

BIOSORÇÃO NO TRATAMENTO FINAL DE EFLUENTES RICOS EM CRÓMIO

M. TERESA TAVARES¹⁾, CLÁUDIA TORRES²⁾

RESUMO

O objectivo deste trabalho é a definição e o desenvolvimento de um sistema de biosorção, alternativo e economicamente competitivo com os processos físico-químicos clássicos de remoção de metais pesados em soluções aquosas pouco concentradas. Com base na capacidade de alguns microorganismos, mortos ou vivos, concentrarem metais pesados, procedeu-se ao estudo da aplicação de sistemas de biosorção na remediação de soluções aquosas de crómio hexavalente. Realizaram-se estudos comparativos de limite de toxicidade de diferentes iões metálicos em relação a diferentes bactérias. Fez-se a adaptação de algumas dessas bactérias a meios sucessivamente mais ricos em Cr (VI) e caracterizou-se a respectiva capacidade de redução da forma hexavalente à forma trivalente. Procedeu-se ao isolamento de um consórcio de microorganismos presentes em lamas de ETAR's receptoras de efluentes ricos em crómio e repetiram-se os ensaios anteriores para efeitos comparativos. As bactérias mais resistentes ao meio xenobiótico e mais eficazes na remoção do ião metálico foram suportadas em carvão activado granular, GAC. A capacidade de adsorção do suporte também foi caracterizada pois, se bem que o GAC não seja vulgarmente utilizado na remoção de metais pesados, é um excelente suporte para o biofilme e certamente terá alguma responsabilidade na retenção do crómio.

PALAVRAS-CHAVE: Biosorção; Crómio Hexavalente; Metais Pesados

INTRODUÇÃO

Na região onde se encontra sediada a nossa instituição existem muitas pequenas e médias unidades industriais da área da galvanoplastia

¹⁾ Prof. Auxiliar, Dep. de Engenharia Biológica, Univ. do Minho

Tel: 053-604410, Fax: 053-604413, email: ttavares@ei.uminho.pt

²⁾ Estudante de Mestrado em Engenharia Biológica, Univ. do Minho

Tel: 053-604400, Fax: 053-604413

e acabamentos metálicos, da área do tratamento de curtumes e ainda outras de actividades diversas que utilizam compostos de crómio no seu processo. A presença de crómio, nos diferentes estados de oxidação, e de outros metais pesados nos efluentes líquidos destas indústrias, assim como nos lixiviados das lixeiras municipais e nos lixiviados de instalações mineiras constitui ainda um dos problemas graves que se colocam em termos de protecção ambiental.

Algumas destas unidades tentam cumprir a legislação nacional no que respeita à concentração máximas de metais pesados nos seus efluentes líquidos por recurso aos processos físico-químicos tradicionais (Mahajan, 1989) mas, se bem que estes sejam de elevada eficácia, tornam-se especialmente onerosos quando aplicados ao tratamento de efluentes com baixas concentrações metálicas, da ordem de poucas dezenas de mg.l^{-1} (Eckenfelder, 1989).

Tendo sido reconhecida a capacidade de alguns microorganismos concentrarem certos metais, considerou-se a biosorção, definida como o sequestro de iões metálicos por parte de materiais sólidos de origem natural (Volesky, 1986), como processo alternativo à remoção de metais. Existem já em funcionamento alguns sistemas de biosorção que fazem a remoção de concentrações baixas de alguns metais (Mattvschka e Straube, 1993). Os microorganismos a utilizar podem estar metabolicamente inactivos (resíduos de indústrias de fermentação) mantendo-se capazes de reterem os iões metálicos (Tsezos, 1980).

Os mecanismos de acumulação dos metais dentro das células e nas suas camadas externas foram recentemente revistos (Novais, 1992). A aplicação destes mecanismos à remoção e recuperação de iões valiosos foi, também, analisada (Ross, 1989). Ambos os autores defendem a necessidade de se aprofundarem os estudos existentes, quer sob o ponto de vista mecanístico quer sob o ponto de vista de aplicação industrial.

Considerando o efeito tóxico que os metais têm nos microorganismos, vários estudos têm sido feitos no sentido de definir as condições em que bactérias, algas e fungos toleram aqueles elementos (Gadd, 1990; Gadd, 1993). Sabe-se, no entanto, que para o mercúrio, cádmio e zinco a razão entre a massa de metal acumulado no biosistema e a massa de metal presente na fase aquosa que o rodeia pode atingir valores entre 4000 e 10000 (Cheng *et al.*, 1975),

Vários grupos têm vindo a trabalhar em biosorção de metais. O grupo do Prof. Schinner da Universidade de Innsbruck, com quem o grupo da Universidade do Minho mantém estreita colaboração nesta área, apresentou no Simpósio da FEMS (Federation of European Microbiological Society) de 1993 e intitulado Metais, Microorganismos - Relações e Aplicações, um estudo sobre o enriquecimento em crómio de um fungo, *Mucor sp.* MP/93/3/4, (Pümpel e Schinner, 1993). Estes autores estão a desenvolver um modelo descritivo do enriquecimento metálico do microorganismo.

No Sexto Congresso Europeu de Biotecnologia que decorreu em Florença apareceram relatórios de vários trabalhos de biosorção: magnésio (Ercole *et al.*, 1993), cobre, cádmio e mercúrio (Dave *et al.*, 1993), cobre e chumbo (Marques *et al.*, 1993), zinco, chumbo e prata (Fourest *et al.*, 1993), cádmio e chumbo (Ekiz *et al.*, 1993). Este interesse por parte dos investigadores internacionais e nacionais é indiciador do interesse científico e industrial do tema.

As águas residuais industriais são geralmente um cocktail de produtos químicos orgânicos e inorgânicos, sendo os metais pesados somente alguns dos seus constituintes. Será uma vantagem processual a co-extracção de vários elementos poluentes. Em consequência, torna-se interessante a utilização de carvão activado granular (GAC) como suporte do biofilme. O GAC não é por si só um adsorvente eficiente de metais pesados, mas é utilizado vulgarmente na remoção de compostos orgânicos. Por outro lado, as bactérias constituem um grupo particularmente interessante pois excretam uma grande quantidade de polissacáridos de composição polimérica, formando um extenso e coeso filme. Um biofilme bacteriano suportado em GAC constitui um sistema combinado que explora a capacidade de retenção de metais por parte do biofilme e a capacidade de fixação de poluentes orgânicos por parte do carvão activado (Scott e Karanjkar, 1994).

As bactérias usadas vulgarmente nos estudos laboratoriais de biosorção são de colecção (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*,...). Um dos objectivos deste trabalho consiste no isolamento de espécies bacterianas presentes nas lamas de ETAR's receptoras de efluentes ricos em metais pesados e que tenham ganho resistência à presença daqueles elementos (Baldi *et al.*, 1990). As bactérias assim isoladas serão utilizadas em sistemas de biosorção numa base comparativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Sistemas Batch

As bactérias usadas nesta primeira fase do trabalho foram a *Pseudomonas fluorescens*, a *Pseudomonas putida* e a *Escherichia coli* da Spanish Type Culture Collection. Foram inoculadas em erlenmeyers de 500 ml com dois tipos de meio de crescimento. O primeiro consistiu numa solução aquosa de sais mínimos (125 ml) - NH₄Cl (10g), NH₄NO₃ (2g), Na₂SO₄ (4g), K₂HPO₄ (6g), KH₂PO₄ (2g), MgSO₄.7H₂O (0.2g), dH₂O (500 ml); glucose 20% (5 ml); dH₂O (370 ml). O segundo meio utilizado é composto de extracto de levedura (0.5% w/v), glucose (2% w/v) e peptona (1% w/v). Antes da

inoculação adicionou-se $K_2Cr_2O_7$ aos meios líquidos de crescimento e as concentrações de Cr (VI) resultantes variaram entre 4 e 25 $mg.l^{-1}$. O pH manteve-se constante em 7.2, com NaOH ou H_2SO_4 . As culturas foram mantidas por períodos que variaram entre 6 e 24 horas, numa incubadora orbital, 200 rpm, a 27°C para as *Pseudomonas* e a 37°C para a *Escherichia*. A *Pseudomonas fluorescens* tem vindo a ser adaptada à presença de Cr (VI), por repicagens sucessivas entre meio líquido e meio sólido que contém concentrações crescentes daquele ião, desde 2 a 100 ppm.

Um consórcio de microorganismos resistente ao Cr (VI) foi isolado de lamas residuais de uma ETAR receptora de efluentes ricos em crómio. As lamas foram diluídas em erlenmeyers de 500 ml com 100, 200 e 300 $mg.l^{-1}$ de Cr (VI). O meio de cultura foi composto de extracto de levedura, peptona e glucose como nos ensaios anteriores e, após alguns dias de incubação, a viabilidade dos microorganismos mais resistentes foi confirmada por sementeira em placas de Petri com nutriente agar.

A concentração de Cr (VI) no sobrenadante das amostras centrifugadas foi determinada pelo método colorimétrico da difenilcarbazida e um espectrofotómetro JASCO 7850 a 540 nm. A concentração total de Cr foi determinada por Espectrometria de Absorção Atómica (VARIAN SPECTRA AA- 250 PLUS), após exposição das amostras a radiação ultra-violeta e centrifugação.

Sistemas Contínuos

O suporte para o biofilme utilizado foi carvão activado granular com um diâmetro médio de partícula 1.5 mm, uma massa específica 2.34 $g.cm^{-3}$, uma área específica de Langmuir de 1270 $m^2.g^{-1}$ e um diâmetro médio de poros de 20 angstrom.

Utilizaram-se colunas com 30 cm de altura e 0.9 cm de diâmetro. Foram parcialmente preenchidas com GAC e diferentes suspensões bacterianas (*Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter viscosus* e um consórcio de microorganismos isolados de lamas ricas em Cr) passaram através desse leito, ligeiramente expandido, em fases distintas do seu crescimento e com diferentes tempos de retenção. Procedeu-se à optimização da adesão e crescimento do biofilme, fazendo passar meio de crescimento através da coluna durante dois dias completos ao que se seguiu a passagem de soluções de crómio hexavalente com concentrações inferiores a 100 $mg.l^{-1}$. Sistemáticamente foi feito o doseamento de Cr total e Cr^{6+} pelos métodos anteriormente referidos.

Amostras de GAC com biofilme e metal fixado foram, então, observadas por Microscopia Electrónica de Varrimento (Leica S 320) e fez-se análise elementar a várias profundidades, por Espectrometria de Dispersão de Energias. As amostras a serem observadas foram preparadas, para fixação

da biomassa, com glutaraldeído (5%) e tampão cacodilato (0.1M), seguido de desidratação com série de soluções de etanol com concentrações crescentes e secagem em exsiccador durante alguns dias.

Foram também realizados estudos semelhantes de adsorção do ião crómio em colunas de GAC, sem biofilme, a fim de se quantificar a participação do adsorvente no processo global. Realizaram-se isotérmicas de adsorção: 5g de GAC foram colocados em contacto com 200 ml de soluções de Cr (VI), com concentrações entre 40 e 1000 mg.l⁻¹. As soluções com o carvão eram, então, colocadas em erlenmeyers, em agitação lenta e temperatura fixa, durante vários dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toxicidade e redução do ião metálico

A determinação do limite de toxicidade do crómio em relação a alguns microorganismos teve como objectivo a selecção do melhor biosistema, entre aqueles que são conhecidos como bons excretores de polissacáridos, para a remoção do metal. A Tab. I demonstra que os microorganismos testados em sistema batch são capazes de sobreviver a concentrações baixas de Cr⁶⁺ e que são capazes de o remover da solução ou, eventualmente reduzir a forma hexavalente à forma trivalente. De facto, verificou-se que a concentração total do metal manteve-se constante ao longo dos ensaios, donde se concluiu que não houve fixação do ião, mas sim redução. O consórcio de microorganismos isolado das lammas de uma ETAR receptora de efluentes industriais ricos em crómio, que já tinham sido expostos a 300 mg.l⁻¹ de Cr (VI) e sobrevivido, revelaram-se óptimos redutores do ião na sua forma mais tóxica. A *Escherichia coli* também foi testada nestes ensaios mas não sobreviveu ao meio xenobiótico. A *Pseudomonas fluorescens*, assim como a *Arthrobacter viscosus* adquirida em fase posterior aos ensaios que originaram a Tab. I, têm vindo a ser adaptadas a concentrações crescentes de crómio por culturas alternadas entre meio líquido e meio sólido, deficientes em nutrientes.

Adsorção em GAC

Como poderoso adsorvente, o carvão activado participa certamente na fixação do ião metálico, mesmo que o processo de retenção principal seja

Tabela I - Comportamento de diferentes microorganismos na presença de Cr (VI).

Microorganismo	Conc. inicial de Cr (VI) (mg.l ⁻¹)	Redução (%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.3	82.5
	11.4	74.8
	26.9	58.7
<i>Pseudomonas putida</i>	3.8	10.5
	10.8	3.7
	24.6	0.8
Consórcio de microorganismos	4.2	98.5
	10.8	95.8
	25.2	---
	103.0	79.0

promovido pelo biofilme suportado no GAC, nos sistemas de biosorção adiante referidos. A eficiência de retenção de Cr (VI) por uma coluna de carvão activado semelhante às utilizadas nos sistemas de biosorção não ultrapassou os 32%, para uma concentração do afluente de 50 mg.l⁻¹ e um tempo de retenção já otimizado de 0.46 min. Fez-se uma pré-lavagem do carvão com uma solução concentrada de NaOH a fim de manter a força iónica do sistema, aumentando a concentração de iões H⁺ na superfície do suporte e implementando a fixação das espécies metálicas aniónicas, como seja o ião dicromato. A isotérmica de adsorção determinada a 27 °C, indica uma fixação máxima de 140 mg de Cr (VI) / g GAC, correspondente a uma concentração de 1000 mg.l⁻¹ na fase aquosa.

Ensaio de biosorção

A adesão dos biofilmes de *Arthrobacter viscosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* e consórcio de microorganismos está a ser otimizada por aumento do tempo de contacto, introdução de recirculação da suspensão através da coluna, comparação das diferentes fases de crescimento aquando da abertura do sistema e por utilização de culturas com meios deficientes de crescimento a fim de induzir a produção de polissacáridos que implementarão a fixação do biofilme, a fixação dos iões metálicos e mesmo a protecção das células da solução xenobiótica a tratar. Estas medidas

Tabela II - Eficiência da remoção de crómio total por um sistema de biosorção para diferentes caudais e concentrações iniciais da solução metálica.

Caudal ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$)	7	15	25	31
Concentração ($4\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	87%	74%	61%	58%
Concentração ($10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	-	68%	-	-
Concentração ($20\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	-	60%	-	-

indicam um tempo de residência óptimo de 20 segundos.

O biofilme deve ser formado durante a fase exponencial do crescimento e não durante a fase estacionária pois a resistência ao destacamento do suporte por lavagem do sistema com água passa de 6 para 4 horas. Numa primeira fase, realizaram-se ensaios com concentrações mais baixas do metal, entre 4 e 20 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, a serem alimentadas a uma sistema com biofilme de *Pseudomonas fluorescens*, Tab. II. Verificou-se que o tempo de residência tem dois efeitos contrários eficiência da remoção metálica: um maior tempo de contacto aumenta a possibilidade de fixação do metal, mas também aumenta o efeito xenobiótico na viabilidade do biofilme, como se verifica pelo destacamento mais rápido do biofilme quando se utilizam caudais reduzidos do afluente a tratar.

A fig.1 apresenta os resultados de um ensaio com uma concentração inicial de 4 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ e um caudal de 7 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ da solução de crómio. Cinquenta minutos foram suficientes para atingir o estado estacionário de 0.5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cr total na corrente de saída. Ao fim desse tempo detectou-se a presença de Cr (VI), que atingiu um concentração constante de 0.13 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Comportamentos semelhantes se verificaram com outros ensaios a caudais e concentrações iniciais diferentes, diminuindo o período inicial transiente com o aumento do caudal. Verifica-se que ocorre sempre uma grande remoção da quantidade inicial do ião, que ocorre redução parcial do Cr^{6+} a Cr^{3+} e que é possível atingir um estado estacionário neste processo.

Nas fig.2 e fig. 3 descrevem-se ensaios realizados com concentrações mais elevadas de crómio hexavalente, 40 e 100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, com biofilmes de *Arthrobacter viscosus* e *Escherichia coli*. Verifica-se que, para ambos os biofilmes, a remoção é reduzida a 20 e 10% respectivamente, quando se atinge o estado estacionário. Se bem que o tratamento de soluções com concentrações da ordem das centenas de $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ não estejam dentro dos objectivos deste projecto, verifica-se um espaço possível de optimização do biofilme, sobretudo no que respeita á maximização da produção da rede polissacárida, e no pré-tratamento térmico do sistema suporte/biofilme

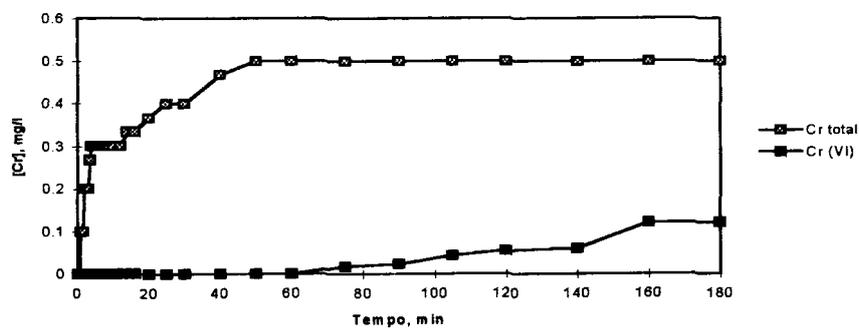


Figura 1 - Cr total e hexavalente no efluente de uma coluna de biosorção.

anterior ao contacto com a solução metálica que prevê-se que implemente a eficácia da remoção do ião crómio. Finalmente importa dizer que a análise com EDS das amostras de GAC/Cr e GAC/Biofilme/Cr revelam uma maior fixação do metal no segundo caso como se concluiu por uma maior razão de sinais de crómio entre doseamentos a duas profundidades distintas, 1.7µm e 8.5 µm.

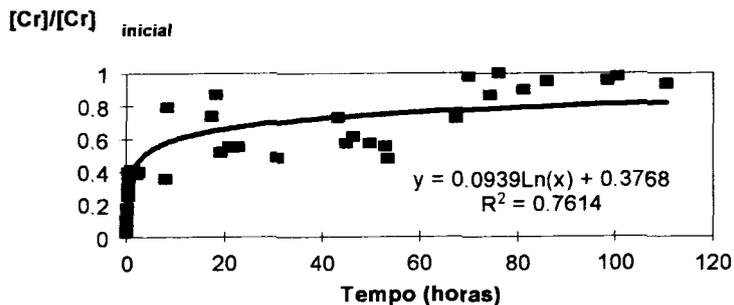


Fig.2 - Concentração de Cr total, normalizada, á saída de uma coluna de biosorção, com *Arthrobacter viscosus*; Cr inicial=40 ppm.

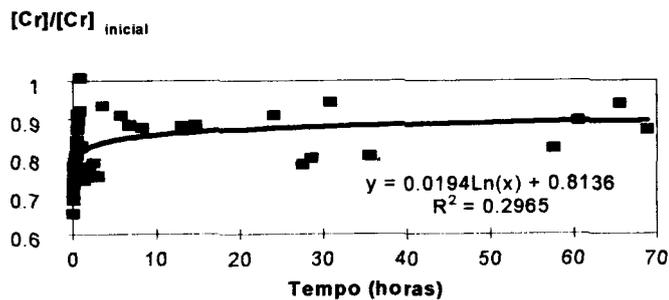


Fig.3 - Concentração de Cr total, normalizada, á saída de uma coluna de biosorção, com *Escherichia coli*, Cr inicial = 100ppm

CONCLUSÕES

Este trabalho reporta os resultados preliminares de definição e desenvolvimento de um sistema de biosorção que reduza a valores legais a concentração final de crómio nos efluentes líquidos industriais e municipais. Concluiu-se que: i) existem microorganismos que desenvolvem resistência ao efeito xenobiótico do ião metálico e que essa resistência pode ser induzida; ii) alguns desses microorganismos reduzem Cr(VI) a Cr(III); iii) determinou-se a participação do suporte no processo global de fixação do ião; iv) o biofilme suportado realiza a remoção do metal, estando em estudo a optimização da adesão dos biofilmes e dos parâmetros de biosorção.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é financiado pela JNICT, projecto: PEAM/TAI/261/93, e pelo Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldi, F., Vaughan, A.M., Olson, G., 1990, "Chromium VI-Resistant Yeast Isolated from Sewage Treatment Plant Receiving Tannery Wastes", *Applied and Environmental Microbiology*, 4, 913-918.

Cheng, M.H., Patterson, J.W., Minear, R.A., 1975, *JWPCF*, 47, 362.

Dave S.R., Patel, R.J., Patwari, R.A., 1993, "Biosorption of Cadmium, Copper and Mercury by *Pseudomonas sp.*", Proceedings of the Sixth European Congress on Biotechnology, L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (Eds.), Elsevier.

Eckenfelder, W.W., 1989, *Industrial Water Pollution Control*, NY McGraw-Hill Book Company, pp. 98-110.

Ekiz, H.I., Oser, D., Oser, A., Kutsal, T., Çağlar, A., 1993, "Cadmium (II) Biosorption by *Cladophora crispata* and *Rhizopus arrhizus*", Proceedings of the Sixth European Congress on Biotechnology, L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (Eds.), Elsevier.

Ercole, C., Patrizio, D., Tettamanti, E., Lepidi, A., 1993, "Technological and Environmental Concerns of Mn²⁺ Biosorption/Desorption by Microorganisms",

Proceedings of the Sixth European Congress on Biotechnology, L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (Eds.), Elsevier.

Fourest, E., Canal, C., Roux, J.C., 1993, "Water Dissolved Heavy Metal Sorption by *Rhizopus arrhizus* Dead Biomass. Scatchard Modelling of the Accumulation Isotherms with pH Stabilization", Proceedings of the Sixth European Congress on Biotechnology, L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (Eds.), Elsevier.

Gadd, G.M., 1990, *Microbiology of Extreme Environments*, C. Edwards, ed., Milton Keynes: Open University Press, pp. 178-210.

Gadd, G.M., 1993, "Interactions of Fungi with Toxic Metals", *New Phytol.*, 124, 25-60.

Mahajan, S.P., 1989, *Pollution Control in Process Industries*, Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, pp. 82-89.

Marques, P.A.S.S., Rosa, M.F., Fernandes, H.M., Tomé, M.M., Sá Correia, I., Novais, J.M., 1993, "Metal Ion Removal by Waste Biomass", Proceedings of the Sixth European Congress on Biotechnology, L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (Eds.), Elsevier.

Mattvschka, B., Straube, G., 1993, "Biosorption of Metals by Waste Biomass", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 58, 57-63.

Novais, J.M., 1992, *Profiles in Biotechnology*, T.G. Villa, J. Abalde (Eds.), Universidade de Santiago de Compostela, 367-375.

Pümpel, T., Schinner, F., 1993, "Native Fungal Pellets as Biosorbents for Heavy Metals", *FEMS Microbiol. Reviews*, 11, 159-164.

Ross, I.S., 1989, *Resources and Applications of Biotechnology: The New Wave*, R. Greenshields (Ed.), Stockton Press, 100-109.

Scott, J.A., Karanjkar, A.M., 1993, "Decontamination Biosorption to Concentrate Metals on Granular Activated Carbon - Influence of pH and Temperature and use of this Material to Adsorb Chloroform", Proceedings of the Sixth European Congress on Biotechnology, L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi (Eds.), Elsevier.

Tsezos, M., 1980, *Biosorption of Uranium and Thorium*, Ph.D. Thesis, McGill University, Montreal.

Volesky, B., 1986, "Biosorbent Materials", *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, 16, 121-126