 de dezembro de 1986. Disponível em: <www.semad.gov.br>. Acesso em: 22 jan. 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 357, de 18 de março de 2005. **Resoluções**. Brasília, 2005.

CORSO, C. R.; JESUS, G. J. Interação biosortiva entre *Aspergillus oryzae* paramorfogênico e corante de efluente industrial. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABES, 2000.

EIFE, R. Chronic poisoning by copper in top water: In: Copper intoxication with predominantly gastrointestinal symptoms. *European Journal of Medical Research*, Cambridge/USA, v. 4, p. 219-223, 1999.

FARKAS, V. Biosynthesis of cell wall of fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 44, p. 117-141, 1980.

FRANCO, L. O. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 243-247, 2004.

GUINESE, L. S.; ESTEVES, A. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Adsorção de íONS cobre (II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 809-814, 2007.

HART, E. B. Copper is supplement to iron for hemoglobin building in rat. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 77, p. 797-812, 1928.

IMMICH, A. P. S. **Remoção de corantes de efluentes têxteis utilizando folhas de *Azadirachta indica* como adsorvente**. 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

JORDÃO, C. P.; PEREIRA, M. G.; PEREIRA, J. L. Metal contamination of river waters and sediments from effluents of kaolin processing in Brazil. **Water**,

Air and Soil Pollution: an international journal of environmental pollution, Dordrecht, v. 140, n. 1/4, p. 119-138, 2002.

KING, L. D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. (Ed.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil**. Viçosa, MG: SBCS, 1996. p. 823-836.

KLEVAY, L. M. Dietary copper and risk of coronary heart disease. **American Journal of Clinical and Nutrition**, New York, v. 71, n. 5, p. 1213-1213, 2000.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals: review. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 291-300, 1998.

LAPA, K. R. et al. **Avaliação de Desempenho do Reator Anaeróbio Operado em Batelada Seqüencial (ASBR), contendo biomassa imobilizada em pedra pome, no tratamento de esgoto sanitário**. 2004. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t319.doc>. Acesso em: 22 maio 2010.

LINDER, M. C. Copper biochemistry and molecular biology. **American Journal of Clinical and Nutrition**, New York, v. 63, p. 797-811, 1996.

LOURENÇO, A. M. P. **Desempenho de um sistema composto de reator UASB, filtro anaeróbio e lagoa aerada facultativa para o tratamento das águas residuárias da suinocultura**. 2006. 129 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

LUIZ, F. A. R. **Desempenho de reatores anaeróbios de leito fixo no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro**. 2007. 132 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MACÊDO, J. A. B. **Introdução à química ambiental**. 2. ed. Juiz de Fora: CRQ/MG, 2006. 1028 p.

METCALF; EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1991. 1334 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORO, A. M. et al. Quantificação laboratorial de cobre sérico por espectrometria Vis comparável à espectrometria de absorção atômica com chama. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 251-256, 2007.

MUKHOPADHYAY, M.; NORONHA, S. B.; SURAISSHUMAR, G. K. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus Niger* biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1781-1787, 2007.

NELSON, S. K. ; HUANG, C. J.; MATHIAS, M. M. Copper-marginal and copper deficient diets decrease aortic prostacyclin production and copper-dependent superoxide dismutase activity and increase aortic lipidic peroxidation in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, p. 2101-2108, 1992.

NOURBAKSH, M. et al. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium(VI) ions from industrial wastewater. **Process Biochemistry**, London, v. 29, p. 1-5, 1994.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. Characterization and dynamic of colonization of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in coffee fruits (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez. 2005.

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

PETHKAR, A. V.; PAKNIKAR, K. M. Recovery of gold from solutions using *Cladosporium cladosporioides* biomass beads. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 63, p. 121-136, 1998.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. 593 p.

REMACLE, J. The cell wall and metal binding. In: VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 83-92.

SAARI, J. T. Copper deficiency and cardiovascular disease: role of peroxidation, glycation and nitration. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 78, p. 848-855, 2000.

SAG, Y.; KUTSAL, T. Recent Trends in the biosorption of heavy metals: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Busan, v. 6, p. 376-385, 2001.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, p. 67-70, 2001.

SILVEIRA, M. L. A.; ALLEONI, L. R. F. Copper Adsorption in Tropical Oxisols. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 529-536, 2003.

SPERLING, M. von. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: UFMG, 2006. v. 3, 246 p.

SRIVASTAVA, N. K.; MAJUMDER, C. B. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. Review. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, p. 1-8, 2008.

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. Metal accumulation by fungi: applications in environmental. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 13, p. 126-130, 1994.

TSEZOS, M.; VOLESKY, B. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, p. 385-401, 1982.

URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 26, n. 4/5, p. 268-298, 2005.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 44, p. 301-316, 1997.

VIEIRA, D. G. et al. Crescimento *in vitro* de fungos (*colletotrichum gloeosporioides* e *cladosporium Cladosporioides*) isolados de frutos do mamoeiro, sob atmosfera controlada e refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 387-390, 2006.

VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC, 1990. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 26 nov. 2007.

CAPÍTULO 2

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E MICROANÁLISE DE RAIOS-X (EDS) COMO MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO DA BIORSORÇÃO DE COBRE POR *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.

RESUMO

Nesta pesquisa objetivou-se investigar a possível adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries e avaliar seu uso como biorremediador. Foram usados um microscópio eletrônico de varredura (MEV) conectado a um sistema de microanálise de raios-X com EDS (Energy Dispersive Spectroscopy), que utiliza a emissão de raios-X para quantificar os elementos encontrados nas amostras. O fungo foi imerso em solução de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações de 0, 10, 20 e 50 mg L^{-1} , depois foram preparados para observação em MEV. Alguns discos de micélio do fungo, tratados com solução de 20 mg L^{-1} , também foram transferidos para placas de Petri com meio solidificado BDA e depois incubados a 25 °C. A microanálise de raios-X mostrou que a substância adsorvida continha cobre e que a melhor adsorção ocorreu quando a concentração era de 20 mg L^{-1} . Para a concentração de 50 mg L^{-1} o fungo não conseguiu fazer a adsorção. Foi observado, também, que após imersão na solução, o desenvolvimento do fungo foi retardado, mas não inibido pelo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Verificou-se, portanto, que o fungo *C. cladosporioides* foi capaz de adsorver o elemento cobre e tem potencial para ser utilizado como biorremediador.

Palavras-chave: Biorremediação. Sorção. Metais pesados. Tratamento de efluentes. Espectroscopia de energia dispersiva.

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate the possible adsorption of copper by the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries and to evaluate its use as bioremediator. A scanning electron microscope (SEM) was used connected to an X-ray microanalysis system with EDS (Energy Dispersive Spectroscopy), using the X-ray emission to quantify the elements found in the samples. The fungus was immersed in copper sulfate solution ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at concentrations of 0, 10, 20 and 50 mg L^{-1} , later prepared for observation in SEM. Some of the fungus mycelium discs treated with solution of 20 mg L^{-1} were also transferred into Petri dishes with solidified PDA medium and later incubated at 25 °C. X-ray microanalysis showed that the substance adsorbed contained copper and that the best adsorption occurred at concentration of 20 mg L^{-1} . For concentration of 50 mg L^{-1} , the fungus was unable to perform the adsorption. It was also observed that, after immersion in the solution, the development of the fungus was delayed, but not inhibited by $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. It was, thus, verified that the fungus *C. cladosporioides* was capable of adsorbing the element copper and has the potential to be used as bioremediator.

Keywords: Bioremediation. Sorption. Heavy metals. Effluent treatment. Dispersive energy spectroscopy.

1 INTRODUÇÃO

A microanálise de raios-X ou espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (energy dispersive X-ray spectroscopy - EDS) é uma técnica que pode ser utilizada para identificação de elementos em microamostras, permitindo determinar a concentração de elementos em uma amostra utilizando as intensidades dos raios-X característicos emitidos. Os sistemas de EDS são montados em microscópios eletrônicos de varredura (MEV) e usam os elétrons primários do microscópio para gerar raios-X característicos. A composição da amostra é encontrada pela análise da energia desses raios-X. A resolução espacial do EDS depende do material amostrado e da energia dos elétrons primários do MEV (HOLLERITH et al., 2004). O detector de raios-X mede o número de raios-X emitidos versus sua energia. A energia dos raios-X é característica do elemento do qual os raios-X foram emitidos (OUNSI et al., 2008).

Souza et al. (2009) utilizaram as biomassas secas dos fungos zoospóricos *Saprolegnia subterranea* e *Pythium torulosum* para avaliar a bioissorção de cobre, manganês e cádmio de soluções aquosas por meio da determinação dos índices “q” (mg de metal adsorvido por g de biomassa) e “R%” (remoção percentual). Os mais elevados índices “q” foram obtidos quando as biomassas foram colocadas em contato com elevadas concentrações de metais, enquanto que os maiores índices “R%” foram obtidos em condições de baixas concentrações ($p < 0,05$). Comparativamente, a biomassa de *S. subterranea* SPC 1244 superou as demais quanto a bioissorção de cobre ($q = 7,48$ mg/g; $R\% = 49,03$), a biomassa de *P. torulosum* SPC 1425 foi a melhor em relação a bioissorção de manganês ($q = 4,13$ mg/g; $R\% = 26,71$), enquanto que a biomassa de *S. subterranea* SPC 1431 foi superior em relação à bioissorção de

cádmio ($q = 6,75 \text{ mg/g}$; $R\% = 42,26$). Isso indica que esses fungos têm a potencialidade de removerem íons de soluções diluídas.

Say, Denizli e Arica (2001) testaram concentrações de metais de 5 a 500 mg L^{-1} e perceberam, que a capacidade de bioissorção da biomassa aumenta com o aumento da concentração inicial do metal, sendo limitada ao valor de saturação; seus limites de concentração ficaram em torno de 300 mg L^{-1} .

Chalfoun et al. (2007) quando testaram a seletividade de alguns fungicidas utilizados no controle de doenças do cafeeiro sobre o fungo *C. cladosporioides* (Fres.) de Vries. verificaram que produtos a base de cobre não inibiram a incidência do fungo *C. cladosporioides*, mas inibiram outros microrganismos competidores, facilitando o estabelecimento deste fungo. Para os autores, cafeeiros pulverizados com fungicidas cúpricos apresentaram maior incidência de *C. cladosporioides* nos frutos, em relação aos que receberam outros fungicidas, confirmando a resistência do fungo ao elemento cobre na atmosfera.

Ounsi et al. (2008) utilizaram a microanálise de raios-X para análise elementar de instrumentos endodônticos feitos da liga níquel-titânio e os resultados apontaram que os instrumentos eram compostos por níquel (54,3%) e titânio (45,2%). Detectaram ainda, traços de alumínio e de silicone.

Pozza et al. (2004) avaliaram o efeito da aplicação de silício no controle da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*), causada por *Cercospora coffeicola* em três variedades de cafeeiro (catuaí, mundo novo e icatú) para determinar quais os possíveis fatores de resistência associados. Foram retiradas amostras das folhas para o estudo em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de raios-X. A microanálise de raios-X e o mapeamento para silício indicaram distribuição uniforme do elemento em toda a superfície abaxial das folhas de cafeeiro nas três variedades tratadas.

Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de investigar a capacidade de adsorção do elemento cobre, sob a forma de sulfato de cobre, pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*, para avaliar seu potencial como biorremediador, com o uso de microscópio eletrônico de varredura acoplado a um detector de energia dispersiva de raios- X (EDS).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries., isolado G088, pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, obtido de frutos do cafeeiro, cultivado em meio solidificado BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 25 °C por 10 dias.

2.2 Solução sintética

Seguindo a metodologia proposta pelo Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro da EPAMIG, foram preparadas quatro soluções sintéticas de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) com 100 mL de água destilada nas concentrações de 0, 10, 20 e 50 mg L⁻¹. A concentração de 20 mg L⁻¹ foi determinada com base no nível de metal detectado em locais contaminados e as outras concentrações serviram como comparação. Três discos do fungo repicado, com 6,0 mm de diâmetro foram colocados em um frasco Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionadas as soluções previamente preparadas. Os frascos foram levados para agitação a 120 rpm em agitador mecânico Marconi® e agitado por 21 horas, à temperatura ambiente (± 25 °C).

2.3 Preparo para microscopia eletrônica de varredura

Dos três discos de fungos colocados em cada frasco Erlenmeyer, um disco (amostra) foi retirado da solução e levado para preparação no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA. Seguindo o Protocolo do laboratório, as amostras foram colocadas para fixação em microtubos de 2,0 mL com solução fixativa de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M com pH de 7,2). As amostras permaneceram no fixador por oito dias e, posteriormente, foram retiradas e lavadas (três lavagens de 10 minutos) em tampão cacodilato, depois foram pós-fixadas (fixação secundária) em solução aquosa de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, durante três horas, à temperatura ambiente.

Depois da pós-fixação as amostras foram lavadas três vezes em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradiente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%), por 10 minutos. Para a concentração de 100%, a operação foi repetida três vezes.

Após a desidratação, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico marca BAL-TEC, modelo CPD 030 para completar a secagem. Depois, foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*) e, para aumentar a condutividade da amostra, foram preparadas com uma cobertura de ouro em equipamento *sputtering* marca BAL-TEC, modelo SCD 050. Completado o preparo, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo LEO EVO 40.

Outro disco de fungo (amostra) foi retirado de cada solução, colocados em suportes de alumínio (*stubs*) e desidratados em dessecador com sílica e, posteriormente, receberam cobertura de carbono em equipamento *de Sputtering* marca Balzers Union, modelo MED 010 e foi observada em microscópio

eletrônico de varredura, marca ZEISS, modelo DSM 940A acoplado a um sistema de microanálise de raios-X (EDS) que utiliza a emissão de raios-X para quantificar os elementos encontrados nas amostras. Essa análise foi realizada no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo - ESALQ/USP-Piracicaba/SP. Para a confecção dos gráficos do espectro da microanálise de raios-X foi feita uma determinação da composição das amostras por área da amostra nas condições: distância de trabalho (WD) de 24 mm, aumento de 500 X e voltagem de 20kv.

Uma gota da solução de sulfato de cobre na concentração de 20 mg L⁻¹ foi colocada em algumas lamínulas montadas em *stubs* e desidratadas por 24 horas em dessecador com sílica. Uma parte das lamínulas foi levada para banho de carbono e posterior visualização em MEV acoplado ao raio-X e outra parte foi levada para banho de ouro e posterior visualização em MEV.

2.4 Desenvolvimento do microrganismo

Os discos de fungos remanescentes nas soluções, em diferentes concentrações de sulfato de cobre, foram transferidos para placas de Petri em meio solidificado BDA e incubados a 25 °C para verificar se ainda poderiam se desenvolver, ou seja, se ainda continuavam viáveis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se comparou o comportamento do micélio para as diferentes concentrações de sulfato de cobre utilizadas, foi possível observar que o uso da microanálise de raios-X mostrou diferenças nas bioissorções para as

concentrações utilizadas. Quantitativamente, para as concentrações de 0, 10, 20 e 50 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, as porcentagens do elemento cobre encontradas nas amostras, pela microanálise de raios-X foram de 0,29; 2,55; 3,99 e 0,97%, respectivamente. Pela Figura 1, pode-se observar que nas amostras mostradas em B e em C, cujas concentrações de sulfato de cobre foram de 10 e 20 mg L⁻¹, respectivamente, apareceram picos elevados de energia do elemento cobre, esses picos representam a quantidade de cobre encontrada na hifa, ou seja, a bioadsorção de cobre por *C. cladosporioides* ocorreu nessas concentrações. Verificou-se que, ao aumentar a concentração de 0 para 10 e de 10 para 20 mg L⁻¹, houve aumento da quantidade de cobre adsorvida pelo fungo, porém a diferença entre as concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹ foi pequena, mas, quando a concentração foi elevada de 20 para 50 mg L⁻¹, observa-se que não houve pico de energia, isso mostra que a quantidade de metal encontrada na hifa foi muito baixa.

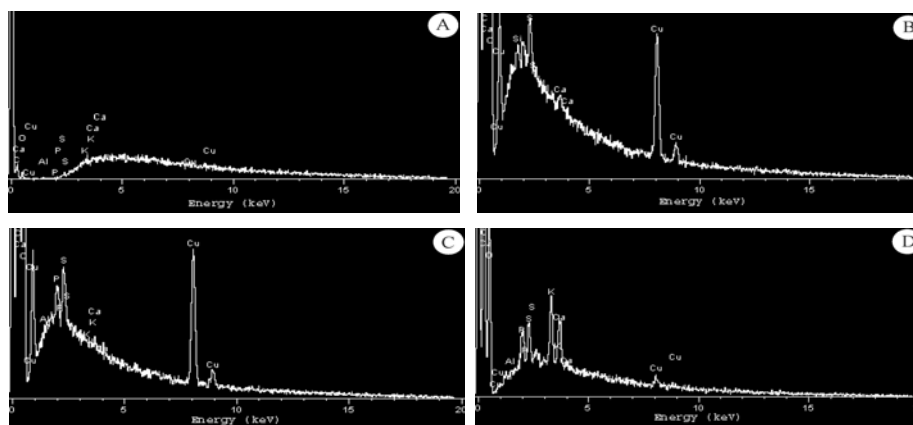


Figura 1 Espectro da microanálise de raios-X da composição das amostras de *Cladosporium cladosporioides* em diferentes concentrações de sulfato de cobre. A) 0 mg L⁻¹; b) 10 mg L⁻¹; C) 20 mg L⁻¹ e D) 50 mg L⁻¹

Pethkar, Kulkarni e Paknikar (2001), estudaram a bioadsorção de metais por duas linhagens do fungo *Cladosporium cladosporioides*, utilizando biomassa ativa e inativa, com tempo de contato de 30 minutos em uma incubadora a 120 rpm. Seus estudos mostraram que as duas linhagens possuíam propriedades diferentes. Enquanto a Linhagem 1 mostrou sorção preferencial por ouro e prata, a Linhagem 2 pôde adsorver, além do ouro e da prata, metais como cobre e cádmio. Os autores observaram que o conteúdo de hexosamina da parede celular da Linhagem 1 era de 0,1%, enquanto para a Linhagem 2 o conteúdo era 150 vezes maior (15%). Seus resultados indicaram que a hexosamina foi a responsável pela sorção dos metais não específicos (cobre e cádmio), enquanto os outros polímeros presentes, podem ter conferido seletividade aos metais preciosos. Os autores observaram, ainda, que os valores alcançados para a adsorção de ouro foi de 96,6 mg g⁻¹ para o micélio vivo e 94,2 mg g⁻¹ para a parede celular preparada. Para a prata, os valores foram de 44,5 e 42,8 mg g⁻¹, respectivamente. Os resultados indicaram que há possibilidades em selecionar culturas fúngicas com base na composição de sua parede celular para aplicações específicas de remoção de metais.

Pode-se dizer que quando o fungo foi submetido à concentração de 50 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, sua capacidade de adsorção foi baixa, sendo esta concentração superior à sua capacidade de adsorção.

Após ser imerso, por 21 horas, na solução de sulfato de cobre e cultivado em meio solidificado BDA, foi verificado um retardamento no desenvolvimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*, sendo seu crescimento iniciado apenas no décimo dia após a incubação a 25 °C. No 14º dia de incubação percebeu-se que o fungo ainda se desenvolvia, ou seja, mesmo após o contato prolongado com o cobre, o fungo ainda se mostrou viável, como pode ser observado na Figura 2.

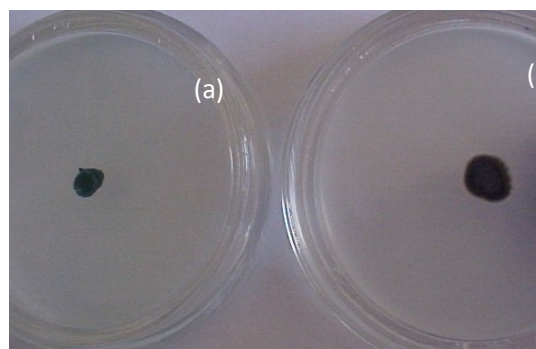


Figura 2 Crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*, após imersão na solução de sulfato de cobre, cultivado em meio solidificado BDA e incubado a 25 °C. (a) aos 10 dias; (b) aos 14 dias

As micrografias obtidas no microscópio eletrônico de varredura, para a concentração de 20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre (Figura 3), mostraram que as hifas e os esporos, após 21 horas de contato com o cobre, não apresentavam deformações.

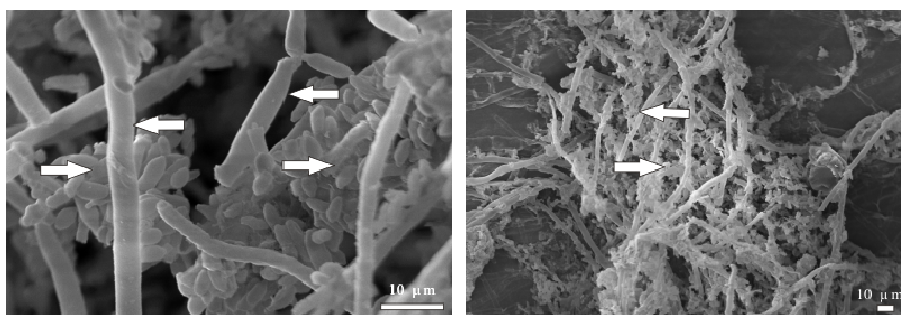


Figura 3 Eletromicrografia de varredura das amostras de *Cladosporium cladosporioides* para concentração de 20 mg L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O. Setas para direita indicam esporos, setas para esquerda indicam hifas

Os resultados obtidos mostram, portanto, que o fungo *C. cladosporioides*, foi capaz de adsorver cobre e ainda se desenvolver após ser

submetido à concentração de 20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, o que o torna um microrganismo com potencial para ser utilizado como biorremediador.

4 CONCLUSÕES

O fungo *Cladosporium cladosporioides* foi capaz de adsorver o metal cobre na forma de sulfato de cobre, sendo, portanto, um microrganismo com potencial para ser utilizado como biorremediador.

A melhor adsorção do metal ocorreu quando o fungo foi imerso na solução com concentração de 20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre.

A imersão do fungo na solução de sulfato de cobre a 20 mg L⁻¹ não impediu a sua viabilidade, seu efeito foi somente fungistático, ou seja, a solução não destruiu o fungo, apenas retardou o início do seu desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

CHALFOUN, S. M. et al. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 1, p. 93-95, 2007.

HOLLERITH, C. et al. Energy dispersive X-ray spectroscopy with microcalorimeters. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v. 520, p. 606-609, 2004.

OUNSI, H. F. et al. Quantitative and qualitative elemental analysis of different nickel-titanium rotary instruments by using scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 53-55, 2008.

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

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 185-188, 2004.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, p. 67-70, 2001.

SOUZA, R. S. et al. Adsorção de cromo (VI) por carvão ativado granular de soluções diluídas utilizando um sistema batelada sob pH controlado. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 3, p. 661-668, 2009.

CAPÍTULO 3

MODELAGEM DA CINÉTICA DE BIOSSORÇÃO DE COBRE POR *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries DESENVOLVIDO EM DIFERENTES MEIOS SUPORTES

RESUMO

Nesta pesquisa, objetivou-se o estudo da biossorção do íon cobre utilizando como adsorvente o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, cultivado nos meios suportes argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado amarelo 5/8". Em frascos Erlenmeyer, foram colocados 10g do adsorvente constituído pelo meio suporte revestido pelo meio nutriente e pelo inóculo do fungo na concentração de 10^7 esporos mL^{-1} e 150 mL de solução sintética de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), nas concentrações de 0, 10, 20 e 50 mg L^{-1} , em triplicata, que depois foram misturados formando uma amostra composta. Os frascos Erlenmeyer foram levados para uma incubadora, com temperatura constante de 25 °C e rotação de 80 rpm. Foram coletadas 13 amostras de cada concentração em diferentes tempos de contato. O modelo de Freundlich foi usado para ajuste dos dados obtidos, e o desempenho máximo do fungo *C. Cladosporioides* utilizado como adsorvente do metal foi observado para a concentração de 20 mg L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6,27 g cm^{-3} de cobre) que apresentou maior valor de coeficiente de reação k.

Palavras-chave: Isoterma de Freundlich. Biofilme. Adsorção. Metal pesado.

ABSTRACT

This work aimed to study copper biosorption, using the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries as adsorbent, cultivated in the support media expanded clay, alkali-cultivated slag and 5/8" yellow corrugated pipe. A total of 10g of the adsorbent was placed inside Erlenmeyer flasks, constituted by the support medium coated by the nutrient medium and by the fungus inoculum at a concentration of 10^7 spores mL^{-1} and 150 mL of copper sulfate synthetic solution ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), at concentrations of 0, 10, 20 and 50 mg L^{-1} , in triplicate, which were later mixed into a compound sample. The Erlenmeyer flasks were transferred to an incubator with constant temperature of 25 °C and rotation of 80 rpm. Thirteen samples of each concentration were collected at different contact times. The Freundlich model was used to fit the data obtained, and the maximum performance of the fungus *C. Cladosporioides* used as metal adsorbent was observed for the concentration of 20 mg L^{-1} of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6.27 g cm^{-3} of copper), which presented greater reaction k coefficient value.

Keywords: Freundlich isotherm. Biofilm. Heavy metal. Adsorption.

1 INTRODUÇÃO

O processo de biossorção, que se destaca em virtude de empregar materiais de origem biológica como adsorventes (bactérias, fungos e algas) na remoção de diversos íons metálicos (VEIT et al., 2009), tem-se mostrado eficiente na remoção de metais pesados dissolvidos em efluentes líquidos industriais, agrícolas e agroindustriais. Os fungos, principalmente, possuem uma capacidade de adsorção de metais e podem ser utilizados na extração de metais como cobre, zinco, ferro, níquel, manganês, ouro, prata e cromo, quando em meio aquoso (DENG; TING, 2005).

O modelo de Freundlich, representado pela Equação 1, não prevê a saturação do adsorvente, permite a existência de uma cobertura superficial infinita, ou seja, considera a existência de uma estrutura em multicamadas (REED; MATSUMOTO, 1993). Esse modelo corresponde a uma distribuição potencial de vários sítios de adsorção com energias diferentes, não se tornando linear em baixas concentrações (KLEINUBING, 2006).

Pozza et al. (2009) sustentam que, equações de isotermas de adsorção não podem ser interpretadas para indicar qualquer mecanismo particular de adsorção, ou mesmo se a adsorção, opostamente à precipitação, tem realmente ocorrido; assim, consideram que as equações deveriam ser consideradas como modelos de ajustes de curvas com capacidade preditiva sob condições limitadas.

A isoterma de Freundlich, representada pela Equação 1, foi utilizada como modelo matemático para correlacionar a quantidade de íons metálicos adsorvida na fase sólida e a concentração na fase líquida, ambas no equilíbrio.

$$S = K_d \cdot C^{1/n} \quad (1)$$

Em que:

S = quantidade de íons metálicos adsorvida na fase sólida, no equilíbrio (mg mg⁻¹);

C = concentração na fase líquida no equilíbrio (mg L⁻¹);

Kd = constante de equilíbrio de adsorção da isoterma de Freundlich (L mg⁻¹);

n = constante relacionada à intensidade de adsorção (adimensional).

Para a determinação da quantidade de íons metálicos adsorvidos pelo biofilme (S), foi utilizado o balanço de massa, (Equação 2):

$$S = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (2)$$

Em que:

C₀ = concentração inicial na fase líquida (mg L⁻¹);

C_e = concentração ao final do tempo de contato pré estabelecido (mg L⁻¹);

V = volume da solução em cada frasco (mL);

M = massa de adsorvente em cada frasco (mg).

A cinética de reação do cobre remanescente com o *Cladosporium cladosporioides* foi analisada utilizando modelos comuns de decaimento (Equações 3 e 4), segundo uma reação de primeira ordem, nestas equações a taxa de adsorção do cobre é proporcional à concentração ainda remanescente na solução (C), em um tempo de contato (Tc) qualquer.

$$\frac{dC}{dT_c} = -k \cdot C \quad (3)$$

$$C = C_0 e^{-kT_c} \quad (4)$$

Em que:

$\frac{dC}{dT_c}$ = taxa de adsorção do elemento cobre ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)

C = concentração de cobre remanescente (mg L^{-1});

C_0 = concentração inicial (mg L^{-1});

T_c = tempo de contato (d);

k = coeficiente de reação (d^{-1}).

Mukhopadhyay, Noronha e Suraiskumar (2007), investigaram o efeito do tempo de exposição da biomassa de *Aspergillus niger* ao metal cobre na caracterização da bioadsorção por meio do estudo da cinética, seus estudos mostraram que a bioadsorção foi rápida durante os primeiros 30 minutos, ocorrendo cerca de 70%, e continuou em uma velocidade mais lenta nas horas seguintes. Para as isotermas de adsorção, os autores utilizaram os modelos de Langmuir e Freundlich para os dados experimentais e a magnitude dos valores das constantes K e n mostraram a adsorção de cobre (II) do meio aquoso com alta capacidade de adsorção da biomassa.

Say, Denizli e Arica (2001) utilizaram o modelo de Langmuir para descrever os dados experimentais de bioadsorção de cádmio, chumbo e cobre pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. No pH ótimo, a máxima capacidade de bioadsorção foi estimada e verificaram que o pequeno valor da constante K_d implicou numa forte ligação dos íons dos metais à biomassa fúngica seca, sendo que a ordem da afinidade baseada na acumulação pelo bioadsorvente foi $\text{Cu (II)} > \text{Pb (II)} > \text{Cd (II)}$.

Pethkar e Paknikar (1998) verificaram que a bioadsorção de ouro pela biomassa de *Cladosporium cladosporioides* foi diretamente proporcional à concentração do metal na solução, no equilíbrio, sendo que os valores da bioadsorção de cobre foram muito bem descritos pelo modelo da isoterma de Freundlich.

Conduziu-se esta pesquisa, com o objetivo de avaliar o processo de bioadsorção do elemento cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. nos meios suportes escória de alto forno, argila expandida e tubo corrugado amarelo 5/8". Foram estudadas as isothermas e a cinética de adsorção, sendo que o efeito do pH, o equilíbrio e a cinética de adsorção foram estudados nas condições experimentais (pH = 4, massa = 10 g, volume = 150 mL, tempo de adsorção = 24 h).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Inóculo

O inóculo utilizado foi o micélio do fungo *Cladosporium cladosporioides*, isolado G088, pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pré-cultivado em meio solidificado BDA (Batata-Dextrose-Ágar), cultivado em placas de Petri de 150 mm no meio BDA, com temperatura de 25 °C por 10 dias.

2.2 Meio suporte

Foram utilizados como meios suportes (MS) a escória de alto forno, adquirida na siderúrgica Divigusa Indústria e Comércio Ltda, de Divinópolis/MG, a argila expandida adquirida da Cinasita S.A. e o tubo corrugado amarelo 5/8" adquirido no comércio de materiais elétricos local, sendo este cortado em tiras de 20 mm.

Os meios suportes foram lavados, secados à temperatura ambiente e autoclavados a 121 °C por 20 minutos em sacos de polietileno. Depois, em ambiente protegido, foram pesados em balança analítica Bel Engineering.

Em placas de Petri de 150 mm, contendo o fungo já desenvolvido, foram adicionados 20 mL de água destilada autoclavada, sendo os esporos raspados com bastão de vidro formando uma suspensão. Uma alíquota de 20 mL dessa suspensão, com concentração de 10^7 esporos mL^{-1} , foi colocada em 250 mL de meio BDA morno, formando uma mistura. Em uma bandeja inox esta mistura foi derramada aos poucos sobre os MS, até o meio nutriente tornar-se mais polimerizado e aderido aos MS.

Os MS inoculados foram colocados em bandejas de plástico esterilizadas com álcool e em luz UV, cobertas com filme plástico e levadas para incubação a 25° C por 10 dias. Após o desenvolvimento do fungo, foram pesados 10 g do MS inoculado e depois colocados em frascos Erlenmeyers de 250 mL.

2.3 Solução de sulfato de cobre

As soluções sintéticas de sulfato de cobre foram preparadas com água de torneira e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 0, 10, 20 e 50 mg L^{-1} . Para cada concentração foi utilizado um frasco Erlenmeyer, contendo 150 mL da solução e o material suporte previamente inoculado.

2.4 Isoterma de adsorção

Os frascos Erlenmeyers foram levados para agitação em Incubadora 430, Nova Ética[®], com temperatura e rotação constantes de 25 °C e 80 rpm, respectivamente. O conjunto, em triplicata, permaneceu sob agitação por 24

horas e, durante esse período, foram coletadas 13 amostras de cada concentração nos seguintes tempos de contato: 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 12,0 e 24,0 h. De cada repetição, foram retirados 10 mL da solução de cada repetição, que depois foram misturados, formando uma amostra composta.

As concentrações de cobre foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 1998) empregando o espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer® modelo Analyst 40, do Laboratório de Fertilidade do Solo, no Departamento de Ciência dos Solos.

A isoterma de Freundlich, representada pela Equação 1, foi utilizada como modelo matemático para correlacionar a quantidade de íons metálicos adsorvida na fase sólida e a concentração na fase líquida, ambas no equilíbrio.

Para a determinação da quantidade de íons metálicos adsorvidos pelo biofilme (S), foi utilizado o balanço de massa da Equação 2.

2.5 Cinética de adsorção

A quantidade do elemento cobre adsorvida foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e as obtidas nos diferentes tempos de contato estudados, em percentagem das concentrações adsorvidas e remanescentes na solução, havendo variações nos modelos, decorrentes das diferentes concentrações a que o biofilme foi submetido. A mudança na quantidade de soluto adsorvido por unidade de peso do adsorvente foi encontrada como sendo uma equação cinética de primeira ordem para todos os meios suportes utilizados.

A cinética de reação do cobre remanescente com o *Cladosporium cladosporioides* foi analisada, utilizando modelos comuns de decaimento (Equações 3 e 4).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de cobre verificadas nas amostras, no tempo de contato (T_c) zero e o pH inicial das soluções sintéticas, estão apresentadas na Tabela 1. O pH foi corrigido para próximo de 4,0 antes do líquido entrar em contato com o MS inoculado para garantir um meio ideal para o fungo e inibir o crescimento de bactérias. A concentração de cobre, medida por espectrometria de absorção atômica, representa a concentração real do elemento cobre na solução de sulfato de cobre. A concentração de 20 mg L^{-1} determinada com base no nível de metal detectado em locais contaminados, sendo as demais concentrações empregadas como comparação.

Tabela 1 Concentração de cobre das soluções sintéticas de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), no tempo zero

Concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mg L^{-1})	Concentração de Cobre (mg L^{-1})	pH
0	0,041	3,96
10	3,532	3,96
20	6,270	4,08
50	13,062	4,33

3.1 Meio suporte escória de alto forno

Para o meio suporte escória de alto forno, percebe-se pelas isotermas de adsorção que, com o aumento do tempo de contato (T_c) aumentaram-se as quantidades adsorvidas na fase sólida. Para os T_c de 0,25; 0,5 e 0,75 h (Figura 1) o aumento foi mais acentuado para a concentração de cobre de $13,06 \text{ mg L}^{-1}$, nos T_c seguintes: 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 h (Figura 2); 3,0; 4,0 e 5,0 h (Figura 3) e 6,0; 12,0 e 24,0 h (Figura 4) a concentração de cobre de $3,53 \text{ mg L}^{-1}$ apresentou valores próximos de adsorção e não houve um aumento acentuado para a

concentração de $13,06 \text{ mg L}^{-1}$. No total, a quantidade adsorvida na fase sólida foi de 79,79; 82,13 e 75,91% para as concentrações de cobre de 3,53, 6,27 e $13,06 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

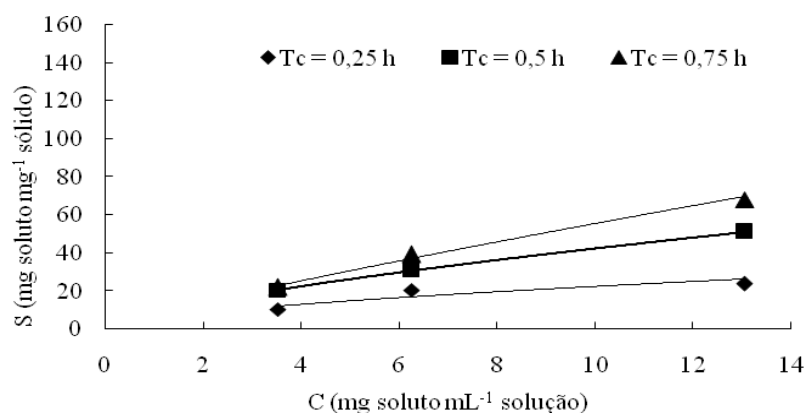


Figura 1 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (T_c) de 0,25; 0,50 e 0,75 h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno

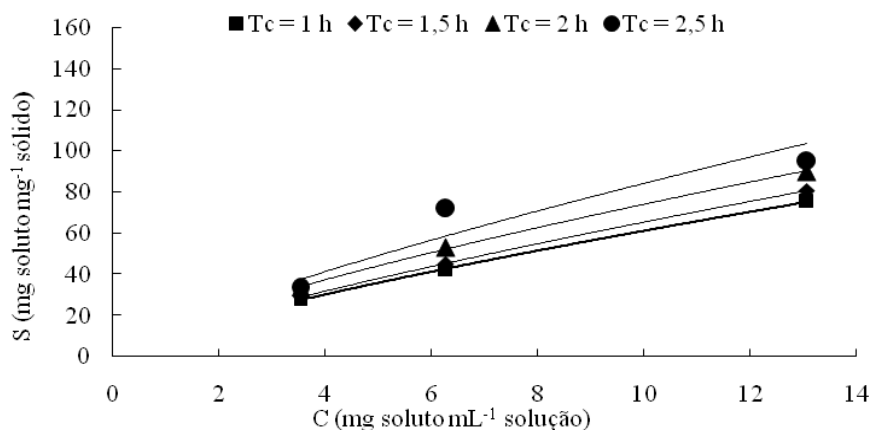


Figura 2 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (T_c) de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno

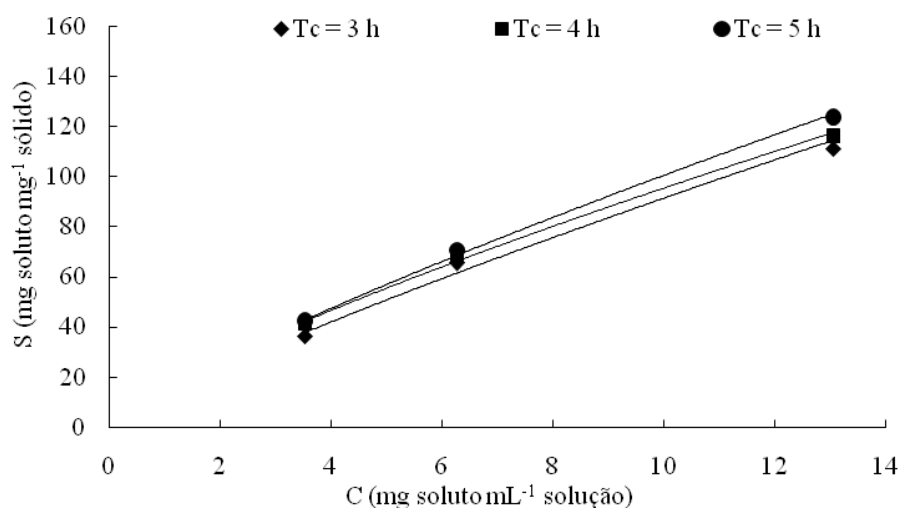


Figura 3 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 3,0; 4,0 e 5,0h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno

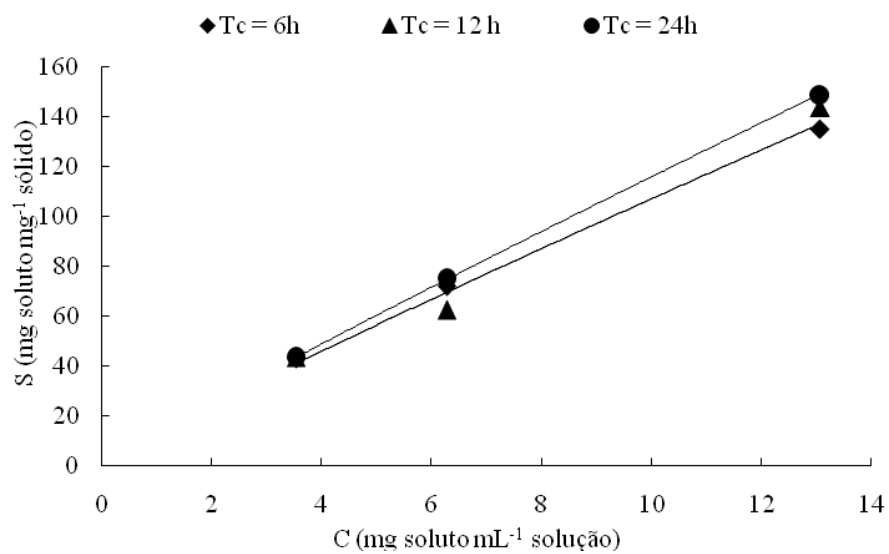


Figura 4 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 6,0 12,0 e 24h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno

As equações de regressão e os coeficientes de regressão (R^2) para o meio suporte escória de alto forno estão apresentados na Tabela 2. O coeficiente de regressão (R^2) variou de 0,824 a 0,999. O equilíbrio de adsorção foi satisfatoriamente descrito pelo modelo de Freundlich para todos os tempos de contato avaliados, com significativos valores de interação (R^2).

Tabela 2 Equações de regressão e comparação dos coeficientes de regressão (R^2) para os diferentes tempos de contato estudados

Tc (hora)	Equação de Regressão	R^2
0,25	$3,812C^{0,492}$	0,824
0,50	$5,596C^{0,566}$	0,999
0,75	$7,608C^{0,862}$	0,993
1,00	$10,350C^{0,770}$	0,999
1,50	$10,650C^{0,787}$	0,999
2,00	$13,170C^{0,748}$	0,999
2,50	$14,070C^{0,776}$	0,892
3,00	$12,990C^{0,846}$	0,990
4,00	$15,660C^{0,783}$	0,997
5,00	$15,310C^{0,817}$	0,997
6,00	$14,322C^{0,875}$	0,999
12,00	$7,233C^{0,753}$	0,980
24,00	$7,558C^{0,763}$	0,999

Pelo estudo dos modelos apresentados nas isotermas de adsorção, foram obtidas as constantes Kd e n que interpretam a capacidade de sorção em relação ao tempo de contato ao qual o biofilme foi submetido (Tabela 3). De acordo com o modelo de Freundlich, a constante de equilíbrio Kd é uma indicação da capacidade de adsorção do soluto, sendo que valores maiores representam maior afinidade do metal com o biofilme, ou seja, quanto maior o valor de Kd melhor o funcionamento do meio para adsorver o elemento estudado (SAG; KUTSAL, 2001). Essa constante de equilíbrio, também denominada coeficiente de partição, permite identificar a capacidade de um meio em reter denominado soluto, possibilitando a estimativa da extensão do seu movimento na fase líquida.

O tempo de contato de 15 minutos (0,25 h) apresentou o menor valor de K_d , ou seja, a afinidade do adsorvente com o metal em apenas 15 minutos foi muito baixa, decorrente do tempo de contato insuficiente para se obter o equilíbrio de adsorção. O maior valor de K_d foi com o tempo de contato de 4 horas, mostrando que esse foi o melhor tempo para demonstrar a afinidade do adsorvente com o metal, visto que para os Tc seguintes os valores de K_d decresceram, ou seja, para a avaliação da capacidade do fungo em adsorver metal, são necessários apenas 4 horas de contato para que o *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno, adsorva o elemento cobre. Porém, após esse período, o processo de adsorção ainda continua, sinalizando equilíbrio entre o biofilme e a solução. Pela constante n , a maior intensidade de adsorção ocorreu nos primeiros 15 minutos, o que já era esperado, visto que os sítios de contato estavam totalmente livres para a adsorção do cobre pelo microrganismo. Com o aumento da concentração do metal, verifica-se que mais sítios são preenchidos e a retenção de cobre torna-se mais difícil (PETRUZZELLI; GUIDI; LUBRANO, 1985; SILVEIRA; ALLEONI, 2003).

A diferença entre a concentração de cobre mínima e a máxima utilizadas foi de $10 \text{ mgCu}^{2+} \text{ L}^{-1}$. As variações observadas nos valores de n indicam que a adsorção de Cu^{2+} pelo *Cladosporium cladosporioides* depende da concentração, indicando que em menores concentrações de cobre ($3,53$ e $6,27 \text{ mg L}^{-1}$) a intensidade de adsorção foi maior, enquanto que para $13,06 \text{ mg L}^{-1}$, a diferença de adsorção nos diferentes Tc foram maiores. Jorge et al. (2001) relatam que ao aumentar consideravelmente a diferença entre as concentrações mínima e máxima adotadas, os valores de n das isotermas diferem de 1 (isoterma linear), caracterizando um comportamento diferente, como observado neste experimento, cujo comportamento foi potencial.

Tabela 3 Efeito do tempo de contato (Tc) nas constantes de Freundlich Kd (constante de equilíbrio de adsorção) e n (constante relacionada à intensidade de adsorção)

Tc (hora)	Kd (mL mg ⁻¹)	1/n	n
0,25	3,812	0,492	2,0313
0,50	5,596	0,566	1,7655
0,75	7,608	0,862	1,1601
1,00	10,350	0,770	1,2987
1,50	10,650	0,787	1,2706
2,00	13,170	0,748	1,3369
2,50	14,070	0,776	1,2887
3,00	12,990	0,846	1,1820
4,00	15,660	0,783	1,2771
5,00	15,310	0,817	1,2240
6,00	14,322	0,875	1,1432
12,00	7,233	0,753	1,3277
24,00	7,558	0,763	1,3110

3.1.1 Cinética de adsorção de cobre por *Cladosporium cladosporioides* no meio suporte escória de alto forno

Para a escória de alto forno, os resultados do estudo da cinética de adsorção mostraram que, a porcentagem de cobre adsorvido aumenta com o tempo de contato até se chegar ao equilíbrio, quando a concentração adsorvida equivale à concentração remanescente. Para as três concentrações estudadas, 3,53; 6,27 e 13,06 mg L⁻¹, os tempos de equilíbrio foram de 1,75; 1,65 e 2,95h, respectivamente (Figuras 5, 6 e 7), tornando-se constante após este tempo. Mesmo após o equilíbrio, pode ser observado que o microrganismo ainda continua sua atividade adsortiva, com indícios de eliminação de sólidos para o meio somente na concentração de 6,27 mg L⁻¹ de cobre. Pode-se dizer que o que determina o limite é a quantidade de sítios ativos disponíveis. A obtenção do ponto de equilíbrio é importante porque o soluto adsorvido pode, com uma simples alteração na temperatura, concentração ou pressão de operação, ser

removido do sólido adsorvente, prejudicando o processo adsorcivo posterior (PERUCH et al., 1997).

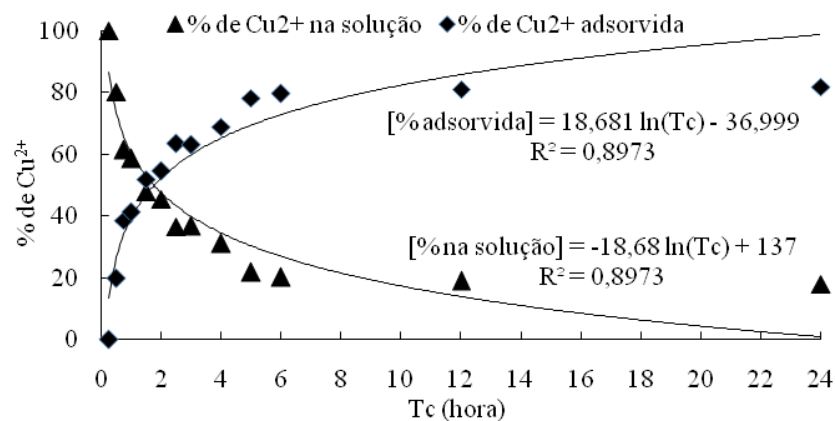


Figura 5 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno para a concentração de $3,53 \text{ mgCu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (10 mg L^{-1} de sulfato de cobre)

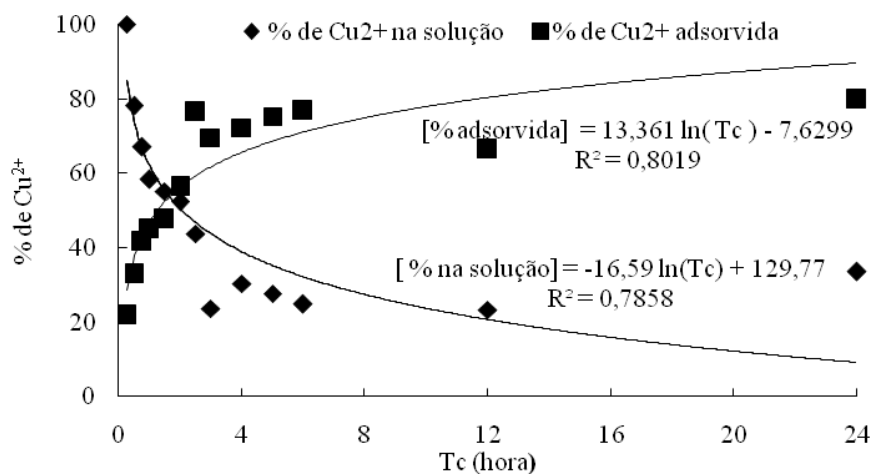


Figura 6 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno para a concentração de cobre de $6,27 \text{ mg L}^{-1}$ (20 mg L^{-1} de sulfato de cobre)

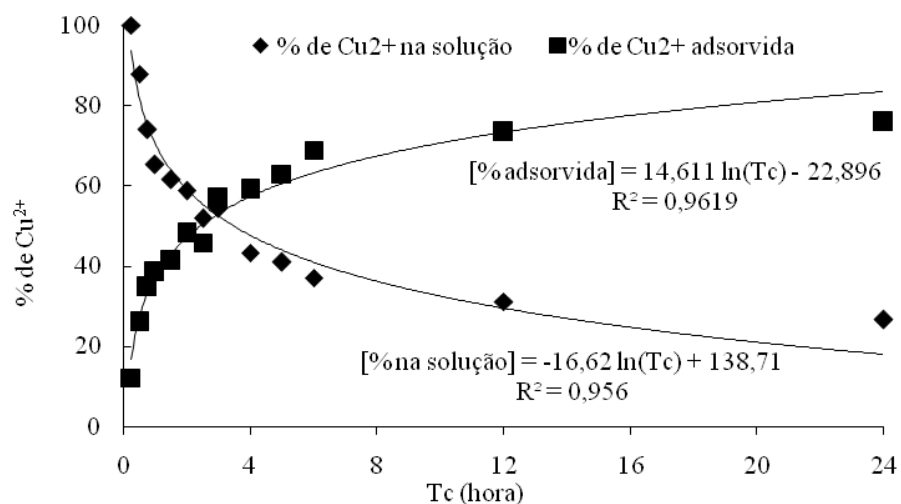


Figura 7 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno para a concentração de cobre de 13,06 mg L⁻¹ (50 mg L⁻¹ de sulfato de cobre)

Os valores do coeficiente de reação k encontrados a partir da Equação 4, foram correlacionados com seus respectivos tempos de contato. O efeito do tempo de contato com a variação das diferentes concentrações de sulfato de cobre, na velocidade de adsorção, está mostrado na Figura 8. Foi observado que quanto maiores os coeficientes de reação k , maiores eram as velocidades da reação de adsorção, sendo que a maior velocidade foi observada no início do estudo. Isto aconteceu porque, no início, a superfície de contato do biofilme era maior, com os sítios de ligação livres do elemento cobre, o que causou a aceleração do processo de adsorção. Quando a superfície de contato diminuía em razão do processo de adsorção, a velocidade de reação também diminuía até o equilíbrio entre o soluto e o adsorvente. De acordo com Silveira e Alleoni (2007), esta fase inicial da curva de adsorção corresponde a uma alta energia de ligação.

Observou-se também que a menor taxa de adsorção foi atingida quando o fungo foi submetido à maior concentração de cobre. Quando se aumentou a concentração de cobre de 3,53 para 6,27 mg L⁻¹ na solução, o coeficiente de reação k aumentou, mas quando a concentração foi aumentada de 6,27 para 13,06 foi observado um decréscimo no coeficiente k . Os valores máximos observados para o coeficiente de reação k , para o fungo inoculado em escória de alto forno, foram de 21,2; 23,7; 12,5 d⁻¹ e os valores mínimos foram de 1,3; 1,6; 1,4 d⁻¹ para as concentrações de 3,53, 6,27 e 13,06 mgCu²⁺ L⁻¹, respectivamente. A velocidade de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* foi dependente da concentração do metal no adsorvente.

A concentração de cobre de 6,27 mg L⁻¹ apresentou o melhor valor de k (Figura 8). Observou-se que a interação entre os dados foi de forma logarítmica, sendo que, ao aumentar essa concentração, houve uma diminuição do valor de k em mesma escala, apontando para uma diminuição na velocidade de adsorção e na capacidade de adsorção do fungo pelo elemento cobre.

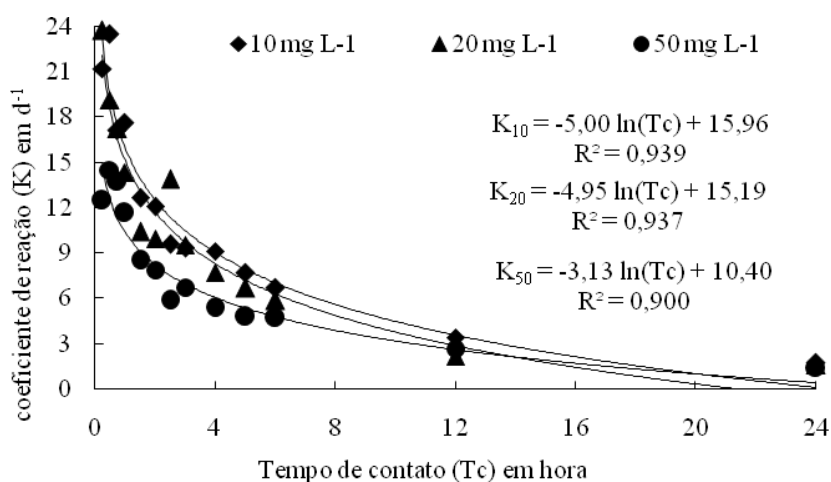


Figura 8 Efeito do tempo de contato com a variação das concentrações iniciais de cobre na velocidade de adsorção para fungo inoculado em escória de alto forno

3.2 Meio suporte argila expandida

Para o meio suporte argila expandida, percebeu-se que, como aconteceu com o meio suporte escória de alto forno, com o aumento do tempo de contato (Tc) aumentaram-se as quantidades adsorvidas na fase sólida, porém, de forma menos acentuada. Os Tc de 0,25 e 0,5h (Figura 9) não influenciaram nas quantidades adsorvidas na fase sólida (S), apresentando, para os dois diferentes Tc, valores de S próximos. Para os Tc 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 h (Figura 10) o aumento foi mais acentuado para a concentração de cobre de 13,06 mg L⁻¹, principalmente entre os Tc de 1,5 e 2,5h. Para os Tc seguintes: 3,0; 4,0 e 5,0h (Figura 11) e 6,0; 12,0 e 24,0 h (Figura 12) não foram verificadas grandes diferenças entre as concentrações estudadas. No total, a quantidade adsorvida na fase sólida foi de 82,98; 88,02 e 81,27% para as concentrações de cobre de 3,53, 6,27 e 13,06 mg L⁻¹, respectivamente.

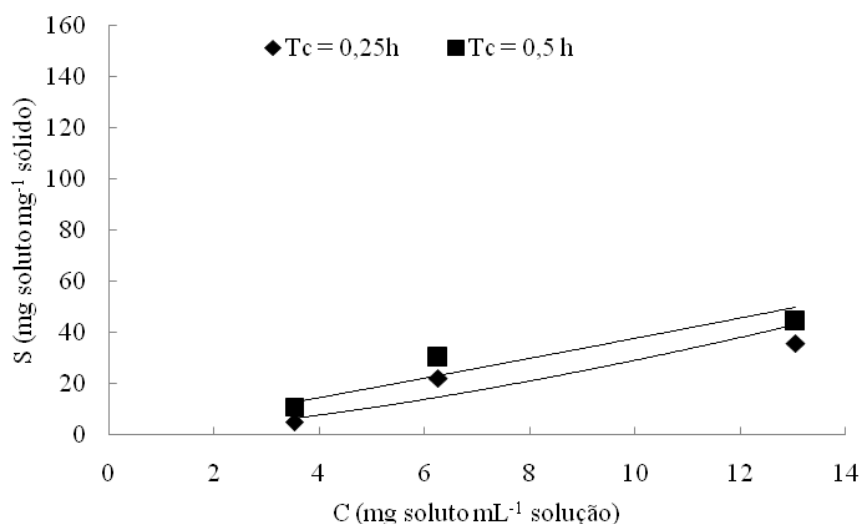


Figura 9 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 0,25 e 0,50h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida

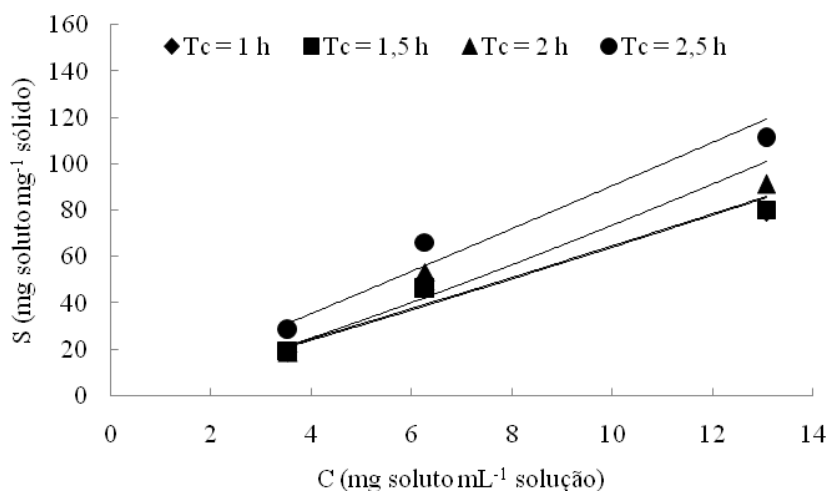


Figura 10 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida

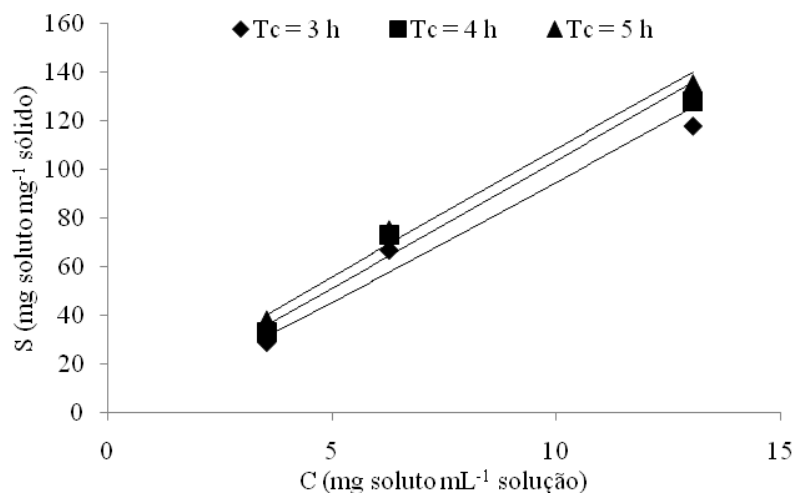


Figura 11 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 3,0; 4,0 e 5,0h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida

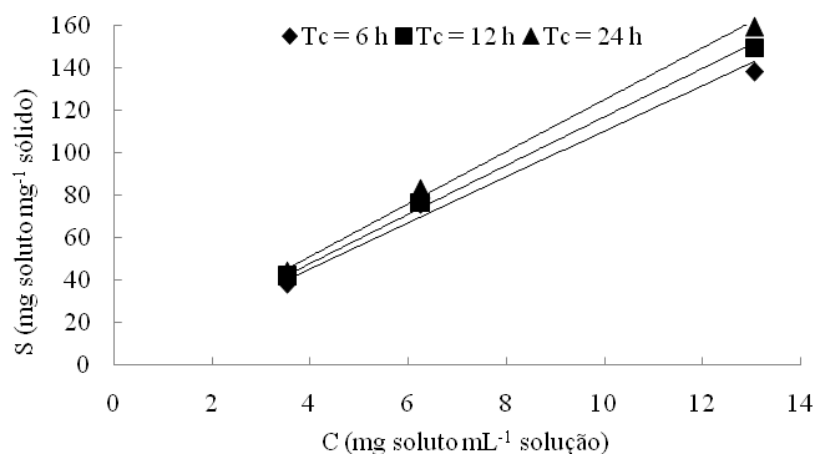


Figura 12 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (T_c) de 6,0 12,0 e 24h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida

As equações de regressão e os coeficientes de regressão (R^2) estão apresentados na Tabela 4. O coeficiente de regressão (R^2) variou de 0,879 a 0,998. O equilíbrio de adsorção foi satisfatoriamente descrito pelo modelo de Freundlich para todos os tempos de contato avaliados, com significativos valores de interação (R^2).

As constantes K_d e n estão apresentadas na Tabela 5. O menor valor de K_d , 0,98 foi observado aos 30 minutos e o maior valor, 13,09, com 24 horas de contato, indicando que a maior afinidade do soluto com o metal ainda não havia sido atingida, pois, após 24 horas, ainda se esperava que o valor continuasse aumentando.

A maior intensidade de adsorção, representada pela constante n , ocorreu com cinco horas de contato, mostrando que os sítios de contato, até esse tempo ainda permaneciam livres para a adsorção do cobre pelo microrganismo.

Tabela 4 Equações de regressão e comparação dos coeficientes de regressão (R^2) para os diferentes tempos de contato estudados

Tc (hora)	Equação de Regressão	R^2
0,25	$3,314 C^{1,054}$	0,897
0,50	$0,980 C^{1,468}$	0,879
1,00	$6,116 C^{0,984}$	0,927
1,50	$5,531 C^{1,067}$	0,962
2,00	$4,791 C^{1,186}$	0,936
2,50	$8,471 C^{1,030}$	0,956
3,00	$8,217 C^{1,061}$	0,967
4,00	$9,822 C^{1,022}$	0,971
5,00	$10,980 C^{0,956}$	0,987
6,00	$11,630 C^{0,976}$	0,988
12,00	$12,310 C^{0,977}$	0,998
24,00	$13,090 C^{0,979}$	0,996

Tabela 5 Efeito do tempo de contato (Tc) nas constantes de Freundlich K_d (constante de equilíbrio de adsorção) e n (constante relacionada à intensidade de adsorção)

Tc (hora)	K_d (mL mg⁻¹)	1/n	n
0,25	3,314	1,054	0,949
0,50	0,980	1,468	0,681
1,00	6,116	0,984	1,016
1,50	5,531	1,067	0,937
2,00	4,791	1,186	0,843
2,50	8,471	1,030	0,971
3,00	8,217	1,061	0,943
4,00	9,822	1,022	0,978
5,00	11,980	0,956	1,046
6,00	11,630	0,976	1,025
12,00	12,310	0,977	1,024
24,00	13,090	0,979	1,021

3.2.1 Cinética de adsorção de cobre por *Cladosporium cladosporioides* no meio suporte argila expandida

Os tempos de equilíbrio observados para a argila expandida foram de 3,0; 1,5 e 2,5h, respectivamente (Figuras 13, 14 e 15) para as três concentrações de cobre estudadas, 3,53; 6,27 e 13,09 mg L⁻¹. Também foi observado que, para as três concentrações, mesmo após o equilíbrio, o microrganismo ainda continuou sua atividade adsortiva.

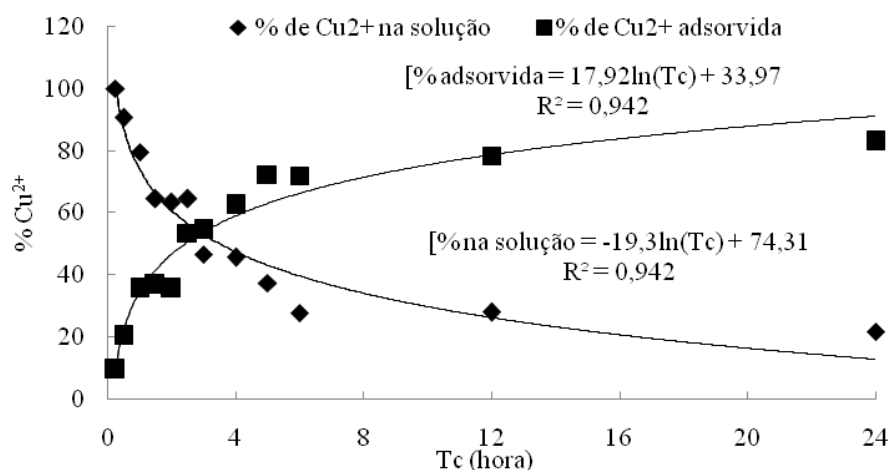


Figura 13 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida para a concentração de cobre de 3,53 mg L⁻¹ (10 mg L⁻¹ de sulfato de cobre)

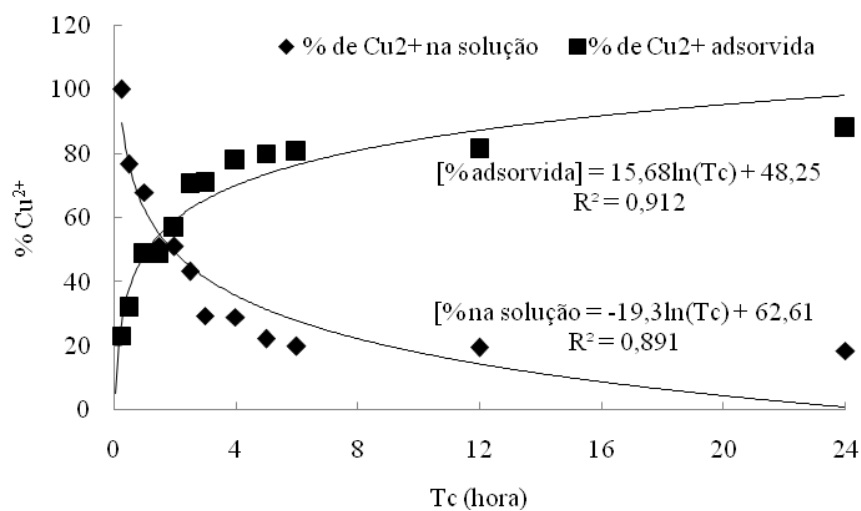


Figura 14 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida para a concentração de cobre de $\text{mgCu}^{2+} \text{L}^{-1}$ (20 mg L^{-1} de sulfato de cobre)

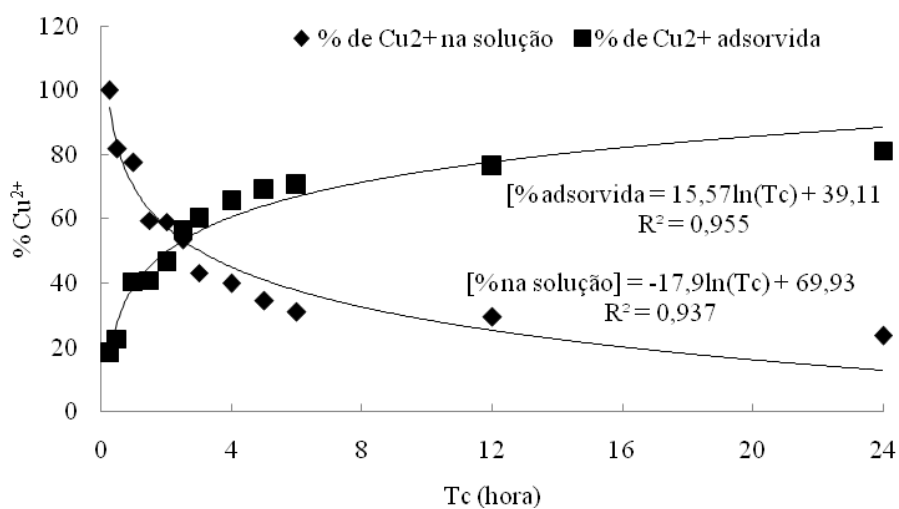


Figura 15 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida para a concentração de cobre de $13,06 \text{ mg L}^{-1}$ (50 mg L^{-1} de sulfato de cobre)

O efeito do tempo de contato para as diferentes concentrações de cobre, na velocidade de adsorção, está mostrado na Figura 16. As maiores velocidades de adsorção foram observadas no início do estudo, acelerando o processo de adsorção. Com o aumento do tempo de contato diminuía a superfície de contato e também a velocidade de reação, com baixa energia de ligação.

Quando a concentração do soluto aumentou de 3,53 para 6,27 mg L⁻¹ na solução, o coeficiente de reação k aumentou para os diferentes tempos de contato, mas, quando a concentração foi aumentada de 6,27 para 13,06 mg L⁻¹, o valor de k diminuiu. Para as concentrações de cobre de 3,53, 6,27 e 13,06 mg L⁻¹, os maiores valores observados para o coeficiente k foram de 10,9; 25,5; 19,3 d⁻¹ para os Tc de 0,5; 0,25 e 0,25h, respectivamente, e os menores valores foram de 1,8; 2,1; 1,7 d⁻¹ para o Tc de 24h.

A concentração de cobre de 6,27 mg L⁻¹ apresentou os melhores valores de k (Figura 16). Para a concentração de cobre de 13,06 mg L⁻¹, com menores valores de k foi observada diminuição na velocidade de adsorção e na capacidade de adsorção do biofilme.

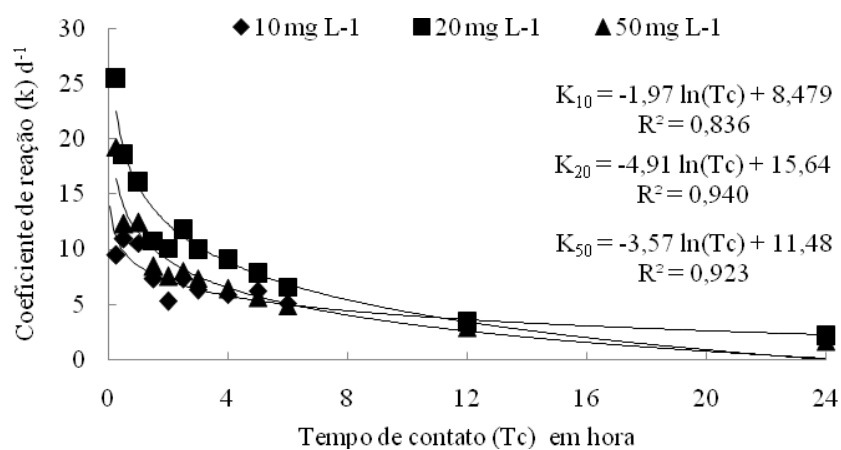


Figura 16 Efeito do tempo de contato com a variação das concentrações iniciais de cobre na velocidade de adsorção para fungo inoculado em argila expandida

3.3 Tubo corrugado amarelo 5/8"

Para o meio suporte tubo corrugado amarelo 5/8", como aconteceu com os outros meios suporte, foi observado aumento nas quantidades adsorvidas na fase sólida com o aumento do tempo de contato (T_c). Para a concentração de $3,53 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre as quantidades adsorvidas na fase sólida (S) para os T_c de 0,25 e 0,5h (Figura 17) tiveram valores próximos, assim como nos T_c de 0,5 e 0,75h para a concentração de $6,27 \text{ mg L}^{-1}$, mas para $13,06 \text{ mg L}^{-1}$ entre 1,5 e 2,0h houve maior quantidade adsorvida. Para os T_c de 3,0; 4,0 e 5,0h (Figura 18) os valores de S para cada concentração estudada também foram próximos e, para 6,0; 12,0 e 24,0 h (Figura 19) foi observado que o aumento do T_c não influenciou o valor de S para cada concentração estudada. No total, a quantidade adsorvida na fase sólida foi de 79,36; 79,38 e 76,83% para as concentrações de $3,53$, $6,27$ e $13,06 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

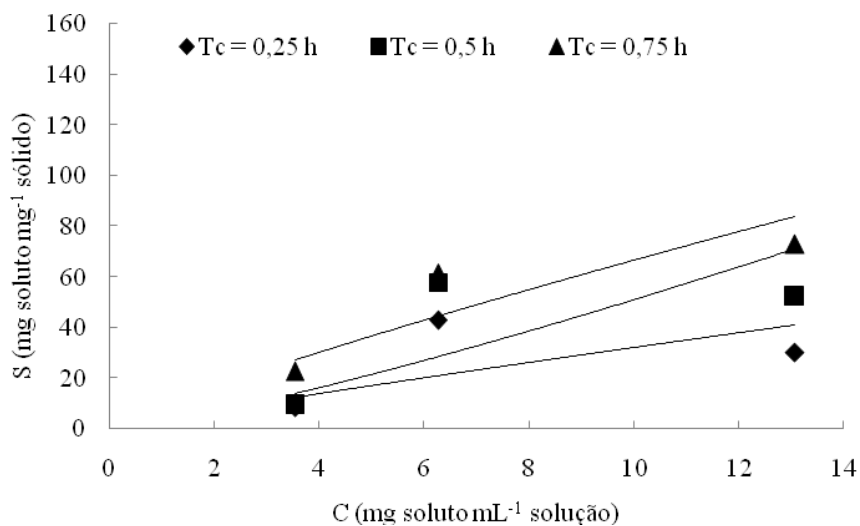


Figura 17 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (T_c) de 0,25; 0,50 e 0,75 h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8"

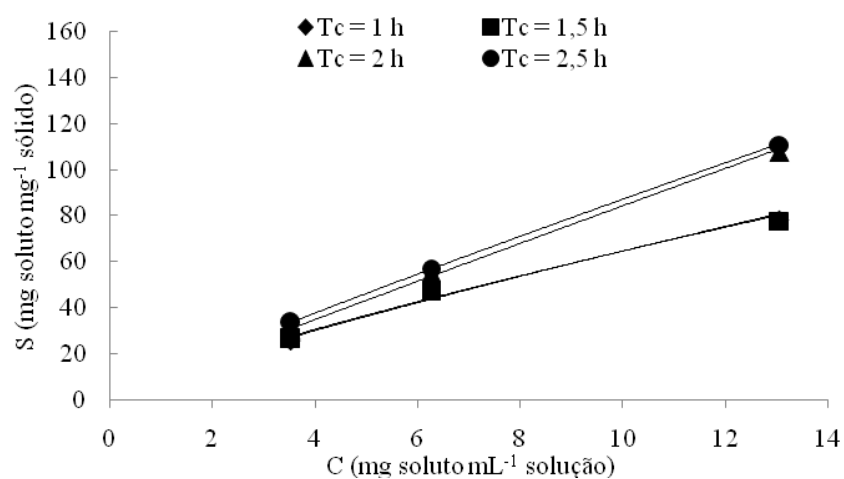


Figura18 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8"

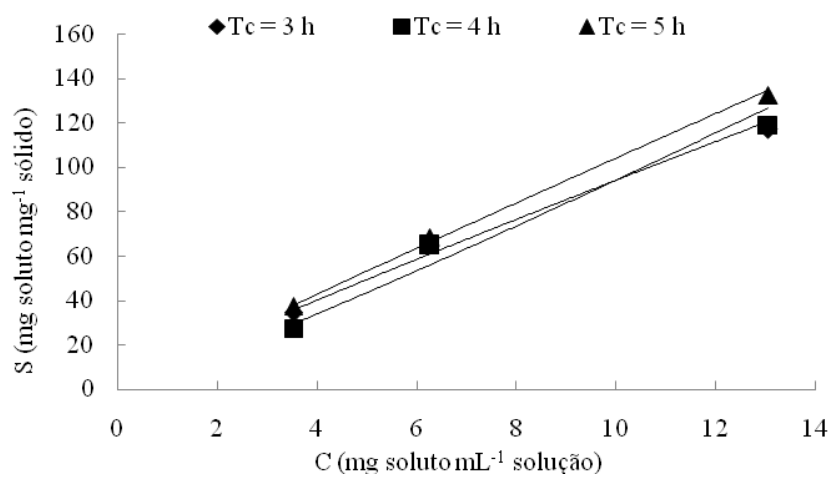


Figura 19 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (Tc) de 3,0; 4,0 e 5,0h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8"

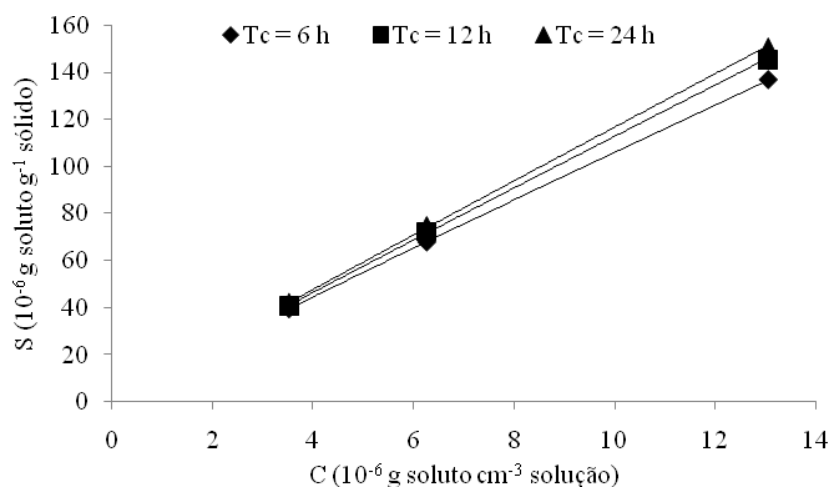


Figura 20 Isoterma de adsorção para os tempos de contato (T_c) de 6,0 12,0 e 24h para o fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8"

As equações de regressão e os coeficientes de regressão (R^2) estão apresentados na Tabela 6. O coeficiente de regressão (R^2) variou de 0,484 a 0,999. Foi observado, para os primeiros T_c menor interação entre os parâmetros S e C . Mesmo com baixas interações no início do estudo o equilíbrio de adsorção pôde ser descrito pelo modelo de Freundlich para todos os tempos de contato avaliados, sendo observado que o aumento do T_c aumentou a interação entre os parâmetros, sendo melhor a descrição do modelo.

As constantes K_d e n estão apresentadas na Tabela 7. O menor valor de K_d , 2,99 foi observado aos 30 minutos e o maior valor, 12,36, com 24 horas de contato, indicando, assim como aconteceu com o meio suporte argila expandida, que a maior afinidade do soluto com o metal ainda não havia sido atingida, pois após 24 horas ainda se esperava que o valor continuasse aumentando.

Tabela 6 Equações de regressão e comparação dos coeficientes de regressão (R^2) para os diferentes tempos de contato estudados

Tc (hora)	Equação de Regressão	R^2
0,25	$3,952C^{0,912}$	0,484
0,50	$2,991C^{1,233}$	0,639
0,75	$9,229C^{0,859}$	0,799
1,00	$9,322C^{0,841}$	0,979
1,50	$9,876C^{0,814}$	0,987
2,00	$9,014C^{0,970}$	0,997
2,50	$10,510C^{0,917}$	0,999
3,00	$11,080C^{0,928}$	0,991
4,00	$7,281C^{1,112}$	0,971
5,00	$11,290C^{0,963}$	0,998
6,00	$11,800C^{0,952}$	0,999
12,00	$12,060C^{0,970}$	0,999
24,00	$12,360C^{0,974}$	0,999

Tabela 7 Efeito do tempo de contato (Tc) nas constantes de Freundlich Kd (constante de equilíbrio de adsorção) e n (constante relacionada à intensidade de adsorção)

Tc (hora)	Kd (mL mg ⁻¹)	1/n	n
0,25	3,952	0,912	1,096
0,50	2,991	1,233	0,811
0,75	9,229	0,859	1,164
1,00	9,322	0,841	1,189
1,50	9,876	0,814	1,229
2,00	9,014	0,970	1,031
2,50	10,510	0,917	1,091
3,00	11,080	0,928	1,078
4,00	7,281	1,112	0,899
5,00	11,290	0,963	1,038
6,00	11,800	0,952	1,050
12,00	12,060	0,970	1,091
24,00	12,360	0,974	1,027

O maior valor observado para a constante n foi no Tc de 1,5 horas, ou seja, foi com 1,5h que ocorreu a maior intensidade de adsorção, diferente da escória expandida que o maior valor de n foi observado para os primeiros 25

minutos, sendo que para a argila expandida essa maior intensidade somente ocorreu no Tc de 5h.

3.3.1 Cinética de adsorção de cobre por *Cladosporium cladosporioides* no meio suporte tubo corrugado amarelo 5/8"

Os tempos de equilíbrio observados para o tubo corrugado amarelo 5/8" foram de 1,7; 0,75 e 2,9 h, respectivamente (Figuras 21, 22 e 23) para as três concentrações de cobre estudadas, 3,53; 6,27 e 13,09 mg L⁻¹. Também foi observado que, para as três concentrações, mesmo após o equilíbrio, o microrganismo ainda continuou sua atividade adsortiva.

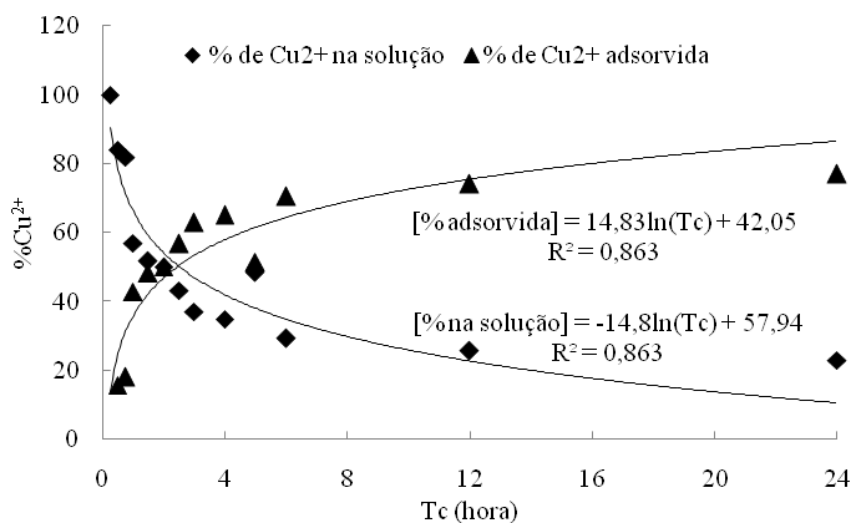


Figura 21 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8" para a concentração de cobre de 3,53 mg L⁻¹ (10 mg L⁻¹ de sulfato de cobre)

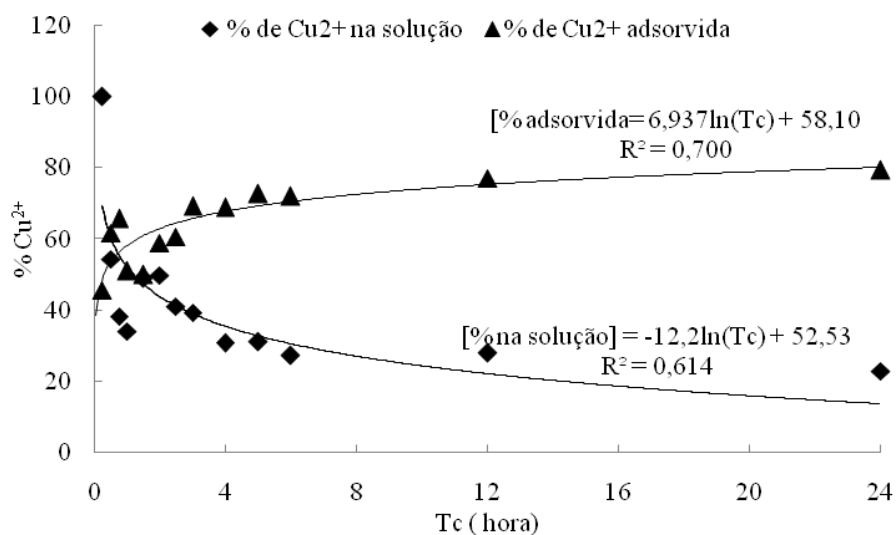


Figura 22 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8'' para a concentração de cobre de 6,27 mg L⁻¹ (20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre)

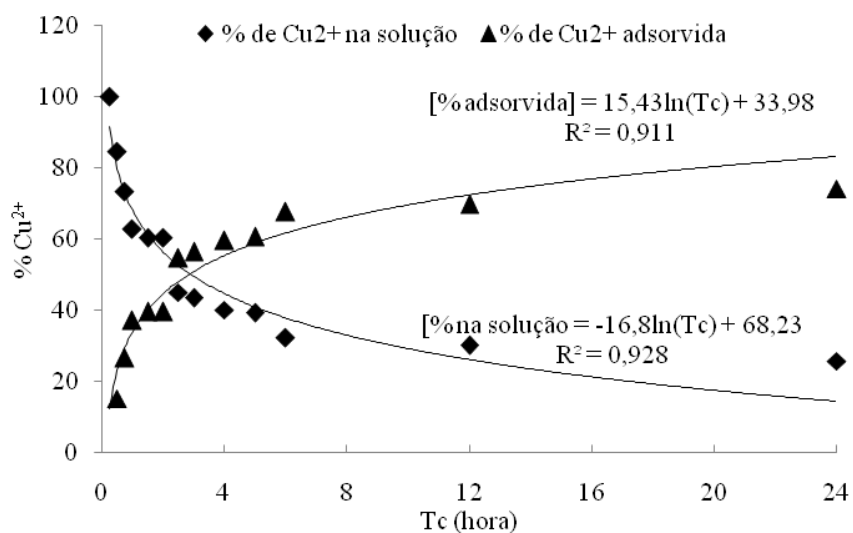


Figura 23 Cinética de adsorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8'' para a concentração de cobre de 13,06 mg L⁻¹ (50 mg L⁻¹ de sulfato de cobre)

Para o tubo corrugado amarelo 5/8” foram observados valores elevados do coeficiente de reação k para a concentração de cobre de $6,27 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfato de cobre, nos tempos de contato de 0,25; 0,5 e 0,75h (Figura 24), correspondendo a elevadas energias de ligação nestes tempos, com isso, a curva de tendência atingiu valores menores que zero.

Foi observado para o fungo inoculado em tubo corrugado amarelo 5/8”, como para os outros meios suportes analisados que, quando a concentração foi aumentada de $6,27$ para $13,06 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre, os valores de k diminuíram com o aumento da concentração.

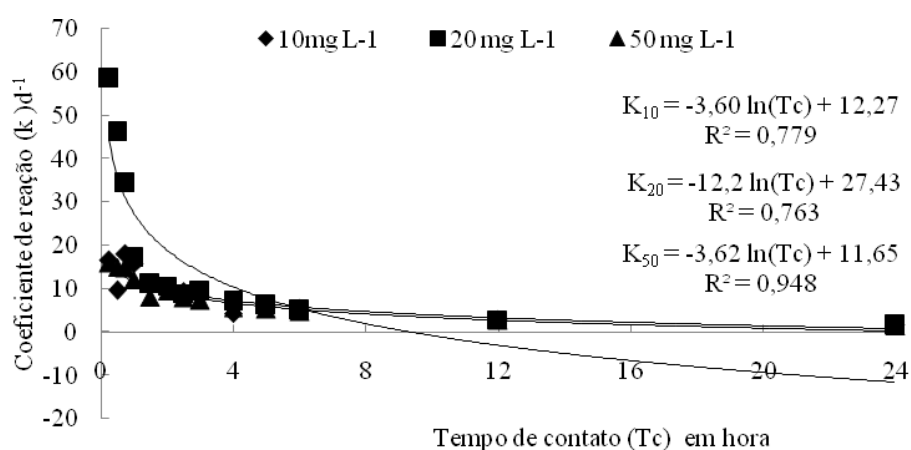


Figura 24 Efeito do tempo de contato com a variação das concentrações iniciais de cobre na velocidade de adsorção para fungo inoculado no tubo corrugado amarelo 5/8”

Para todos os tempos de contato analisados, observou-se que o aumento da concentração inicial de cobre da solução causou um aumento da quantidade de íons metálicos adsorvida na fase sólida, conforme já observaram Igwe e Abia (2007), ao constatarem que a quantidade de metal adsorvido aumenta com o aumento da concentração inicial.

4 CONCLUSÕES

O cobre bivalente, na forma de sulfato de cobre foi adsorvido por *Cladosporium cladosporioides* inoculado nos meios suportes utilizados: escória de alto forno, argila expandida e tubo corrugado amarelo 5/8”.

Para todos os tempos de contato analisados, observou-se que o aumento da concentração inicial de cobre da solução, causou um aumento da quantidade de íons metálicos adsorvidos na fase sólida.

O equilíbrio de adsorção foi satisfatoriamente descrito pelo modelo de Freundlich para todos os tempos de contato avaliados, com elevados valores de interação (R^2), sendo que o maior valor de Kd foi observado quando o fungo foi inoculado em escória de alto forno, com o tempo de contato de 4 h.

A melhor concentração inicial de sulfato de cobre utilizada foi a de 20 mg L⁻¹ no processo de biossorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado nos meios suportes utilizados.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 1998.

BENGUELLA, B.; BENAÏSSA, H. Effects of competing cations on cadmium biosorption by chitin. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 201, p. 143-150, 2002.

DENG, S.; TING, Y. P. Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu(II), Pb(II) and Ni(II). **Water Research**, New York, v. 39, n. 10, p. 2167-2177, 2005.

IGWE, J. C.; ABIA, A. A. Equilibrium sorption isotherm studies of Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions detoxification from wastewater using unmodified and EDTA-modified maize husk. **Electronic Journal of Biotechnology**, Casilla, v. 10, n. 4, p. 15, 2007.

JONGE, H. et al. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. **Soil Science**, Baltimore, v. 166, p. 230-238, 2001.

KLEINUBING, S. J. **Remoção de cádmio, chumbo e cobre utilizando zeólita natural clinoptilolita em coluna de leito fixo**. 2006. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MUKHOPADHYAY, M.; NORONHA, S. B.; SURAIISKUMAR, G. K. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1781-1787, 2007.

PERUCH, M. G. B. **Adsorção de corantes têxteis em solução aquosa sobre carvão ativado e alumina ativada**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997. Não paginado.

PETHKAR, A. V.; PAKNIKAR, K. M. Recovery of gold from solutions using *Cladosporium cladosporioides* biomass beads. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 63, p. 121-136, 1998.

PETRUZZELLI, G.; GUIDI, G.; LUBRANO, L. Ionic strength effect on heavy metal adsorption by soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 16, p. 971-986, 1985.

POZZA, A. A. A. et al. Adsorção e dessorção aniônicas individuais por gibbsitapodogenética. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 99-105, 2009.

REED, B.E.; MATSUMOTO, M. R. Modeling cadmium adsorption by activated carbon using the Langmuir and Freundlich isotherm expressions. **Separation Science and Technology**, New York, v. 28, n. 13/14, p. 2179-2195, 1993.

SAG, Y.; KUTSAL, T. Recent Trends in the biosorption of heavy metals: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Busan, v. 6, p. 376-385, 2001.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, p. 67-70, 2001.

SILVEIRA, M. L. A.; ALLEONI, L. R. F. Copper Adsorption in Tropical Oxisols. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 529-536, 2007.

VEIT, M. T. et al. Biossorção de níquel e cromo de um efluente de galvanoplastia utilizando alga marinha pré-tratada em coluna. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 175-183, 2009.

CAPÍTULO 4

BIOSSORÇÃO DE COBRE POR *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries EM BIOFILTRO COM DIFERENTES MEIOS SUPORTES

RESUMO

Nesta pesquisa, objetivou-se o desenvolvimento de biofiltros com a finalidade de avaliar a biossorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*. O experimento foi realizado em três etapas. Na primeira, os biofiltros avaliados foram preenchidos com os meios suportes argila expandida, pedra pomes sintética e escória de alto forno sem inoculação do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. As propriedades da pedra pomes sintética não foram suficientes para mantê-la como meio suporte, então ela foi substituída, na segunda e terceira etapas, pelo tubo corrugado amarelo 5/8” (conduíte). Na segunda etapa, os meios suportes foram inoculados com o fungo, monitorando-se o processo de adsorção de cobre dentro dos biofiltros. A terceira etapa foi montada com o objetivo de avaliar somente a concentração de cobre no efluente. Os biofiltros foram construídos em vidro de 20 mm de espessura, prismáticos, com altura de 65 cm e 15 cm de lado. Os requisitos ambientais que garantiram o cultivo do fungo *Cladosporium cladosporioides*, dentro do reator, foram: temperatura média de 25 °C, pH médio de 4,08 e quantidade média de oxigênio de 7,7 mg L⁻¹. O biofiltro preenchido com a escória de alto forno inoculada foi o que apresentou melhores resultados para adsorção de cobre, com biossorção máxima de 68,7% e a escória foi o meio suporte que promoveu melhor aderência do biofilme permitindo plena colonização do fungo. A biossorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* cultivado nos meios suportes argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado amarelo 5/8”, dentro dos biofiltros desenvolvidos, se mostrou eficiente durante um período de 30 horas.

Palavras-chave: Tratamento biológico. Fungos. Reator. Filtração. Inoculação

ABSTRACT

This work aimed at the development of biofilters to adsorb copper by the fungus *Cladosporium cladosporioides*. The experiment was conducted in three stages. In the first stage, the biofilters were filled with the support media expanded clay, synthetic pumice (CHECAR TERMO) and alkali-activated slag, without having been inoculated with the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Since the properties of synthetic pumice were not sufficient to allow it to be used as support medium, it was substituted during the second and third stages by the 5/8" yellow corrugated pipe (conduit). During the second stage, the support media were inoculated with the fungus, with the copper adsorption process inside the biofilters being monitored. The third stage was set up to evaluate only the copper concentration in the effluent. The biofilters were built in 20 mm thick, prismatic glass, 65 cm high and 15 cm by side. The environmental requirements that allowed cultivation of the fungus *Cladosporium cladosporioides* inside the reactor were: mean temperature of 25 °C, mean pH of 4.08 and oxygen mean amount of 7.7 mg L⁻¹. The biofilter filled with inoculated alkali-activated slag presented the best copper adsorption results, with maximum biosorption of 68.7%, with the slag being the support medium promoting the best biofilm adherence, allowing full fungus colonization. Copper biosorption by the fungus *Cladosporium cladosporioides* cultivated in the support media expanded clay, alkali-activated slag and 5/8" yellow corrugated pipe, inside the biofilters developed, showed to be efficient over a period of 30 hours.

Keywords: Biological treatment. Fungi. Reactor. Filtration. Inoculation.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se dado grande importância à reutilização das águas residuárias que, após tratamentos adequados, podem ser aproveitadas em diferentes usos. Nos casos de contaminação por metais pesados ou produtos tóxicos, o tratamento se torna mais oneroso, tendo que se buscar o desenvolvimento de novos tipos de tratamentos mais eficientes e mais baratos.

O processo de filtração é amplamente usado para polimento de efluentes após o tratamento secundário, principalmente quando se usam materiais com capacidades adsorventes que retirem do efluente compostos que não tenham sido removidos ainda. Os vários processos de tratamento disponíveis utilizando a filtração para a remoção de metais dissolvidos em efluentes líquidos industriais, tem-se o processo de biossorção, que se destaca em virtude do emprego de materiais de origem biológica como adsorventes (bactérias, fungos e algas) na remoção de diversos íons metálicos (VEIT et al., 2009).

A eficiência do biofiltro é governada pelas propriedades e características do meio suporte, que inclui porosidade, grau de compactação, capacidade de retenção de água e habilidade em hospedar as populações microbianas (SRIVASTAVA; MAJUMDER, 2008).

Brandão et al. (2000) estudaram o uso de materiais alternativos como meio filtrante no tratamento primário da água residuária de suinocultura. Foram utilizados o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz, a casca de café, o carvão vegetal, o sabugo de milho e a serragem de madeira, acondicionados em tubos de PVC de diâmetro de 100 mm, constituindo colunas de 500 mm de altura. O sistema de filtração foi mantido sob escoamento permanente, com fluxo em meio saturado. Dentre as análises realizadas, os resultados mais promissores foram observados para o cobre (Cu). A redução da concentração de Cu foi constatada em todos os materiais utilizados como filtro, atingindo-se

eficiência de remoção de 43,6% quando o material filtrante foi a serragem de madeira. Os autores concluíram que os resíduos orgânicos podem ser empregados como materiais filtrantes da água residuária de suinocultura, uma vez que proporcionaram melhoria nas qualidades química e física do efluente.

Goyal, Jain e Banerjee (2003), estudaram três diferentes microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) representados por *Streptococcus equisimilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* e o efeito da adição de uma fonte de energia extra na forma de glicose, frutose e sacarose no meio adsorativo para a adsorção de metais pesados por esses microrganismos. Os autores concluíram que a temperatura ambiente foi suficiente para a adsorção de metais da solução, mas a temperaturas mais elevadas a taxa de adsorção foi maior. *A. niger* foi mais eficiente que *S. equisimilis* e *S. cerevisiae* na remoção de concentrações mais elevadas de cromo. A idade da cultura teve efeito direto na adsorção do metal pelos microrganismos e a adição de nutrientes resultou em uma capacidade de ligação mais elevada do metal por *S. cerevisiae*.

Souza et al. (2004) isolaram o fungo identificado como *Aspergillus* 2BNL1 de lodo ativado para avaliar sua eficiência no tratamento do efluente proveniente de uma indústria de nitrocelulose, empregando um biorreator *air-lift*. Seus resultados mostraram que o microrganismo utilizado foi capaz de promover um descoloramento e ainda reduzir a matéria orgânica, sendo que o efluente ainda proporcionou um significativo aumento na produção de biomassa. Em outro trabalho, Souza et al. (2005) isolaram espécies doze fungos filamentosos, identificadas como deuteromicetos e zigomicetos, também de lodo ativado, visando a identificá-los e empregá-los para o tratamento biológico de efluentes, e verificaram que todos os fungos foram capazes de reduzir a coloração dos indústrias têxteis.

Para Srivastava e Majumder (2008) há grandes possibilidades para a aplicação efetiva de biofiltros para a remoção de metais tóxicos de águas

contaminadas, enfatizando que o sucesso da técnica microbiana pode aumentar a eficiência de remoção e reduzir os custos do tratamento, por ser capaz de remover metais pesados a níveis de partes por bilhão, podendo ser aplicada para o tratamento de águas residuárias de indústrias químicas, farmacêuticas, de fertilizantes, papel, têxteis, despolpamento, corantes e pigmentos.

Nesta pesquisa foram construídos três biofiltros preenchidos com diferentes meios suportes sem inoculação, com monitoramento físico-químico, depois os meios suportes foram inoculados monitorando-se o processo de bioissorção. Nesta pesquisa, objetivou-se o desenvolvimento de biofiltros com a finalidade avaliar a bioissorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de Execução

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia do EcoCentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), no Laboratório de Análise de Água do Departamento de Engenharia (LAADEG) e na biofábrica localizada na Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises da concentração de cobre foram realizadas no Laboratório de Análise Físico-química de Aguardente do Departamento de Química e no Laboratório de Fertilidade do Solo, do Departamento de Ciência do Solo. As análises de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), oxigênio dissolvido (OD), sólidos, nitrogênio e fósforo foram realizadas no LAADEG, e as análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, situados no campus da UFLA.

2.2 Inóculo

Neste estudo foi utilizado o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries., isolado G088, obtido de frutos do cafeeiro, pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do EcoCentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, cultivado em meio solidificado BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 25 °C por 10 dias.

Em placas de Petri de 150 mm, no meio de cultura BDA, o fungo foi repicado e depois cultivado à temperatura de 25° C por 20 dias.

2.3 Meio Suporte

O experimento foi conduzido em três etapas, sendo utilizados como meios suportes (MS), na primeira etapa, a argila expandida (vermiculita), a pedra pomes sintética e a escória de alto forno. A pedra pomes e a escória foram fisicamente alteradas até adquirirem tamanhos semelhantes aos da argila expandida (20 a 30 mm). Os MS foram colocados nos biofiltros sem inoculação e serviram para determinação dos parâmetros operacionais.

Na segunda e terceira etapas, a pedra pomes, que não apresentou propriedades suficientes para mantê-la como meio suporte, foi substituída pelo tubo corrugado amarelo 5/8" (conduíte) cortado em comprimentos iguais de 20 mm, uma vez que a pedra pomes mostrou-se capaz de adsorver o cobre, dificultando a avaliação da adsorção pelo fungo.

Esses materiais foram escolhidos, em razão das suas características tais como: densidade, porosidade, baixo custo e grande quantidade disponível, por serem leves e também por já terem sido usados em outros experimentos (LOURENÇO, 2006; LUIZ, 2007; SILVA, 2007).

A argila expandida foi comprada da Cinasita Argila Expandida – Jundiá/SP, a pedra pomes sintética foi adquirida na siderúrgica SICAL em Belo Horizonte/MG, a escória de alto-forno foi adquirida na siderúrgica Divigusa Indústria e Comércio Ltda, de Divinópolis/MG e o tubo conduíte adquirido no comércio de material elétrico local.

Os meios suportes foram lavados, secados à temperatura ambiente (26 °C) e autoclavados a 121 °C por 20 minutos e, posteriormente, inoculados com o fungo *Cladosporium cladosporioides*.

Para todos os materiais empregados como MS, foram determinadas a massa específica e a porosidade, de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente.

$$\rho = \frac{m}{v} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

ρ = massa específica (kg m⁻³);

m = massa (kg);

v = volume (m³)

$$P = \frac{V_v}{V} \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

P = porosidade (%);

V_v = volume de vazios (mL);

V = volume inicial (mL)

Para determinar a água absorvida pelo meio suporte, todos foram submersos em água e depois secos à temperatura ambiente somente para retirar o encharcamento. Para tal, foi pesado 1,0 L de material (peso úmido) e depois

levados à estufa até obtenção do peso constante (peso seco), conforme Equação 3.

$$Q = \frac{P_u - P_s}{P_s} \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

Q = quantidade de água absorvida pelo material (g)

P_u = peso úmido (g)

P_s = peso seco (g)

2.4 Inoculação do meio suporte (MS)

A inoculação dos MS foi feita em ambiente asséptico. Nas placas de Petri de 150 mm contendo o fungo desenvolvido, foram adicionados 20 mL de água destilada autoclavada. Os esporos foram raspados com bastão de vidro e esta suspensão, com concentração de 10^7 esporos mL^{-1} foi colocada em 250 mL de meio BDA morno. Essa mistura foi derramada aos poucos sobre os MS, em uma bandeja inox, sendo misturada até o meio nutriente tornar-se mais polimerizado e aderido ao MS. Os MS inoculados foram colocados em bandejas de plástico esterilizadas com álcool e em luz UV, cobertas com filme plástico e levadas para incubação a 25 °C por 10 dias. Depois do desenvolvimento dos fungos, os meios suportes foram transferidos para o biofiltro. Foram utilizados 4,5 L de meio nutriente BDA com a suspensão de esporos de concentração 10^7 esporos mL^{-1} , para 28 L de MS que a serem colocados nos biofiltros, sendo 9 L para a argila expandida e para a escória e 10 L para o tubo conduíte.

2.5 Preparo do efluente sintético

Para a obtenção do efluente sintético, a solução foi preparada com água de torneira e sulfato de cobre na concentração de 20 mg L^{-1} . Na segunda etapa da pesquisa, o efluente foi despejado nos biofiltros já contendo o MS inoculado e para completar o volume de recarga foi utilizado um reservatório plástico de 50 L, sendo o efluente conduzido para o biofiltro por meio de bomba magnética de dosificação marca ProMinent® gamma/L. Na terceira etapa, o efluente foi conduzido por uma bomba para fonte H190 VigoAr (altura máxima de 45 cm e vazão máxima de 190 L h^{-1}).

2.6 Construção do biofiltro

Para condução do experimento, foram construídos três biofiltros (figuras 1 e 2), em vidro de 20 mm de espessura, prismáticos, com 65 cm de altura e 15 cm de lado, com capacidade de 14,6 L. Ao longo da altura dos biofiltros, foram instaladas 4 torneiras e 4 flanges, para permitir a amostragem do efluente e do material suporte inoculado. Os biofiltros continham ainda um separador trifásico, que é um dispositivo adicional para separar o líquido dos sólidos e dos gases gerados na aeração, instalados na altura de 39,5 cm.

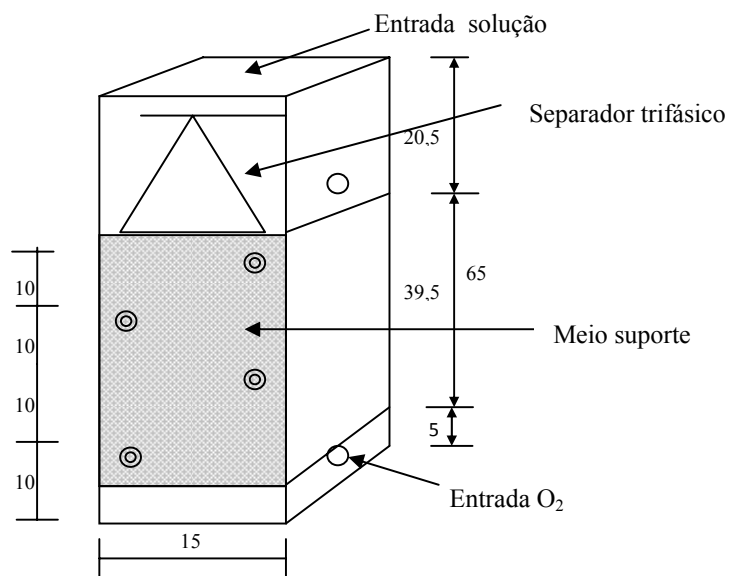


Figura 1 Desenho esquemático do biofiltro (medidas em cm)

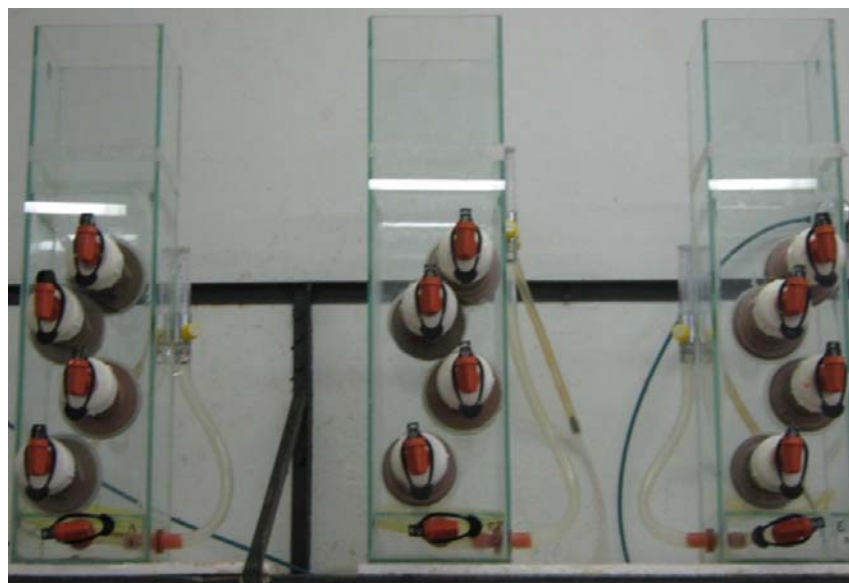


Figura 2 Biofiltros prismáticos construídos em vidro de 20 mm de espessura

Inicialmente, foi feito o teste de estanqueidade nos três biofiltros e após verificar que não havia mais vazamentos, os biofiltros foram preenchidos com água até completar o volume de 11 L, na altura do separador trifásico e, num primeiro momento admitiu-se trabalhar com a capacidade de 11 L, porém, quando as bóias foram colocadas, os biofiltros foram cheios com 14 L de água e a altura atingida pelo líquido foi a considerada para que os biofiltros fossem preenchidos com MS e a solução sintética.

O fluxo dos biofiltros foi intermitente, em batelada, sendo o efluente sintético colocado no início do tempo de contato, fazendo-se recargas por meio de bomba, quando eram retiradas quantidades maiores de efluente para amostragem, provocando uma mistura contínua do efluente.

2.7 Análises de cobre

Para a análise da concentração de cobre na solução dos biofiltros, foram retiradas amostras do líquido de acordo com o tempo de contato pré-estabelecido. As amostras foram coletadas em recipientes plásticos, lavados na solução de ácido nítrico 1:1 (SOUZA, 1977), e estocados em refrigerador até a realização das análises.

A concentração de cobre das amostras das primeira e segunda etapas da pesquisa, foi medida no Laboratório de Análise Físico-química de Aguardente do Departamento de Química da UFLA, seguindo o protocolo adaptado do Ministério da Agricultura (portaria 76 de 26 nov. 1986), que dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. O protocolo foi adaptado trocando-se a quantidade de álcool etílico usada por água destilada, uma vez que as amostras não continham álcool.

As soluções padrões foram preparadas nas concentrações de cobre de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L⁻¹ para obtenção da curva padrão. Para a determinação

do cobre, foram pipetados 10 mL da amostra, em duplicata, em tubos de ensaio com tampa de rosca 20x200 mm, depois foi acrescentado 1,0 g de hidroxilamida, agitado e acrescentado mais 1,0 g de acetado de sódio, agitado e depois acrescentado 10 mL da solução de 2,2 diquinolilo, preparada com 0,2 g de diquinolilo em 1,0 L de álcool isoamílico. Após o preparo das amostras, foi realizada a leitura do teor de cobre em equipamento UV Visible Spectrophotometer, marca Shimadzu, modelo 1601 PC com absorvância de 546 nm. Após a leitura e com os dados da curva padrão foram obtidas as concentrações de cobre nas amostras.

Na terceira etapa da pesquisa, a concentração de cobre foi determinada no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Ciências do Solo da UFLA, por espectrometria de absorção atômica (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 1998) em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer® modelo Analyst 40.

2.8 Monitoramento do biofiltro com os meios suportes não inoculados

Na primeira etapa da pesquisa, os três biofiltros foram preenchidos com os meios suportes não inoculados: argila expandida, pedra pomes sintética e escória de alto forno (Figura 3) para avaliar o desempenho e as características dos meios suportes antes da inoculação. Em razão das diferenças dos materiais, foram utilizados 8,0 L de argila expandida, 9,0 L de pedra pomes e 8,0 L de escória. No biofiltro contendo argila, foram utilizados 6,7 L da solução de sulfato de cobre, para o biofiltro contendo pedra pomes foram utilizados 6,3 L e para o biofiltro contendo escória foram utilizados 6,6 L.

Os biofiltros com os meios suportes não inoculados foram monitorados em duas fases, totalizando um período de 45 dias. Ainda foi acrescentada mais

uma etapa para o monitoramento exclusivo do pH do meio, com duração de 20 dias.



Figura 3 Biofiltros contendo os meios suportes argila expandida, pedra pomes e escória de alto forno sem inoculação

Segundo as metodologias propostas pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998), foram avaliados os parâmetros físico-químicos como oxigênio dissolvido (OD); demanda química de oxigênio (DQO); demanda bioquímica de oxigênio (DBO); sólidos, nitrogênio e fósforo. A alcalinidade e a acidez foram medidas por potenciometria.

A oxigenação do meio, na primeira e segunda etapas da pesquisa, foi feita pela entrada de ar localizada abaixo do fundo falso, pelo emprego de um compressor da marca SCHUZ, modelo MSV 5,2 VL/130 e controlada por fluxômetro de ar Vital Med com vazão de 1 a 15 L min⁻¹. Na terceira etapa, a

oxigenação foi feita por uma bomba de ar aquática BOYU modelo U-3600, com vazão de $4,0 \text{ L min}^{-1}$.

A amostragem do efluente de cada um dos três biofiltros foi de forma pontual a partir da coleta das alíquotas de solução das torneiras instaladas na parede do biofiltro.

2.9 Monitoramento do biofiltro com os meios suportes inoculados

Para monitoramento diário dos biofiltros, na segunda etapa da pesquisa (Figura 4), foram determinados diariamente o pH, utilizando pHmetro da Hach®, modelo BOX 389 – sension 4, e as temperaturas do líquido e do ambiente, medidas com um termohidrógrafo Termohygro®. A concentração inicial da solução foi de 20 mg L^{-1} .

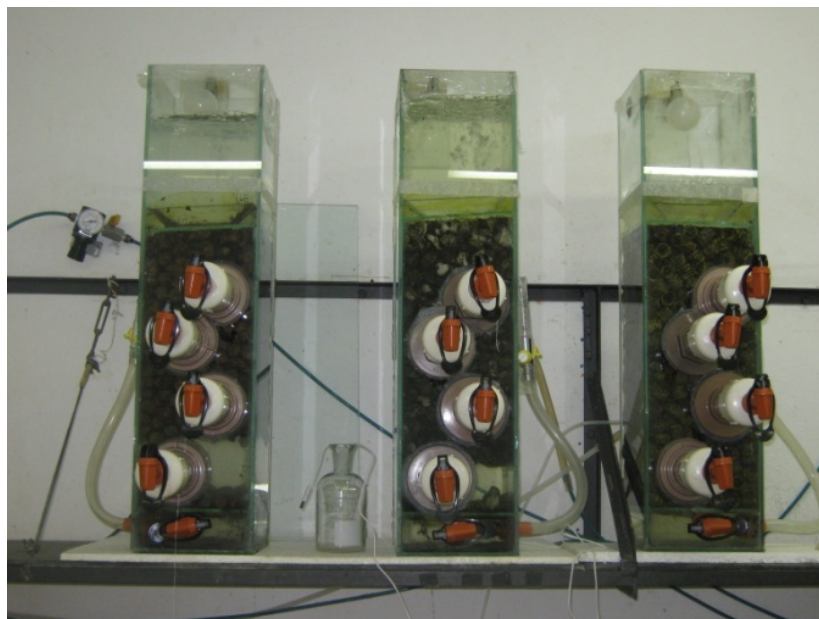


Figura 4 Biofiltros com o cultivo de *Cladosporium cladosporioides* em meio suporte argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado 5/8"

Os atributos físico-químicos e a amostragem do efluente de cada um dos três biofiltros foram analisados de forma semelhante à empregada nos biofiltros sem inoculação

Em razão das diferenças dos materiais empregados, o biofiltro com o MS escória de alto forno foi preenchido com 10,5 L de solução e o 6,0 L de MS inoculado, até a altura de 32 cm, enquanto o biofiltro com a argila expandida foi preenchido com 10,0 L de solução e 7,0 L de MS, colocado até a altura de 29 cm e o biofiltro com o tubo conduíte foi preenchido com 12,0 L de solução e 10,0 L de MS, colocado até a altura de 33 cm. O separador trifásico foi retirado dos biofiltros para melhor acomodar a bóia.

Na terceira etapa da pesquisa, foram colocados 9,0 L de escória, 9,0 L de argila expandida e 10,0 L de tubo conduíte em cada biofiltro e, posteriormente, eles foram preenchidos com a solução sintética de sulfato de cobre, por bombeamento. A concentração inicial da solução foi de 20 mg L⁻¹. O pH foi medido com medidor de pH digital de bolso Instruterm® modelo PH-1800 e as temperaturas do líquido e ambiente foram medidas com termômetro de mercúrio. A oxigenação do meio, nesta etapa, foi feita por uma bomba de ar aquática BOYU modelo U-3600, com vazão de 4,0 L min⁻¹.

2.10 Análises de microscopia

Das torneiras e flanges instaladas ao longo da altura dos reatores, foram coletadas as amostras do efluente e do material suporte para a caracterização da biomassa aderida e verificação do cobre adsorvido pelo fungo. As amostras foram analisadas em microscopia ótica e em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Na primeira e segunda etapas da pesquisa, foram retiradas amostras do fungo e dos meios suportes e levadas para preparação para MEV no Laboratório

de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, de acordo com o protocolo do laboratório. Cada amostra foi colocada para fixação em microtubo de 2,0 mL com solução fixativa de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M com pH de 7,2). As amostras permaneceram no fixador por 8 dias e, posteriormente, foram retiradas e lavadas (três lavagens de 10 minutos) em tampão cacodilato. As amostras foram pós-fixadas (fixação secundária) em solução aquosa de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, durante três horas, à temperatura ambiente.

Depois da pós-fixação, essas amostras foram lavadas três vezes em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradiente de acetona (25, 50 75, 90 e 100%), por 10 minutos. Na concentração de 100%, a operação foi repetida três vezes.

Após a desidratação, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico marca BAL-TEC, modelo CPD 030 para completar a secagem e, posteriormente, foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*). Para aumentar a condutividade da amostra, foram levadas para a cobertura de ouro em equipamento *sputtering* marca BAL-TEC, modelo SCD 050. Completado o preparo, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo LEO EVO 40.

2.11 Avaliação microbiológica

Para a realização das análises microbiológicas, foram retiradas de cada biofiltro contendo os meios suportes inoculados e a solução de sulfato de cobre, três amostras de cada MS inoculado, que foram cortadas ao meio; três amostras do biofilme formado pelo *Cladosporium cladosporioides* em escória, argila expandida e tubo conduíte e três amostras de 1,0 mL da solução. Cada amostra foi colocada em placa de Petri com meio BDA solidificado e colocada para

desenvolvimento à temperatura de 25 °C, durante 10 dias. Os microrganismos desenvolvidos nas placas foram isolados em meio BDA e CYA (extrato de levedura, sacarose, ágar, água destilada, concentrado Czapech (K_2HPO_4), solução metal de Czapech ($CuSO_4 \cdot 5H_2O + ZnSO_4 \cdot 7H_2O +$ água destilada)), e depois identificados por meio de características macroscópicas (coloração, aspecto das colônias, índice de crescimento micelial e de esporulação) e microscópicas (tamanho e forma, septação), conforme Sanson et al. (2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Meio Suporte

Dos três meios suportes selecionados na primeira etapa, a pedra pomes, com massa específica de 243 kg m^{-3} e porosidade de 65%, não apresentou condições favoráveis para o desenvolvimento da pesquisa, visto que, apresentou grande capacidade adsorptiva do elemento cobre tendo também turvado o efluente, acarretando valores de turbidez de até 905 UTm, além de provocar um aumento indesejado do pH. O aumento progressivo da turbidez foi decorrente do desfarelamento da pedra pomes submersa. Devido à sua alcalinidade, no decorrer da pesquisa o pH, mesmo após a correção com ácido clorídrico, sempre se elevava, chegando a 9,0, não permitindo o controle do pH em torno de 4,0, como se desejava na pesquisa.

Lapa et al. (2004) utilizaram o leito suporte da biomassa formado por matrizes de pedra pomes, no tratamento de esgotos sanitários, com o objetivo de avaliar o desempenho de um reator anaeróbio operado em batelada sequencial de leito fixo, provido de agitador mecânico, em escala de bancada. De acordo com os autores, os elevados valores de dureza encontrados no efluente confirmaram que houve solubilização de cálcio, constituinte importante da pedra pomes

sintética, decorrente da reação com ácidos orgânicos, sendo esse fenômeno o responsável pelos valores elevados de alcalinidade obtidos no efluente, uma vez que o cálcio solubilizado interage com as espécies químicas de bicarbonato. Os autores concluíram que a pedra pomes sintética não apresentou a estabilidade química necessária para seu uso como material suporte da biomassa em reatores anaeróbios, pois ocorreu a perda contínua de cálcio do leito que resultou na perda da estabilidade estrutural das matrizes.

Os meios suportes utilizados absorveram água quando este teste foi feito. A quantidade de água absorvida pelos meios suportes, após secagem em estufa até peso constante, foi de 41,82 g para a argila expandida; 209,20 g para a pedra pomes, 49, 63 g para a escória de alto forno e 23,72 g para o tubo conduíte, o que mostra, mais uma vez, que a pedra pomes não foi um agregado apropriado para o experimento, uma vez que sua elevada capacidade em reter água torna-a mais pesada para ser utilizada dentro de reatores.

No biofiltro preenchido com a argila expandida o líquido apresentou turbidez média de 108,16 UTm na primeira etapa da pesquisa. Esse material apresenta superfície lisa, mas com interior muito poroso, com massa específica de 347 kg cm^{-3} e porosidade de 82%.

No biofiltro preenchido com a escória de alto forno, o líquido permaneceu límpido, com turbidez de 6,8 UTm. Esse material apresentou massa específica de 147 kg cm^{-3} e porosidade de 83%. A análise química laboratorial da escória apresentou maior concentração de SiO_2 e CaO e ainda, traços de óxidos de ferro, de magnésio, de manganês e ainda Al_2O_3 .

O tubo conduíte foi usado, na segunda e terceira etapas da pesquisa, em substituição à pedra pomes. O líquido no qual ele ficou submerso apresentou turbidez média de 0,67 UTm, esse material apresentou massa específica de 33 kg cm^{-3} e porosidade de 94%.

Comparando-se os materiais empregados, verifica-se que a argila expandida turvou mais o líquido que os outros materiais e que a maior porosidade foi do tubo conduíte, em razão da sua formação em forma de anel.

3.2 Desempenho dos biofiltros

3.2.1 Temperatura

A temperatura ambiente média observada, durante o monitoramento dos biofiltros preenchidos com os meios suportes sem inoculação, foi de 27,4 °C, com mínima de 24,6 °C e máxima de 28,8 °C, enquanto a umidade relativa média foi de 46,9%, com mínima de 33% e máxima de 62%. Essas condições favoreceram para que os biofiltros fossem operados na faixa mesofílica de temperatura, com média de 26,5 °C, o que contribuiu para proporcionar condições estáveis e adequadas para uma eficiente estabilização do efluente (CHERNICHARO, 1997).

Durante o monitoramento dos biofiltros preenchidos com os meios suportes inoculados, a temperatura ambiente média foi de 22,4 °C, apresentando mínima de 19,6 °C e máxima de 24,7 °C, enquanto a umidade relativa média se manteve em 47,5% com mínima de 32,0% e máxima de 69,0%. Apesar da temperatura ambiente ter sido menor do que aquela observada na primeira etapa da pesquisa, os biofiltros ainda operaram na faixa mesofílica de temperatura, visto que, dentro dos biofiltros as temperaturas variaram entre 19 °C e 25 °C para os três meios suportes. As temperaturas mais baixas foram observadas no biofiltro preenchido com o tubo conduíte, com média de 22 °C. As variações da temperatura durante o monitoramento do biofiltro com inóculo estão mostradas na Figura 5.

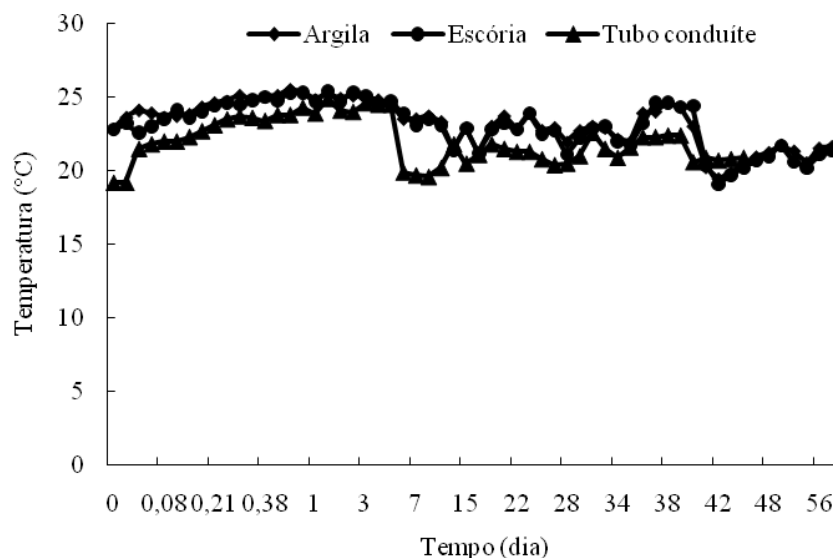


Figura 5 Variação da temperatura, durante o monitoramento, dos biofiltros preenchidos com diferentes meios suportes inoculados com *Cladosporium cladosporioides*

3.2.2 pH

O tipo de material suporte utilizado influenciou o pH da solução de sulfato de cobre. Para os biofiltros preenchidos com os meios suportes não inoculados, o pH da solução inicial foi de 4,07, visando a proporcionar condições mais ácidas, visto que o processo de adsorção foi melhor observado em pH mais baixos (FRANCO et al., 2004; NUHOGLU et al., 2002; SWAMY; RAMSAY, 1999). A acidez mediu $39,23 \text{ mg L}^{-1}$ e alcalinidade $61,72 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Nas primeiras horas do estudo o pH, que inicialmente foi ajustado para 4,07 em todos os biofiltros, após algumas horas ficou em torno de 8,0.

Após a correção do pH para 4,0, observou-se que no biofiltro preenchido com a pedra pomes o pH voltou a subir e a solução se manteve alcalina durante todo o monitoramento. Para o biofiltro preenchido com argila expandida o pH foi abaixado para próximo de 2,0 após a correção, não se alterando mais e, para

o biofiltro preenchido com escória o pH, após a adição de ácido clorídrico, permaneceu em torno de 4,0. Esses valores de pH, possivelmente afetaram o processo de adsorção dos meios suportes sem inoculação (Figura 6).

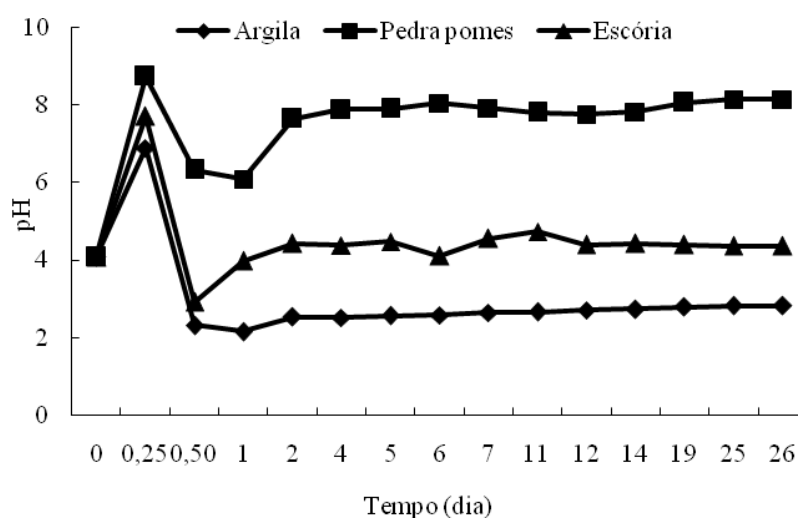


Figura 6 Variação do pH da solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ durante o monitoramento dos biofiltros preenchidos com os meios suportes não inoculados

Quando se monitoraram os biofiltros com os meios suportes inoculados, foi verificado que, mesmo com a adição de ácido clorídrico, o pH continuava aumentado, diferentemente do que ocorreu quando não havia inóculo. Durante o monitoramento, foram necessários vários ajustes para se conseguir o nível de pH desejado, entre 4,0 e 5,0 (Figura 7), garantindo a acidez desejada dentro dos biofiltros com o objetivo de inibir bactérias e proporcionar ambiente favorável ao fungo *Cladosporium cladosporioides*. Essa elevação do pH, na faixa de neutro a alcalino, prejudicou o processo de biossorção, reduzindo a capacidade do fungo em adsorver o metal cobre.

Os resultados de bioissorção encontrados por Franco et al. (2004), quando avaliaram o desempenho da bioissorção de cobre, chumbo e ferro em soluções aquosas, mostraram que a máxima adsorção foi obtida com pH igual a 4,0 para todos os metais, sendo que o processo foi altamente dependente do pH da solução, tendo também dificultado quando o pH ficou acima desse valor. Segundo esses autores, o pH da solução afeta a carga superficial da superfície dos adsorventes e o grau de ionização,

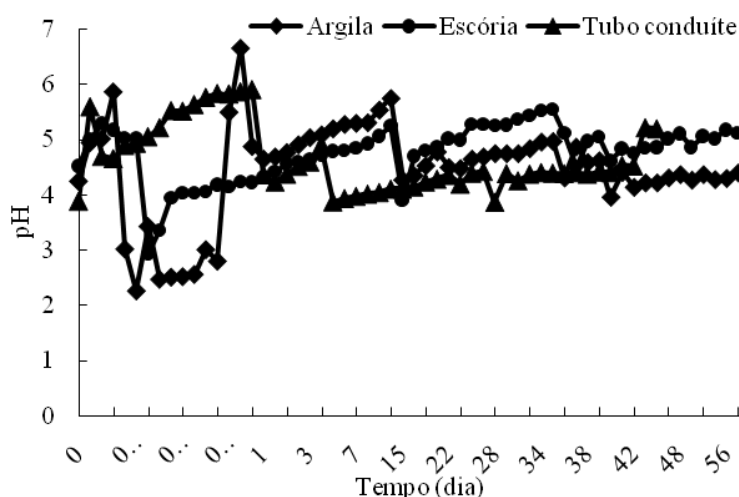


Figura 7 Variação do pH, durante o monitoramento dos biofiltros preenchidos com os diferentes meios suportes inoculados com o fungo *Cladosporium cladosporioides*

3.2.3 Atributos físico-químicos

No interior dos biofiltros preenchidos com os meios suportes não inoculados a concentração média de oxigênio dissolvido foi de 7,5 mg L⁻¹ para a pedra pomes, 7,8 mg L⁻¹ para a argila e 8,0 mg L⁻¹ para a escória. Quando os meios suportes foram inoculados, os biofiltros operaram com uma quantidade de oxigênio dissolvido em torno de 8,0 mg L⁻¹ (Figura 8). Esses valores indicaram

que as condições de aerobiose foram mantidas, ou seja, a aeração nos biofiltros foi adequada para o processo aeróbio.

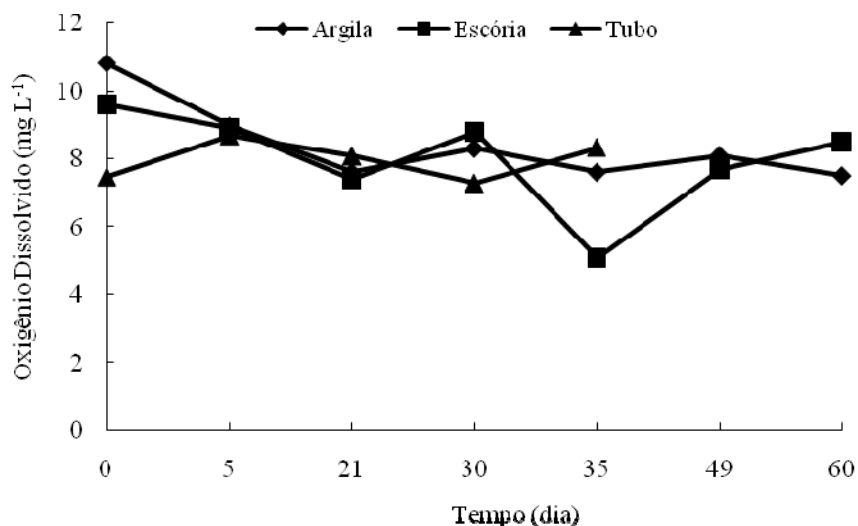


Figura 8 Quantidade de oxigênio dissolvido (OD) observada nos biofiltros com os diferentes meios suportes inoculados com o fungo *Cladosporium cladosporioides*

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) média foi de 2,6 mg L⁻¹ e a demanda química de oxigênio (DQO_{total}) média foi de 32 mg L⁻¹, para os biofiltros sem inóculo, mostrando que a matéria orgânica encontrada se devia mais às propriedades dos meios suportes.

Os resultados do monitoramento físico-químico do efluente do biofiltro contendo argila expandida inoculada são apresentados na Tabela 1. Os coeficientes de variação (C.V.) dos parâmetros Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Nitrogênio Total (NTK), apresentaram-se elevados, em razão da grande diferença entre os valores máximos e mínimos. Para a DQO as concentrações mínimas foram observadas durante os primeiros tempos de contato e as concentrações máximas durante os tempos de contato de 3 e 5 horas

e depois de 20 dias de monitoramento, mostrando, mais uma vez, que a carga foi decorrente das características do meio suporte e também da presença do fungo e do meio nutriente. As concentrações de NTK foram elevadas no início do monitoramento e muito baixas ao final, indicando possível consumo de nitrogênio pelo fungo. Também foi observada diminuição na concentração de fósforo e de DBO₅. Para os valores de acidez, as concentrações máximas foram obtidas nos intervalos de acréscimo da solução de ácido clorídrico.

Tabela 1 Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos: Acidez total (AT), sólidos totais (ST), demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (NTK) e fósforo (P) do efluente sintético do biofiltro contendo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em argila expandida

	Parâmetros					
	A T (mg L ⁻¹)	ST (mg L ⁻¹)	DBO ₅ (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	NTK (mg L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)
Média (x)	52,93	495,83	2,25	447,00	16,16	0,05
Mínimo	11,72	308,33	1,80	34,67	2,60	0,04
Máximo	98,84	838,33	2,70	2776,67	29,71	0,06
C.V.	0,58	0,43	0,17	1,36	1,19	0,23
Mediana	49,42	429,17	2,25	230,00	16,16	0,04
dp	30,69	211,57	0,39	607,11	19,17	0,01
x - 1 dp	22,24	284,27	1,86	-160,11	-3,01	0,04
x + 1 dp	83,62	707,40	2,64	1054,11	35,32	0,06

C. V. coeficiente de variação; dp – desvio padrão

Os resultados do monitoramento físico-químico do efluente do biofiltro contendo o tubo condúite inoculado estão apresentados na Tabela 2. Para este biofiltro os C.V. foram baixos, exceto para as concentrações de NTK, cujos valores decaíram entre o início e o final do monitoramento. Para os valores de acidez, as concentrações máximas foram observadas no intervalo de 3 a 42 dias de monitoramento, portanto este material apresentou estabilidade, mantendo a acidez do meio, em razão da sua composição inerte. Observou-se estabilidade nos dados de DQO em relação ao mesmo parâmetro analisado para o meio

suporte argila expandida. Para o parâmetro Sólidos Totais (ST) foram observadas concentrações máximas no início, em razão da influência da aeração que fez com que o biofilme se soltasse do material suporte, porém, com o decorrer do monitoramento, foi observada uma estabilidade, decorrente do biofilme ao voltar-se a acomodar nos interstícios do meio suporte. Os demais parâmetros, AT, DBO₅ e P, foram semelhantes ao efluente do biofiltro preenchido com argila expandida inoculada.

Tabela 2 Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos: Acidez total (AT), sólidos totais (ST), demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (NTK) e fósforo (P) do efluente sintético do biofiltro contendo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em tubo conduíte

	Parâmetros					
	AT (mg L ⁻¹)	ST (mg L ⁻¹)	DBO ₅ (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	NTK (mg L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)
Média (x)	66,74	257,08	1,68	464,38	21,04	0,07
Mínimo	39,23	176,67	1,20	287,50	3,52	0,06
Máximo	78,97	290,00	2,10	566,67	38,56	0,08
C.V.	0,24	0,21	0,23	0,27	1,18	0,14
Média	66,74	257,08	1,68	464,38	21,04	0,07
Mediana	68,78	280,83	1,70	501,67	21,04	0,07
dp	16,20	53,79	0,38	124,01	24,78	0,01
x - 1 dp	50,54	203,29	1,30	340,37	-3,74	0,06
x + 1 dp	82,95	310,87	2,05	588,38	45,82	0,08

C.V. – coeficiente de variação; dp – desvio padrão

O monitoramento físico-químico do biofiltro, contendo a escória de alto forno inoculada, está apresentado na Tabela 3. Para este biofiltro os coeficientes de variação (C.V.) foram semelhantes aos apresentados pela argila expandida, sendo que os parâmetros de DQO e NTK, também se apresentaram altos em razão das grandes diferenças entre as concentrações máximas e mínimas. As concentrações de DQO mínimas foram observadas nos tempos de contato finais e as concentrações máximas observadas entre os tempos de 3 e 5 horas. Para os

valores de acidez, como aconteceu com a argila expandida, foram encontradas concentrações máximas após o acréscimo da solução de ácido clorídrico.

O efluente sintético apresentou níveis muito baixos de matéria orgânica, estimada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Isso demonstra que o uso de microrganismo que adsorve metal deve ser considerado como um tratamento posterior ao tratamento biológico convencional, quando a concentração de matéria orgânica já tenha atingido os níveis de tratamento desejáveis.

Tabela 3 Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos: Acidez total (AT), sólidos totais (ST), demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (NTK) e fósforo (P) do efluente sintético do biofiltro contendo *Cladosporium cladosporioides* inoculado em escória de alto forno

	Parâmetros					
	AT (mg L ⁻¹)	ST (mg L ⁻¹)	DBO ₅ (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	NTK (mg L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)
Média (x)	43,87	448,61	2,58	683,14	26,63	0,05
Mínimo	11,72	278,33	2,20	17,67	3,02	0,04
Máximo	68,27	770,00	2,90	3215,00	50,23	0,05
C. V.	0,44	0,43	0,12	1,26	1,25	0,15
Mediana	49,42	392,50	2,60	465,00	26,63	0,04
dp	19,43	192,88	0,30	861,90	33,38	0,01

C.V. – coeficiente de variação; dp – desvio padrão

As análises de sólidos da primeira etapa da pesquisa mostraram que a quantidade presente no biofiltro preenchido com pedra pomes foi muito elevada em relação aos outros biofiltros (Tabela 4), isso porque a pedra pomes se desfez, enquanto em contato com a solução, soltando uma quantidade maior de sólidos (Figura 9).

Tabela 4 Estatística descritiva da concentração de sólidos observada no efluente dos biofiltros sem inoculação dos meios suportes durante o monitoramento

	MEIOS SUPORTES					
	Argila Expandida		Pedra Pomes		Escória	
	ST	STV	ST	STV	ST	STV
Média (x)	198,3	54,2	2295,0	200,8	204,2	80,0
Mínimo	165,0	21,7	2288,3	178,3	120,0	8,3
Máximo	231,7	86,7	2301,7	223,3	288,3	151,7
C. V.	0,2	0,6	0,0	0,1	0,4	0,9
Mediana	198,3	54,2	2295,0	200,8	204,2	80,0
dp	33,3	32,5	6,7	22,5	84,2	71,7
x - 1 dp	165,0	21,7	2288,3	178,3	120,0	8,3
x + 1 dp	231,7	86,7	2301,7	223,3	288,3	151,7
Percentis						
25%	181,7	37,9	2291,7	189,6	162,1	44,2
50%	198,3	54,2	2295,0	200,8	204,2	80,0
75%	215,0	70,4	2298,3	212,1	246,2	115,8

C.V. = coeficiente de variação; dp = desvio padrão; ST = sólidos totais; STV = sólidos totais voláteis.



Figura 9 Meio suporte pedra pomes antes de ser colocada no biofiltro contendo a solução de CuSO_4 e após ser retirada da solução

Quando se compara a carga de sólidos dos biofiltros monitorados, percebe-se que o biofilme colaborou para o aumento da carga de sólidos. Para a argila expandida sem inoculação a carga média foi de $198,3 \text{ mg L}^{-1}$ e a máxima

foi de 231,7 mg L⁻¹, quando ela foi inoculada, a média foi de 495,83 mg L⁻¹ com máximo de 838,3 mg L⁻¹. Para a escória sem inoculação a carga média foi de 204,2 mg L⁻¹ e a máxima foi de 288,3 mg L⁻¹, quando a escória foi inoculada a carga de sólidos média foi de 448,61 mg L⁻¹ e a máxima de 770,0 mg L⁻¹. A argila expandida apresentou maior carga de sólidos do que a escória, o que refletiu em um efluente mais turvo.

O maior valor de DQO foi observado para o biofiltro preenchido com escória de alto forno inoculada, 3.215 mg L⁻¹, seguido pela argila expandida inoculada, 2.776,67 mg L⁻¹. Comparando-se estes valores elevados com os baixos valores da DBO, verifica-se que os meios suportes desprenderam para o meio materiais recalcitrantes que precisam receber tratamento para deixar a DQO em níveis aceitos pela legislação, que é de 180 mg L⁻¹, segundo Resolução CONAMA de 17 de março de 2005 (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005).

3.3 Avaliação da concentração de cobre

Na Figura 10, estão apresentados os resultados obtidos da análise das concentrações de cobre do efluente, durante o monitoramento dos biofiltros com os meios suportes inoculados na segunda etapa da pesquisa. No biofiltro preenchido com a argila expandida inoculada com o fungo *Cladosporium cladosporioides*, o processo de adsorção foi observado nas primeiras 2,5h, depois deste tempo foi iniciado um processo de dessorção seguido pelo processo de adsorção até o 12º dia de avaliação, após este período houve, de novo, um lento processo de dessorção. Essa dessorção representa o momento em que o sorvente passa a eliminar para a solução o produto adsorvido.

No biofiltro contendo o tubo conduíte inoculado, observou-se uma grande capacidade de adsorção pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*, sendo

a adsorção constante até o 10º dia de avaliação, quando foi iniciado um lento processo de dessorção.

No biofiltro contendo a escória de alto forno inoculada, uma adsorção durante as três primeiras horas foi observada, mas, entre 3 e 6 horas de monitoramento, foi observado um processo de dessorção. Após 6 horas de avaliação, a adsorção voltou a ocorrer, permanecendo até o 30º dia de avaliação, ocorrendo algumas dessorções neste período. No entanto, após o 30º dia iniciou-se novamente o processo de dessorção.

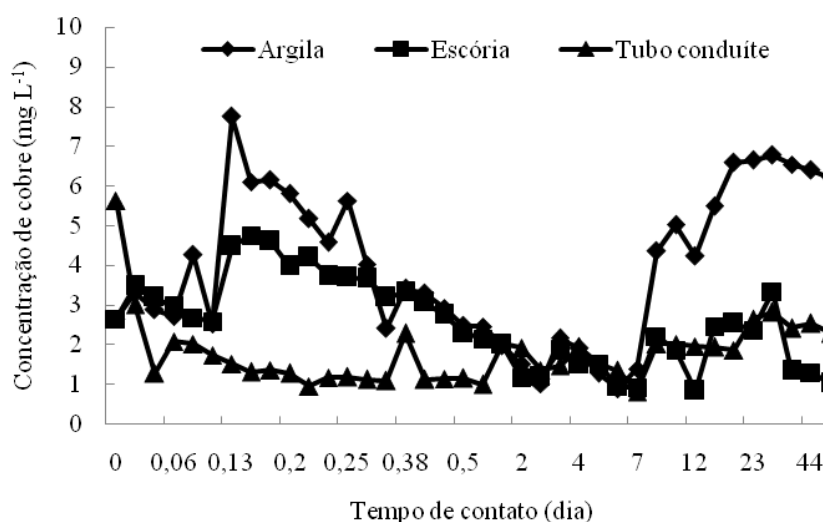


Figura 10 Concentração de cobre no líquido dos biofiltros preenchidos com os diferentes meios suportes durante o monitoramento na segunda etapa da pesquisa

O processo de dessorção não era esperado e não foi encontrada, nas literaturas pesquisadas, a ocorrência de tal fato, também não fora observado antes, um monitoramento tão prolongado ou o uso de material suporte no cultivo do fungo. Frente aos resultados obtidos, uma terceira etapa do experimento foi montada, sendo as amostras coletadas de todas as torneiras do biofiltro e misturadas, para completa homogeneização dentro dos biofiltros, formando uma

amostra composta. Nesta etapa, o pH ficou em torno de 5,0, a temperatura dentro dos reatores variou de 27 a 31 °C e a temperatura ambiente ficou entre 28 e 32 °C.

Na terceira etapa da pesquisa, durante 6 dias de monitoramento, montada para observar se o fenômeno de dessorção ocorreu por algum erro ocorrido na segunda etapa, foi observado novamente o processo de adsorção seguido de dessorção, já após o 2º dia, nos efluentes de todos os biofiltros estudados, tendo a quantidade final de cobre um valor maior que a inicial. As análises dos materiais não acusaram a presença de cobre.

Na Figura 11, está apresentado o comportamento do biofilme de *Cladosporium cladosporioides* cultivado na argila expandida. Nas primeiras 22h, foi notado o processo de biossorção de cobre pelo fungo, sendo que nos primeiros 15 minutos ocorreu mais de 40% de biossorção, mostrando que os sítios de ligação do biofilme estavam livres para receber o metal cobre. No tempo de 22 h, foi observado o valor máximo de biossorção, de 59,6%. Após este tempo, verificou-se o início de um processo de dessorção, com o elemento cobre voltando para a solução, até 48 h, quando foi observado um aumento de cobre na solução de mais de 18% da concentração inicial, como já havia acontecido na segunda etapa da pesquisa.

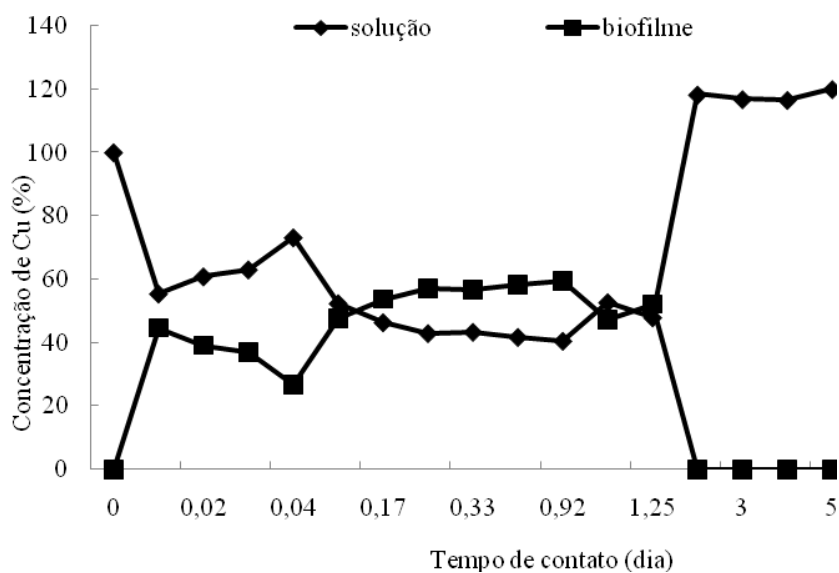


Figura 11 Concentração de cobre, em porcentagem, na solução e no biofilme de *Cladosporium cladosporioides* cultivado em argila expandida nos diferentes tempos de contato

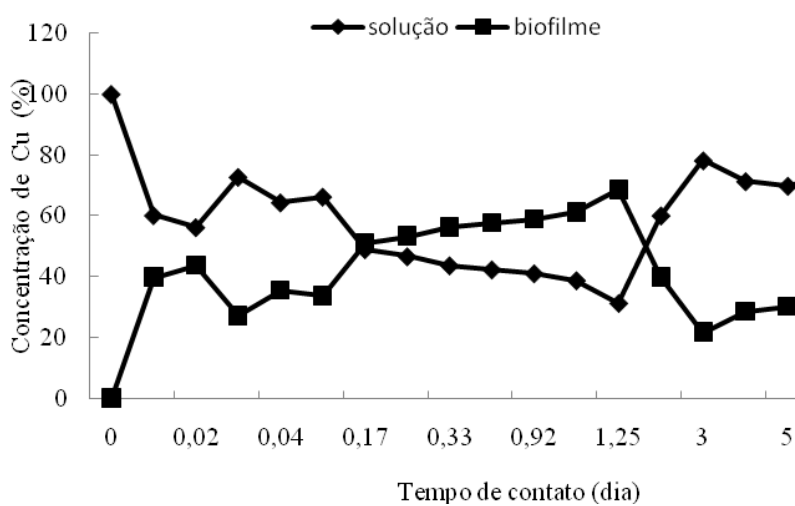


Figura 12 Concentração de cobre, em porcentagem, na solução e no biofilme de *Cladosporium cladosporioides* cultivado em escória de alto forno nos diferentes tempos de contato

No biofiltro contendo a escória de alto forno inoculada com o fungo *Cladosporium cladosporioides*, também foi observado uma adsorção maior nos primeiros 15 minutos, mas já aos 45 minutos ocorreu um processo de dessorção, até as 2 h de monitoramento, voltando a ocorrer a adsorção até 72h, quando o meio voltou a ter 78% da concentração inicial até o final do monitoramento. A bioadsorção máxima foi de 68,7%, observada no tempo de 30 horas.

Para o biofiltro contendo o biofilme de *Cladosporium cladosporioides* cultivado no tubo conduíte (Figura 13), a bioadsorção observada ficou abaixo de 50% para todos os tempos de contato, sendo que a máxima foi de 35,8%, no tempo de 22 horas. A bioadsorção ocorrida foi lenta durante todo monitoramento, sendo que, depois de 30 horas de contato, foi observada total dessorção para o meio, como ocorreu nos outros biofiltros.

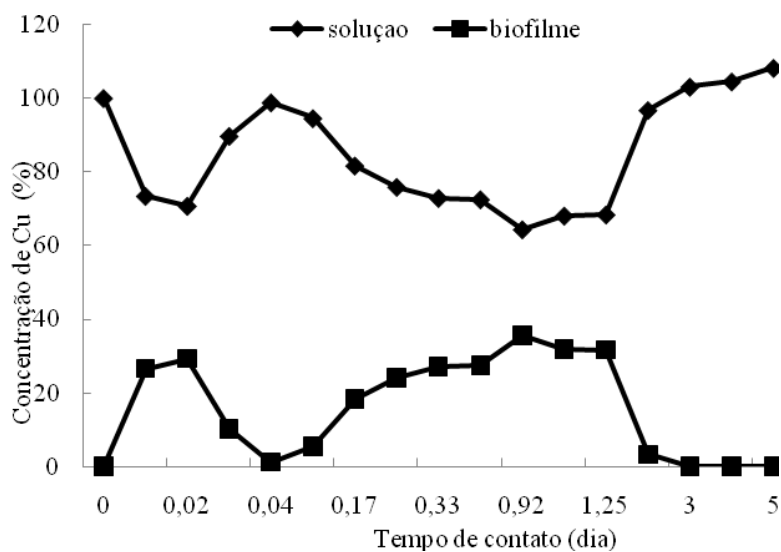


Figura 13 Concentração de cobre, em porcentagem, na solução e no biofilme de *Cladosporium cladosporioides* em tubo corrugado amarelo 5/8" nos diferentes tempos de contato

Comparando-se as concentrações de cobre nos biofilmes dos três biofiltros, percebe-se que o processo de dessorção, com todo o metal voltado para a solução, ocorreu após 30 horas de contato, sendo que no biofilme da argila expandida este processo se iniciou com 22 h de contato. Pode-se extrair das figuras 11, 12 e 13 que o biofiltro se mostrou eficiente apenas durante 30 horas, sendo que, deve ser feita, até este tempo, a retirada do efluente para posterior reúso e, após este tempo, pode-se fazer a recuperação do metal cobre. Isso mostra que o uso de biofiltros muito grandes não deve ser sugerido, uma vez que será trabalhoso retirar e recuperar o cobre após este tempo.

Say, Denizli e Arica (2001) ao avaliarem a biossorção de cádmio, chumbo e cobre pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* verificaram que os tempos de biossorção foram obtidos pelo decréscimo da concentração dos metais na solução, sendo que mais de 60% de todos os metais foram adsorvidos no tempo inicial de 2h e o nível de saturação foi gradualmente atingido até 6h para todos os metais estudados.

Souza et al. (2004), ao tratar a água residuária de uma indústria de nitrocelulose, usando *Aspergillus* 2BNL1, em um biorreator de air-lift, cujo tratamento durou 120h, verificaram que a descolorização foi mais rápida nas primeiras 24 h, estabilizando após 48 h, quando a máxima velocidade de descoloração foi atingida.

Kapoor, Viraraghavan e Cullimore (1999), ao estudarem a remoção dos metais chumbo, cádmio, cobre e níquel pelo fungo *Aspergillus Níger*, observaram que pouca ou nenhuma biossorção ocorreu para os metais chumbo, cádmio e cobre em 8 h em pH 3,0, observaram ainda que o equilíbrio de biossorção de chumbo e cádmio ocorreu em 5 h com pH 4,0 e 5,0, para o cobre ocorreu em 6 h com pH de 4,0 e 5,0 e para o níquel, o equilíbrio de biossorção ocorreu em 8 h para os valores de pH de 5,0, 6,0 e 7,0. Observaram ainda que a primeira fase da biossorção, quando o processo é mais rápido, durou de 30 a 45

minutos, enquanto a segunda fase, em que o processo é mais lento e ocorre a bioissorção total do metal, foi até 2 h.

3.4 Análises de microscopia

As eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura indicaram que o fungo, após mais de 30 dias dentro dos biofiltros, apenas com o nutriente da inoculação e sem receber nutriente suplementar, ainda mantinha a estrutura das hifas e dos esporos.

Na Figura 14, estão apresentadas as eletromicrografias de varredura do sulfato de cobre, sendo que as figuras A e B representam os cristais de sulfato de cobre e as figuras C e D representam o sulfato de cobre em solução. Percebe-se que, após ser imerso em líquido, os cristais se dissolvem, não sendo possível, portanto, visualizar os cristais de cobre sobre as hifas e os esporos do fungo.

O desenvolvimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*, antes de ser colocado nos biofiltros em contato com a solução de sulfato de cobre 20 mg L⁻¹ é mostrado na Figura 15. Se comparado com o fungo desenvolvido nos MS argila expandida (Figura 16), escória de alto forno (Figura 17) e tubo corrugado amarelo 5/8" (Figura 18), após imersão na solução de 20 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, não se pode observar diferenças nas suas estruturas, o que implica em dizer que seu desenvolvimento não foi afetado pela solução.

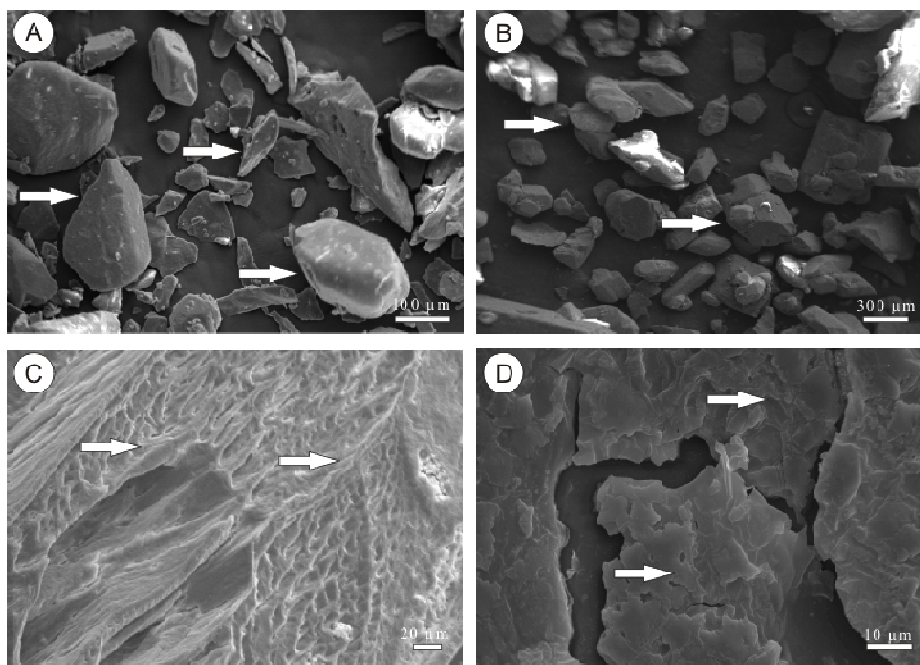


Figura 14 Eletromicrografia de varredura do reagente sulfato de cobre (A e B) e do reagente sulfato de cobre diluído na concentração de 20 mg L^{-1} . A e B representam os cristais de sulfato de cobre (setas indicam os cristais de cobre) e C e D representam o sulfato de cobre em solução (setas indicam o cobre em solução)

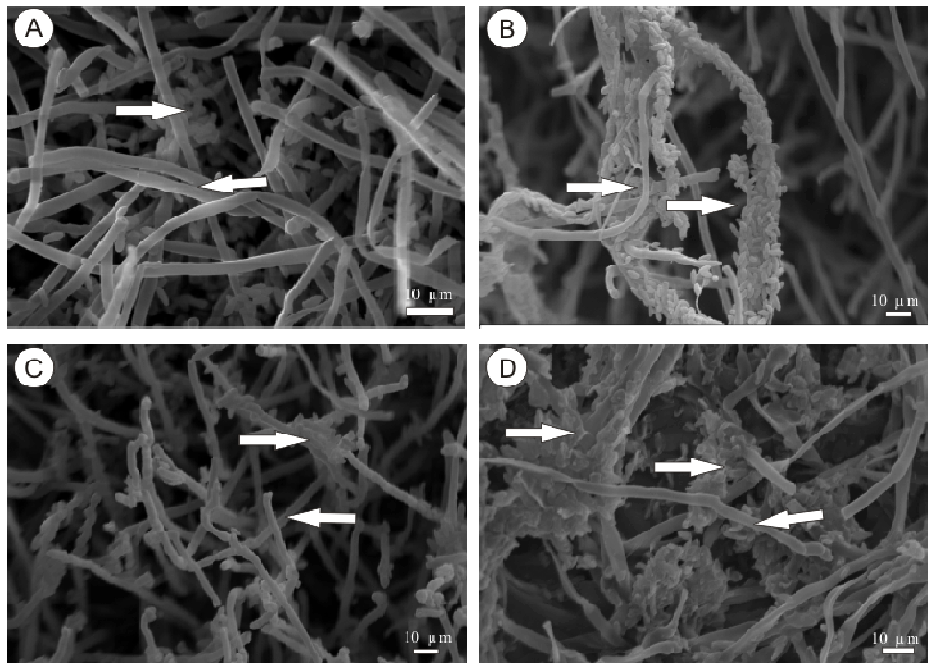


Figura 15 Eletromicrografia de varredura do fungo *Cladosporium cladosporioides* antes de ser mergulhado em solução de sulfato de cobre. Setas para a direita indicam esporos e setas para a esquerda indicam hifas

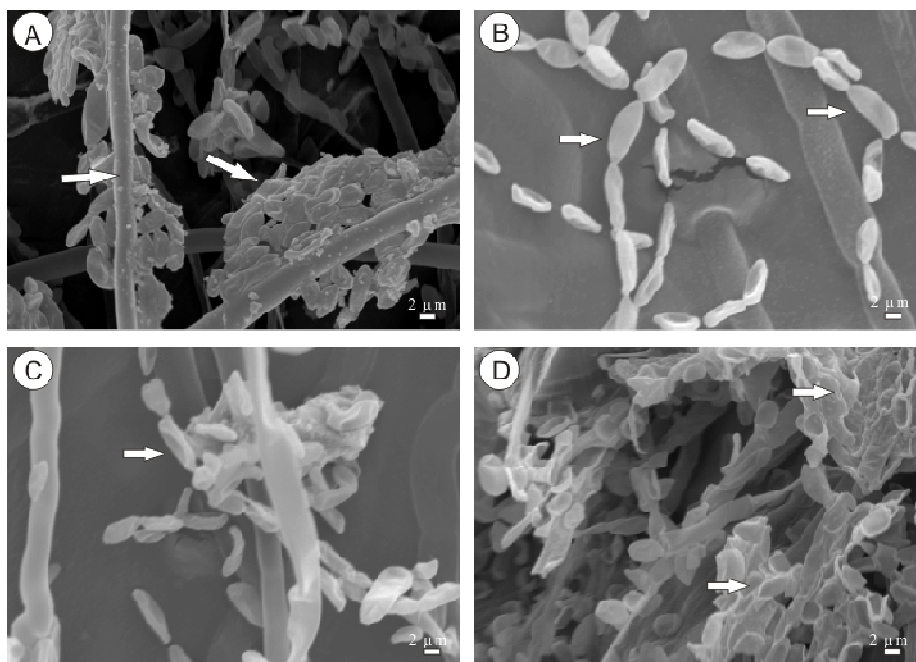


Figura 16 Eletromicrografia de varredura do fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado no meio suporte argila expandida depois do contato com a solução de sulfato de cobre por 60 dias na concentração de 20 mg L^{-1} . Setas indicam esporos

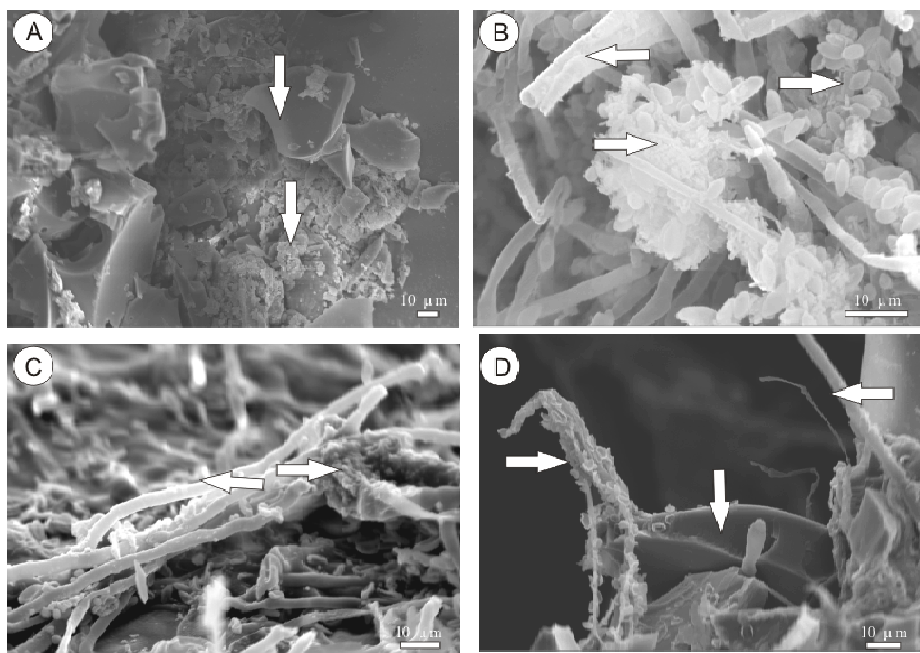


Figura 17 Eletromicrografia de varredura do fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado no meio suporte escória de alto forno depois do contato com a solução de sulfato de cobre na concentração de 20 mg L⁻¹ por 60 dias. Setas para a direita indicam esporos, setas para a esquerda indicam hifas e setas para baixo indicam o meio suporte

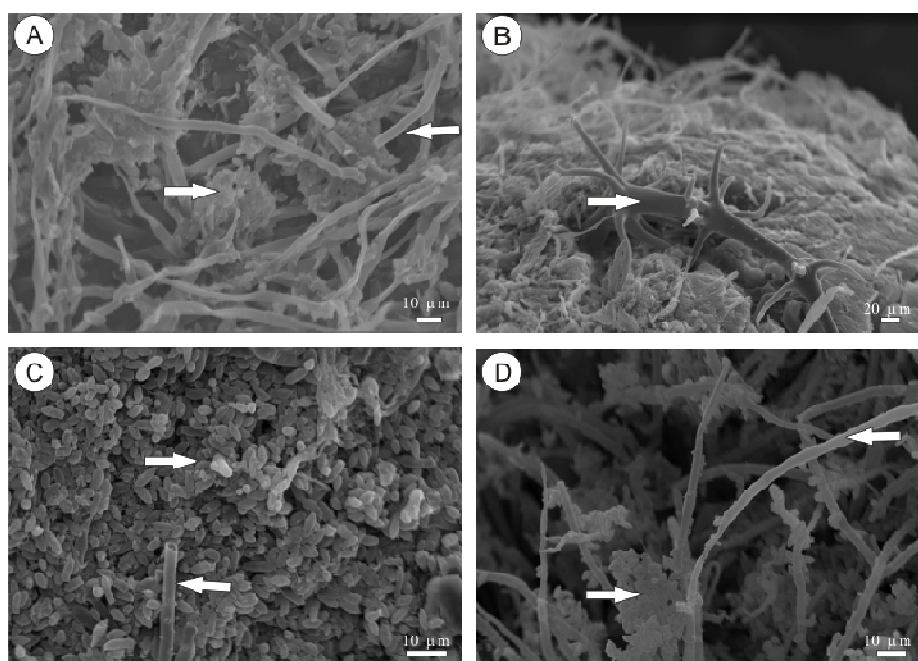


Figura 18 Eletromicrografia de varredura do fungo *Cladosporium cladosporioides* inoculado no meio suporte tubo corrugado amarelo 5/8” depois do contato com a solução de sulfato de cobre na concentração de 20 mg L^{-1} por 48 dias. Setas para a direita indicam esporos, setas para a esquerda indicam hifas

3.5 Avaliação microbiológica

Os microrganismos isolados das amostras coletadas, desenvolvidos em meio solidificado BDA e CYA apresentaram-se em sua totalidade por fungos, mesmo nas placas em que foi adicionado antibiótico ao meio. Nas placas, cresceram fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, houve também o crescimento de fungos leveduriformes. Dentro dos biofiltros não foi verificado o crescimento desses fungos, estima-se que possam ser provenientes dos biofiltros, porém pela grande concentração de *Cladosporium cladosporioides*, tornando-o dominante nos biofiltros, o

desenvolvimento dos demais fungos tenha sido restringido, só se tornando viáveis após o isolamento e o contato com o meio nutriente necessário.

4 CONCLUSÕES

A bioissorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* cultivado nos meios suportes argila expandida, escória de alto forno e tubo corrugado amarelo 5/8", dentro dos biofiltros desenvolvidos, se mostrou eficiente durante um período de 30 horas, sendo que, após esse tempo, é necessário que se faça o esvaziamento e se proceda à recuperação do metal.

O meio suporte escória de alto forno apresentou melhor aderência do biofilme, além de permitir plena colonização do fungo. Foi também o meio suporte que apresentou melhores resultados para a adsorção de cobre, com bioissorção máxima de 68,7%.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 1998.

BRANDÃO, V. S. et al. Tratamento de águas residuárias da suinocultura utilizando-se filtros orgânicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 327-333, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.º 76, de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 nov. 1986. Seção 1, pt 2.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Polytécnica, 1997. 379 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 357, de 18 de março de 2005. **Resoluções**. Brasília, 2005.

FRANCO, L. O. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 243-247, 2004.

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

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus Níger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, p. 95-104, 1999.

LAPA, K. R. et al. **Avaliação de Desempenho do Reator Anaeróbio Operado em Batelada Seqüencial (ASBR), contendo biomassa imobilizada em pedra pome, no tratamento de esgoto sanitário**. 2004. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t319.doc>. Acesso em: 22 maio 2010.

LOURENÇO, A. M. P. **Desempenho de um sistema composto de reator UASB, filtro anaeróbio e lagoa aerada facultativa para o tratamento das águas residuárias da suinocultura**. 2006. 129 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

LUIZ, F. A. R. **Desempenho de reatores anaeróbios de leito fixo no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro**. 2007. 132 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

NUHOGLU, Y. et al. The removal of Cu (II) from aqueous solutions by *Ulothrix zonata*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 85, p. 331-333, 2002.

SAMSON, R. A. et al. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 1, p. 23-43, 2004.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, p. 67-70, 2001.

SILVA, V. G. da. **Monitoramento de parâmetros físicos, químicos e biológicos em um reator anaeróbio híbrido (RAH) em escala piloto, tratando água residuária do café processado por via úmida**. 2007. 170 p. Dissertação (Mestrado Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SOUZA, H. B. **Guia técnico de coleta de amostras por Helga Bernhard de Souza e José Carlos Derísio**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1977. 254 p.

SOUZA, J. V. B. et al. Fungal treatment of a delignification effluent from a nitrocellulose industry. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 1936-1942, 2005.

SOUZA, J. V. B. et al. Treatment of delignification effluent with *Aspergillus* 2BNL1 and optimization of biomass production. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 2, p. 391-394, 2004.

SRIVASTAVA, N. K.; MAJUMDER, C. B. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. Review. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, p. 1-8, 2008.

SWAMY, J.; RAMSAY, A. The evaluation of White rot fungi in decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, p. 130-137, 1999.

VEIT, M. T. et al. Biossorção de níquel e cromo de um efluente de galvanoplastia utilizando alga marinha pré-tratada em coluna. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 175-183, 2009.