

## Capítulo 2- Estado da Arte

### 2.1- Introdução

O desenvolvimento tecnológico arrasta consigo vários problemas de cariz ambiental. Os efluentes industriais são, neste contexto, um problema particular pois a Natureza não os assimila facilmente. A contaminação por metais pesados e/ou por compostos orgânicos de ecossistemas aquáticos ou terrestres assume grande importância e a pesquisa de novas tecnologias para o tratamento dos mesmos tem sido fortemente incentivada.

A poluição de um meio aquático causa alterações nas características físicas (turbidez, cor, temperatura, viscosidade, tensão superficial), químicas (carência química de oxigénio, pH, acidez, alcalinidade, oxigénio dissolvido, nível de toxicidade, nutrientes) e biológicas, que comprometem a qualidade da água (Barros *et al.*, 2007). Entre os vários contaminantes, os metais pesados e os compostos orgânicos recebem especial atenção, já que são extremamente tóxicos para uma variedade de organismos, mesmo a muito baixas concentrações.

A existência de uma política ambiental cada vez mais restritiva obriga ao desenvolvimento de sistemas de remoção de metais pesados que visem a redução e a reutilização dos mesmos.

Como já foi referido no capítulo anterior, o facto dos processos tradicionalmente utilizados na remoção de metais pesados apresentarem limitações tanto a nível tecnológico como a nível económico, levou à procura de novas tecnologias. Neste contexto surge a biossorção.

A biossorção é um processo pelo qual certos tipos de microrganismos, vivos ou mortos, podem sequestrar ou concentrar metais pesados a partir de soluções aquosas (Naja e Volesky, 2006). Os mecanismos de biossorção podem envolver absorção intracelular, armazenamento activo via sistemas de transporte, ligação à superfície ou alguns mecanismos indefinidos. As características químicas e biológicas destes processos de retenção são importantes para o entendimento do papel dos iões metálicos nas funções celulares básicas e também para a determinação da forma mais eficaz de aplicação destes processos na desintoxificação de efluentes industriais poluídos com metais pesados com recurso a biomassa (Prado Acosta *et al.*, 2005). Estes processos têm um papel muito importante na remoção dos metais pesados de soluções aquosas, particularmente no tratamento de grandes volumes de soluções diluídas (Ferraz *et al.*, 2004) e são usados

também na recuperação de metais preciosos como sejam a prata e o ouro (Martins *et al.*, 2004). As principais vantagens destes processos incluem baixos custos de operação, minimização do volume de químicos e/ou lamas a depositar e alta eficiência na desintoxificação de efluentes diluídos (Tunali *et al.*, 2005). Os microrganismos têm um elevado rácio área superficial por volume devido ao seu reduzido tamanho e, conseqüentemente, podem providenciar uma larga superfície de contacto, a qual pode interagir com os metais do meio envolvente (Zouboulis *et al.*, 2004).

As propriedades físicas e químicas do carvão activado fazem dele um poderoso adsorvente. A sua utilização na remoção de metais pesados tem sido estudada por diversos grupos de investigação (Gil *et al.*, 2006; Mahramanlioglu *et al.*, 2006; Mohan e Pittman Jr, 2006; Valix *et al.*, 2006; Yavuz *et al.*, 2006; Mor *et al.*, 2006). A utilização conjunta de um sistema microrganismo-carvão activado parece apresentar inúmeras vantagens pois aproveita a capacidade de adsorção do carvão activado com a capacidade de retenção de iões metálicos por parte do microrganismo (Quintelas e Tavares, 2001; Quintelas e Tavares, 2002; Quintelas *et al.*, 2006).

## **2.2- Crómio- Origem, química, toxicidade, enquadramento legal**

O elemento crómio foi descoberto em 1797, pelo químico francês Louis Vauquelin. A esta substância foi dado o nome de crómio, do grego “chromos” (cor), devido às diferentes cores apresentadas pelos seus compostos. Sob o ponto de vista de abundância, o crómio ocupa o 21º lugar entre os elementos constituintes da crosta terrestre e é o 6º metal de transição mais abundante. O principal minério de crómio é a cromite de ferro ou dicromato de ferro,  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ , encontrada maioritariamente na África do Sul (com 96% das reservas mundiais), Rússia e Filipinas. Outras fontes menos comuns de crómio incluem cromato de chumbo,  $\text{PbCrO}_4$ , e ocre de crómio,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . As pedras preciosas esmeralda e rubi devem a sua cor a quantidades vestigiais de crómio (Mohan e Pittman Jr., 2006).

O crómio encontra-se distribuído na Natureza de acordo com a Tabela 2.2.1.

Tabela 2.2.1- Distribuição do crómio na Natureza ( Adaptado de Rollinson, 1975)

<b>Material</b>	<b>Concentração de crómio (mg/l)</b>
Solos	5-3000
Água doce	0.001-0.08
Água do mar	$5 \cdot 10^{-5}$ - $3 \cdot 10^{-5}$
Plantas terrestres	0.23
Plantas marinhas	1
Animais terrestres	0.075
Animais marinhos	0.2-1
Tecidos (mamíferos)	0.025-0.85
Eritrócitos	0.0015

O crómio é um metal pesado com um largo espectro de aplicações industriais, tais como a produção de corantes têxteis, o curtimento de peles de animais, o fabrico de conservantes da madeira, a produção de pigmentos anti-corrosão para protecção de superfícies metálicas e a indústria metalúrgica em geral (Bishnoi *et al.*, 2004; Agrawal *et al.*, 2006).

O termo “metal pesado” refere-se aos elementos metálicos cuja massa específica é igual ou superior a 6.0 g/cm<sup>3</sup>. Os metais pesados mais comuns são o cádmio (8.65 g/cm<sup>3</sup>), o crómio (7.14 g/cm<sup>3</sup>), o cobre (8.95 g/cm<sup>3</sup>), chumbo (11.34 g/cm<sup>3</sup>), o mercúrio (13.53 g/cm<sup>3</sup>), o níquel (8.91 g/cm<sup>3</sup>) e o zinco (7.14 g/cm<sup>3</sup>) (Barrera *et al.*, 2006). Esta definição de metal pesado não reúne o consenso de toda a comunidade científica pois são encontradas na literatura outras definições baseadas em parametros tais como peso atómico, número atómico, toxicidade, entre outros (Duffus, 2001).

### 2.2.1- Química dos compostos de crómio

Os estados de oxidação do crómio variam de acordo com os compostos, desde -2 a +6. Os mais frequentes são o +3, crómio trivalente, e o +6, crómio hexavalente, sendo o primeiro o

mais estável. Os estados de oxidação +4 e +5 são pouco frequentes. Também é possível obter-se compostos nos quais o crômio apresenta estados de oxidação mais baixos, porém são bastantes raros.

A hidrólise do Cr (VI) produz apenas espécies neutras ou aniônicas, predominantemente  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCrO}_4^-$  e  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  (Mohan e Pittman Jr, 2006). Na Figura 2.2.1.1 podemos verificar que para pH inferiores a 1, a espécie predominante é o  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ , para valores de pH entre 1 e 6.5 predominam o ião hidrogenocromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ) e o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ). Para valores de pH superiores a 6.5 apenas se encontra o ião cromato,  $\text{CrO}_4^{2-}$ .

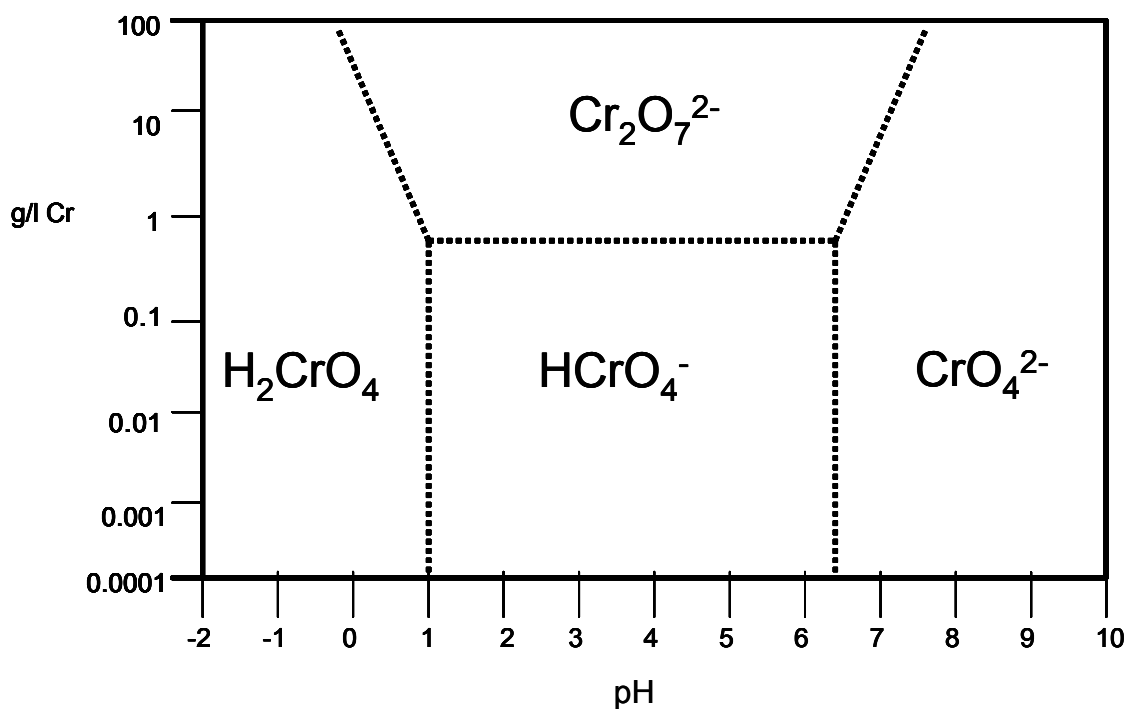


Figura 2.2.1.1- Diagrama representativo da variação das espécies do metal crômio com o valor de pH (Adaptado de Dionex-Technical Note, 1996).

### 2.2.2- Toxicidade

Este metal pesado é o segundo contaminante inorgânico mais comum encontrado em lençóis de água em zonas de deposição de substâncias perigosas (Horton *et al.*, 2006). A forma hexavalente do crômio, normalmente presente na forma de cromato ( $\text{CrO}_4^-$ ) e dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^-$ ), possui níveis de toxicidade significativamente mais elevados que outros estados de valência (Horsfall Jr. *et al.*, 2006).

A forma hexavalente do crómio causa irritação do aparelho respiratório. A ulceração e perfuração do septo nasal ocorre frequentemente em trabalhadores de indústrias produtoras de cromatos ou indústrias que usam o crómio nos seus processos de fabrico. Renites, broncoespasmos e pneumonia foram também alguns dos problemas respiratórios encontrados em pessoas expostas a compostos de crómio hexavalente. Os cromatos, em especial os cromatos e dicromatos de sódio e potássio, causam irritação da pele com possível desenvolvimento de úlceras nas zonas danificadas. A exposição a crómio trivalente não causa esses efeitos embora em algumas pessoas se tenham verificado reacções alérgicas a esse ião. Os efeitos crónicos da exposição ao crómio (exposição industrial excessiva da pele ao crómio hexavalente, quando associada a danos na pele ou inalação de pó de crómio) ocorrem nos pulmões, fígado, rins, trato-gastrointestinal e sistema circulatório. Propriedades mutagénicas estão associadas ao dicromato de potássio e portanto o seu manuseamento deve ser objecto de cuidados especiais (International Program on Chemical Safety, 1988).

Estudos recentes desenvolvidos por Sedman *et al.*, (2006), provam que apesar do estômago ser capaz de reduzir uma determinada quantidade de Cr (VI) a Cr (III), existe sempre uma dose de crómio hexavalente que é absorvido e entra nas células de variados tecidos, causando danos no DNA e aumentando assim o risco carcinogénico.

### **2.2.3- Legislação aplicada aos compostos de crómio**

Duma maneira geral, os metais pesados são tóxicos para o ser humano. A sua deposição em sistemas aquíferos é muito grave pois a sua interferência na potabilidade da água afecta perigosamente a fauna e a flora dos mesmos.

A legislação portuguesa estabelece limites de emissão destes poluentes na descarga de águas residuais. O Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto, que resulta da transposição para legislação nacional da norma directiva europeia, 80/778/CEE, estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com o objectivo de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos usos a que se destinam. Este diploma define também valores-limite de emissão para a descarga das águas residuais na água e nos solos.

No que concerne ao crómio total, o valor máximo admissível nas águas doces superficiais destinadas ao consumo humano é de 0.05 mg/l. Nas descargas de águas residuais, o valor limite de emissão para o crómio total é de 2 mg/l, enquanto que para o crómio hexavalente esse valor foi fixado em 0.1 mg/l. Nas águas destinadas à rega, o valor máximo admissível

de crómio total é de 20 mg/l, enquanto que o valor máximo recomendado se situa nos 0.10 mg/l.

Os requisitos de qualidade da água para consumo humano encontram-se estabelecidos no Decreto-Lei 243/2001, que resulta da transposição para legislação nacional da norma directiva europeia, 98/83/CE. Para consumo humano o valor máximo de crómio total admitido é de 50 µg/l.

Geralmente associados aos efluentes contendo crómio estão os compostos orgânicos, pois estes estão presentes nas mais variadas actividades industriais, como desinfectantes, solventes, entre outras aplicações. No âmbito desta dissertação pretendeu-se analisar a influência que a presença deste tipo de compostos tem na biossorção de crómio hexavalente.

Dos compostos orgânicos, em especial dos referidos nesta dissertação, se dará conta no ponto seguinte.

### 2.3- Compostos orgânicos- Origem, toxicidade e enquadramento legal

Os compostos orgânicos são substâncias químicas que contém na sua estrutura carbono e hidrogénio, e muitas vezes também oxigénio, azoto, enxofre, fósforo, boro, halogénios e outros (Morrison e Boyd, 1994). As moléculas orgânicas podem ser:

- **Moléculas orgânicas naturais:** são as sintetizadas pelos seres vivos e denominadas biomoléculas;
- **Moléculas orgânicas artificiais:** são substâncias que não existem na natureza e são fabricadas pelo homem, como os plásticos. A maioria dos compostos orgânicos puros são produzidos artificialmente.

Para os químicos antigos as substâncias orgânicas eram provenientes de fontes animais ou vegetais, e as substâncias inorgânicas seriam aquelas de procedência mineral. Durante muitos anos acreditava-se que entre a química orgânica e a química inorgânica existia uma barreira intransponível. No princípio do século XIX, o químico alemão Friedrich A. Wöhler conseguiu sintetizar a uréia, um produto orgânico, a partir de substâncias inorgânicas, comprovando que tal divisão era totalmente artificial, algo que é completamente evidente na química moderna.

A grande variedade de compostos orgânicos deve-se às seguintes razões:

- a capacidade do carbono de formar ligações covalentes com ele mesmo e de formar numerosas cadeias de diferentes comprimentos, bem como anéis de diferentes tamanhos. Nenhum outro elemento tem esta propriedade;
- a capacidade do carbono de se unir a muitos elementos e grupos de elementos diferentes;
- a existência de isómeros: compostos que têm a mesma fórmula molecular, mas diferentes arranjos dos átomos;

Os compostos fenólicos são poluentes ambientais devido ao seu uso alargado e potencial toxicidade para a maioria dos organismos superiores. O cresol é usado em desinfetantes e fumigantes, no fabrico de resinas sintéticas e em explosivos. Este composto é altamente tóxico, corrosivo e causa depressão do sistema nervoso central (Tallur *et al.*, 2006). Os clorofenóis são utilizados em refinarias petrolíferas, em indústrias do plástico e fibra de vidro, dos pesticidas e herbicidas, entre outros. Como principais consequências da exposição a este composto destacam-se a fadiga, náusea, vômitos, dor abdominal, espasmos e morte (Sathishkumar *et al.*, 2007). O fenol está presente nos efluentes de uma grande variedade de indústrias, das quais se destacam, a indústria do azeite, dos plásticos, das peles, da pintura, farmacêutica e as refinarias de óleo (Cañizares *et al.*, 2006).

Também para estes poluentes, a legislação portuguesa estabelece limites de emissão na descarga de águas residuais. O Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto, transposto da norma directiva europeia, 80/778/CEE, estabelece como valor máximo admissível nas águas doces superficiais destinadas ao consumo humano e para compostos fenólicos, o valor de 0.001 mg/l. Nas descargas de águas residuais, o valor limite de emissão para os fenóis é de 0.5 mg/l, enquanto que para o clorofenol esse valor foi fixado em 2 µg/l.

Os requisitos de qualidade da água para consumo humano, fornecida por sistemas de abastecimento público, encontram-se estabelecidos no Decreto-Lei 243/2001, que resulta da transposição para legislação nacional da norma directiva europeia, 98/83/CE. Para consumo humano o valor máximo admissível de compostos fenólicos é de 0.5 µg/l.

## **2.4- Principais metodologias aplicadas ao tratamento de soluções aquosas de crómio**

Várias metodologias de tratamento têm vindo a ser desenvolvidas com o objectivo de remover crómio de águas residuais. Nos pontos seguinte serão discutidos os métodos mais vulgarmente utilizados.

### **2.4.1- Precipitação**

Este é o método mais comum na remoção de metais pesados de efluentes antes de serem descarregados nos meios hídricos ou no solo. Para fazer a precipitação do Cr (VI), o pH da solução deve situar-se entre 2-3 e o Cr (VI) é reduzido a Cr (III) por acção dum redutor apropriado. A utilização de sulfato ferroso, dióxido de enxofre, sulfito de bário e metassulfito de sódio, como agentes redutores, tem sido largamente estudada (Morisset *et al.*, 1954; Kato e Nagai, 1991; Bruzzone *et al.*, 1992). Após a redução do crómio, o valor de pH deverá ser aumentado para 7.5-9 utilizando para o efeito cal ou soda caustica. Uma vez tendo reduzido o crómio e o valor de pH ter sido aumentado, a solução dá lugar a um precipitado de hidróxidos metálicos insolúveis os quais podem ser filtrados ou sedimentados.

Este método é económico e de eficiência elevada, apresentando como grande desvantagem o facto de produzir grandes quantidades de lamas não reutilizáveis, o que levanta outros problemas tais como a sua deposição e posterior tratamento.

### **2.4.2- Evaporação**

Neste método, a solução contendo crómio é tratada fazendo a evaporação da água de modo a concentrar o ião metálico, possibilitando a sua recuperação e posterior reutilização. A evaporação pode ser feita recorrendo a um evaporador ou por destilação em vácuo. Este processo é usado à escala industrial (Neben e Swanton, 1951; Milne, 1952; Morriset *et al.*, 1954) e é adequado para a maioria dos sistemas geradores de águas residuais contaminadas, excepto para aqueles em que todos os constituintes da água residual são retidos no produto concentrado, pois neste caso, existe a possibilidade de danificação dos evaporadores por corrosão.

A evaporação apresenta custos de operação genericamente baixos mas é extremamente dispendiosa em termos de energia (Kieszkowski e Wasiak, 1985; Wasiak e Kieszkowski,



1985). As necessidades energéticas podem ser reduzidas usando evaporadores de efeito múltiplo o que implica, contudo, maiores custos de investimento.

### **2.4.3- Processos membranares**

Este tipo de processos de remoção de metais pesados permite concentrar os poluentes, mas não conduz à sua remoção. Dentro destes processos destacam-se como sendo os mais importantes a osmose inversa e a electrodiálise.

#### **2.4.3.1- Osmose inversa**

A osmose inversa é uma técnica que se baseia na aplicação de pressões elevadas a uma solução concentrada, obrigando o solvente a passar por uma membrana semi-permeável para uma região de solução diluída (Oliveira, 1993). A solução concentrada fica assim mais concentrada ainda, podendo os metais ser recuperados. As membranas semi-permeáveis foram pela primeira vez utilizadas por Li (1968), tendo sido alvo de estudos posteriores por parte de diversos investigadores (Cassano *et al.*, 2001; Bodálo *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2006).

A utilização deste processo permite obter efluentes finais com níveis de concentração de metais pesados muito baixos, apresentando no entanto, custos de operação e de investimento muito elevados.

#### **2.4.3.2- Electrodiálise**

É sabido que a electrodiálise é usada na dessalinização da água do mar para consumo humano e na concentração de água do mar com vista à produção de sal (Rautenbach e Albrecht, 1989), onde provou ser uma solução económica; no entanto novas aplicações têm sido testadas em diferentes indústrias. Nos anos 90, surgiram diversos estudos nos quais se aplicavam processos de electrodiálise para recuperação de metais pesados (Acar e Alshawabkeh, 1993; Ottosen, 1995; Ribeiro, 1998).

Os sistemas de electrodiálise utilizam a corrente eléctrica entre um cátodo e um ânodo para promover a separação dos iões metálicos duma solução. Assim, a força directriz do processo resulta dos efeitos combinados dos gradientes de concentração e de campo eléctrico (Oliveira, 1993).

Uma célula de electrodiálise é constituída por três compartimentos, separados por duas membranas de troca iónica. Uma das membranas é de troca aniónica, só permitindo a passagem de aniões, enquanto a outra membrana é de troca catiónica, permitindo somente a passagem de catiões (Oliveira, 1993). A nível industrial, um aparelho de electrodiálise é constituído por uma bateria de 300 a 500 células acopladas.

Um sistema de electrodiálise apresenta como vantagens a elevada selectividade das membranas, baixa resistência eléctrica e grande estabilidade química, térmica e mecânica. A principal desvantagem deste processo prende-se com questões energéticas, sendo a sua utilização apenas aconselhada quando a concentração iónica é baixa.

### **2.4.4- Permuta iónica**

A permuta iónica é geralmente utilizada na remoção de aniões e catiões indesejáveis das águas residuais. Esta técnica é largamente usada na indústria metalúrgica para a recuperação e purificação de inúmeros metais, incluindo o crómio (Flett, 1985; Flett, 1993) e baseia-se na adsorção/permuta de catiões ou aniões em resinas sintéticas as quais possuem características que lhes permitem ser regeneradas pela eluição/libertação dos iões. De vários estudos possíveis destacam-se os de Sengupta e Kim (1988) com resinas de troca aniónica para a extracção de Cr (VI). Estas resinas removem também outros aniões ao mesmo tempo que o crómio e são regeneradas com uma solução de hidróxido de sódio.

A permuta iónica apresenta como principal vantagem os custos de operação relativamente baixos. As desvantagens prendem-se com o facto deste método ser pouco selectivo, exigir grandes quantidades de resinas para o tratamento de efluentes pouco concentrados e originar elevadas concentrações de resíduos salinos.

### **2.4.5- Adsorção**

A adsorção baseia-se no princípio de que uma superfície sólida em contacto com uma solução tem tendência a acumular uma camada superficial de moléculas de soluto, devido ao desequilíbrio de forças superficiais existentes.

O adsorvente de utilização mais comum é o carvão activado. O carvão activado usado neste processo pode ter origem nos mais diversos materiais, sendo os mais comuns a lenhite e o carvão betuminoso. A activação consiste no tratamento físico ou químico do carvão com o objectivo de limpar os poros e remover espécies adsorvidas na superfície do mesmo carvão.

O carvão granular obtido a partir destes materiais tem tido a mais vasta aplicação em tratamento de efluentes. Dependendo do material de origem e do processo de activação, o carvão activado adquire propriedades específicas. O conhecimento destas propriedades permite a escolha do tipo de carvão mais apropriado para uma dada aplicação.

Normalmente é possível a regeneração do carvão, sendo uma operação economicamente favorável. Nos processos de regeneração, o objectivo é a remoção dos materiais previamente adsorvidos da superfície do carvão. Esta regeneração pode ser feita por via térmica, aplicação de vapor, extracção com solvente, oxidação química ou tratamentos ácidos/alcalinos. Este processo não é muito utilizado na remoção de metais pesados em larga escala pois a relação eficiência/preço é baixa (Quintelas, 2001).

#### **2.4.6- Bioremediação**

Com uma aplicação mais lata que o tratamento de soluções aquosas, refere-se aqui a bioremediação que consiste no controle e na manipulação de processos biológicos, geralmente microbianos, “in situ” de forma a se conseguir uma elevada taxa de degradação dos poluentes. A sua inclusão neste capítulo deve-se ao facto dos solos incluírem fase líquida na sua constituição, sendo este responsável pela movimentação de contaminantes. A bioremediação pode ser efectuada através da utilização de bactérias, fungos ou eventualmente plantas que degradam ou reduzem a toxicidade das substâncias a remover do ambiente.

De entre as várias estratégias de bioremediação destacam-se a bioestimulação e a bioadição que utilizam microrganismos e cuja aplicação isolada ou combinada poderá conduzir a uma rápida e completa degradação de poluentes. A bioestimulação tem por objectivo aumentar o número ou estimular a actividade dos microrganismos degradadores da comunidade indígena de uma determinada região contaminada, através da adição de nutrientes, receptores de electrões ou dadores de electrões. A bioadição consiste na adição de microrganismos, pertencentes ou não à comunidade indígena, crescidos em laboratório e com capacidade para degradar o contaminante a remover (Vogel, 1996; Widada *et al.*, 2002). Esta técnica, bioadição, poderá ainda ser aplicada com o objectivo de transferir para a comunidade indígena a informação genética, presente na estirpe degradadora, necessária à degradação (Top *et al.*, 2002). Outras técnicas de bioremediação têm sido estudadas, como sejam a biotransformação do Cr (VI) em Cr (III) por bactérias redutoras de crómio (Figueira *et al.*, 2000; Bai and Abraham, 2001; Gupta *et al.*, 2003), a fitorremediação que utiliza vários tipos de plantas para remover, transferir, estabilizar ou destruir contaminantes em ambientes poluídos (Vidali, 2001), a fitoextracção e a biossorção.

A escolha da estratégia de biorremediação mais apropriada para tratar um determinado local, é determinada por vários factores, tais como as características do(s) poluente(s) presente(s) (natureza, concentração e biodisponibilidade) e a composição do sistema em termos de nutrientes e população microbiana presente no local (Dua *et al.*, 2002). A solução mais eficaz poderá passar por uma combinação de diferentes técnicas de biorremediação.

Destes fenómenos, e pelo facto de ser objecto desta dissertação, destaca-se o fenómeno de bioissorção que será tratado em pormenor no ponto 2.5.

## **2.5- Bioissorção**

Muitos microrganismos são capazes de acumular metais pesados provenientes de soluções aquosas, por um número de diferentes processos tais como uptake por transporte, ligação às paredes das células e encapsulação extracelular, precipitação e reacções de oxidação-redução (Duncan & Brady, 1994). Esta capacidade para fixar e para retirar os metais dos meios aquáticos é uma consequência da presença de numerosos grupos químicos na superfície da biomassa, tais como grupos acetamidas da quitina, grupos aminas e fostatos dos ácidos nucleicos, grupos amino, amido, sufridinas e carboxílicos das proteínas e grupos hidroxílicos dos polissacáridos (Hancock *et al.*, 1999).

A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acumulação, podem variar amplamente de acordo com a espécie microbiana ou até mesmo com a linhagem. As células, os produtos excretados, a parede celular e os polissacarídeos têm potencial para remover metais de soluções. Factores externos como o pH, a temperatura, a eventual presença de nutrientes e de outros metais também influenciam o mecanismo de actuação e, consequentemente, a eficiência e seletividade da acumulação.

A Tabela 2.5.1 lista alguns mecanismos utilizados pelos microrganismos para remoção de metais pesados.

Tabela 2.5.1- Mecanismos utilizados para captação de metais pesados de soluções aquosas por parte de alguns microrganismos (Adaptado de Mesquita (1993) e Malik (2004))

<b>Microorganismo</b>	<b>Metal</b>	<b>Mecanismos de remoção</b>
<i>Citrobacter</i> sp.	Urânio e Cádmio	Precipitação na superfície celular por acção enzimática
<i>Micrococcus luteus</i>	Chumbo e Estrôncio	Adsorção à membrana e parede celular
<i>Arthrobacter viscosus</i>	Cádmio	Adsorção a polissacarídeos extracelulares
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Urânio	Acumulação intracelular
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Níquel	Acumulação no periplasma e membrana celular
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Níquel	Acumulação na superfície celular
<i>Escherichia coli</i>	Cádmio	Acumulação intracelular
<i>Aspergillus niger</i>	Níquel	Acumulação intracelular e na parede celular
<i>Rhizopus</i> sp.	Níquel	Acumulação na superfície celular
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Níquel	Acumulação intracelular
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cádmio	Acumulação intracelular e na parede celular
<i>Chlorella</i> sp.	Cádmio	Acumulação intracelular e na parede celular

As maiores vantagens da biossorção em relação aos métodos convencionais de tratamento são (Mohanty *et al.*, 2006, Pamukoglu e Kargi, 2007):

- 1- Baixo custo;
- 2- Elevada eficiência de remoção de metal em soluções diluídas;
- 3- Ausência de requisitos nutricionais adicionais;
- 4- Capacidade de regeneração do biosorvente;
- 5- Possibilidade de recuperar o metal;

- 6- Adsorção selectiva de iões metálicos;
- 7- Condições de operação apropriadas para uma gama alargada de condições ambientais.

Como qualquer método de tratamento, a biossorção também apresenta desvantagens. As principais desvantagens prendem-se com a saturação da biomassa, ou seja, quando os sítios activos estão ocupados é necessário proceder-se à dessorção do metal ou substituir a biomassa por biomassa nova, e com o facto de não haver muito potencial biológico para alterar o estado de valência do metal. Deste modo a biossorção de formas menos solúveis do metal, bem como de complexos organometálicos, encontra-se limitada (Ahluwalia e Goyal, 2007).

Foram recentemente desenvolvidos estudos (Demir e Arysol, 2007), com o objectivo de analisar os custos e benefícios das remoções química e biológica do Cr (VI). Estes autores compararam a remoção de Cr (VI) por *Bacillus thuringiensis* com a remoção do mesmo ião por um resina de troca iónica. De acordo com o resultado da comparação, o custo por unidade na remoção química foi calculado como sendo de 0.24 € e a percentagem de remoção de crómio foi de 99.68 %, enquanto para a remoção biológica se obteve um custo de 0.14 € e uma remoção de 59.3 %. Por conseguinte, o custo por unidade na remoção química é mais alto, mas é mais alta também a percentagem de remoção, no entanto, a remoção biológica trás inúmeros benefícios não mensuráveis para a saúde humana e o ambiente, pelo que é do interesse das indústrias adoptar sempre os métodos biológicos em detrimento dos métodos químicos.

### **2.5.1- Diferentes tipos de biomassa utilizada em estudos de biossorção**

Existem vários requisitos necessários para conferir competitividade técnica e económica ao processo de biossorção, tais como (Martins, 2004):

- 1- A biomassa deve apresentar uma capacidade de acumulação elevada;
- 2- A biomassa deve ser naturalmente abundante e apresentar baixo custo;
- 3- As etapas da biossorção devem ser rápidas e eficientes;
- 4- A biomassa deve ser reutilizável;
- 5- Deve ser facilmente adaptável a diferentes tipos de reactores;
- 6- O metal retido pelo biossorvente deve ser de fácil recuperação a custo reduzido.

Este mesmo autor afirma que a eficiência de um processo de bioissorção não depende apenas do bioissorvente utilizado mas também do tipo de ião e sua concentração, e de parâmetros físico-químicos tais como a temperatura, pH, força iónica e presença de outros iões.

O estudo da capacidade de remover metais pesados por parte de alguns tipos de biomassa sofreu um grande incremento a partir de 1985. Algas marinhas, fungos, leveduras, bactérias, resíduos biológicos (agrícolas, florestais), foram testados em estudos de bioissorção de metais com resultados muito promissores. Alguns bioissorventes podem remover uma larga gama de metais pesados, enquanto outros são específicos para certo tipo de metal (Vieira e Volesky, 2000).

De seguida será feita uma breve revisão dos principais tipos de biomassa passíveis de ser usados em processos de bioissorção, bem como será feita referência aos mais recentes trabalhos publicados sobre bioissorção com recurso a diferentes biomassas. Esta breve revisão começará então pelo grupo das leveduras, seguido pelos fungos, pelas algas, pelos resíduos biológicos e por último pelas bactérias. As bactérias serão o último tipo de biomassa a ser mencionado pois, como é o objecto de estudo desta dissertação, pretende-se fazer uma referência mais alargada que inclua as várias espécies de bactérias utilizadas.

### **2.5.1.1- Leveduras**

As leveduras são fungos unicelulares. Como são células simples, crescem e reproduzem-se mais rapidamente que os restantes fungos. Estas, as leveduras, diferem das algas pois não efectuam a fotossíntese, diferem dos protozoários porque possuem uma parede celular rígida e diferem das bactérias em virtude das suas maiores dimensões e propriedades morfológicas (Barnett et al., 1983; Kurtzman e Fell, 1998).

De um modo geral, as leveduras apresentam elevadas capacidades para remover metais pesados. Alguns compostos químicos das células das leveduras podem actuar como permutadores iónicos com uma rápida ligação a catiões (Vieira e Volesky, 2000). De um modo geral, as leveduras podem ser utilizadas sem tratamento prévio, especificamente tratadas ou desnaturadas, tanto em sistemas fechados como em processos contínuos. A parede das células das leveduras é uma estrutura multiamina e microfibrilar constituída em mais de 90% por polissacáridos. Os principais grupos existentes nessas paredes são grupos amina, hidróxidos, carboxílos, sulfatos e fosfatos (Muter *et al.*, 2002). Estes autores

estudaram a bioissorção de Cr (VI), Cu (II), Zn (II), Cd (II), Pb (II) por células intactas e desnaturadas de *Candida utilis*. A performance da bioissorção dos catiões, em termos de massa de metal retido por massa de bioissorvente, seguiu a seguinte ordem Pb > Zn > Cu > Cd. A comparação entre a bioissorção dos catiões e a bioissorção do anião Cr (VI) permite concluir que a quantidade de Cr (VI) bioissorvida é consideravelmente menor. A remoção de crómio na presença de Pb (II) sofre um incremento e este incremento resulta da formação de cromato de chumbo, composto praticamente insolúvel em solução. Estes autores verificaram também que existe um efeito sinérgico na bioissorção de Cr (VI) na presença de Cu (II) e que a presença de Cd (II) e Zn (II) inibe a bioissorção do mesmo.

A remoção de metais pesados de solos e águas contaminadas pode também ser efectuada utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica*. As células de levedura defendem-se do efeito xenobiótico dos metais pesados produzindo proteínas específicas que se ligam aos metais no citoplasma ou transportam-nos para o interior dos vacúolos (Strouhal *et al.*, 2003). Estes mesmos autores estudaram a fixação de diferentes metais (Cd, Ni, Co e Zn), a bioacumulação dos mesmos nos diferentes compartimentos celulares, bem como a sua relação com o nível de metalotioneína no citoplasma.

Numerosos estudos têm sido referenciados utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A utilização desta levedura apresenta inúmeras vantagens pelo facto de ser um sub-produto de várias actividades industriais (indústria cervejeira, panificação, etc.), o que permite resolver também o problema da deposição da levedura em aterros. De entre os vários trabalhos publicados destacam-se os de Ferraz *et al.* (2004), que estudaram a remoção e recuperação de Cr (III), e os de Lin *et al.* (2005) que analisaram algumas características da bioissorção de Au (III), utilizando técnicas espectroscópicas, nomeadamente FTIR, XPS e IR.

Na tabela seguinte apresentam-se alguns dos mais recentes valores da capacidade de bioissorção para diferentes espécies de leveduras e para diferentes metais pesados. Esta capacidade de bioissorção refere-se à massa de metal retido por massa de bioissorvente.



Tabela 2.5.1.1.1- Capacidade de bioissorção de diversas espécies de leveduras para diferentes iões metálicos

<b>Espécie de leveduras</b>	<b>Metal</b>	<b>Q<sub>máx.</sub> (mg/g)</b>	<b>Referência</b>
<i>Saccharomyces</i> sp.	Cu (II)	1.5	Han <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces</i> sp.	Pb (II)	5.7	Han <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cr (VI)	6.8	Goyal <i>et al.</i> , 2003
<i>Pichia guilliermondii</i>	Cu (II)	9.1	Solóniz <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida utilis</i>	Cr (VI)	7.0	Muter <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida utilis</i>	Cu (II)	23.0	Muter <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida utilis</i>	Pb (II)	39.0	Muter <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida utilis</i>	Cd (II)	19.0	Muter <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida utilis</i>	Zn (II)	28.0	Muter <i>et al.</i> , 2002

### 2.5.1.2- Fungos

Os fungos são um vasto grupo de organismos classificados como um reino pertencente ao domínio Eukaryota, segundo a taxonomia de Lineu, desenvolvida por Carolus Linnaeus, no século XVIII. Estão incluídos neste grupo organismos de dimensões consideráveis, como os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como os bolores. Foram já descritas umas 70.000 espécies, mas muitas estão ainda por identificar e descrever (Hawksworth, 1991; Hawksworth *et al.*, 1995).

Os fungos crescem facilmente, produzem elevada quantidade de biomassa e podem ser facilmente manipulados genética e morfológicamente. Estes factores aliados ao facto de alguns processos industriais produzirem, como subproduto, elevadas quantidades de biomassa fúngica e de vários autores sugerirem que esta apresenta características que a tornam capaz de remover metais pesados, torna a biomassa fúngica um bioissorvente a ter em conta (Volesky, 1990).

As paredes dos fungos contêm grandes quantidades de polissacáridos e proteínas, os quais possuem diversos grupos funcionais, tais como carboxílos, hidroxílos, sulfatos, fosfatos e

grupos amina, capazes de sequestrar iões metálicos (Bayramoglu *et al.*, 2006; Akar e Tunali, 2006). A acumulação de metais por fungos, tal como para os outros microrganismos, pode ser dividida em 2 tipos: por organismos vivos onde o transporte do metal e posterior deposição é dependente de actividades metabólicas e por biomassa morta, a qual retém metais através dos grupos químicos funcionais das células e em especial da parede celular (Volesky, 1990).

Na tabela seguinte apresentam-se alguns dos mais recentes valores da capacidade de bioissorção para diferentes espécies de fungos e para diferentes metais pesados obtidos por diversos autores.

Tabela 2.5.1.2.1- Capacidade de bioissorção de diversas espécies de fungos para diferentes iões metálicos

<b>Espécie de fungos</b>	<b>Metal</b>	<b>Q<sub>máx.</sub> (mg/g)</b>	<b>Referência</b>
<i>Lentinus sajor- caju</i>	U (II)	268.0	Bayramoglu <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus flavus</i>	Pb (II)	13.5	Akar e Tunali, 2006
<i>Aspergillus flavus</i>	Cu (II)	10.8	Akar e Tunali, 2006
<i>Neurospora crassa</i>	Cr (VI)	15.9	Tunali <i>et al.</i> , 2005
<i>Funalia trogii</i>	Hg (II)	333.0	Arica <i>et al.</i> , 2004
<i>Funalia trogii</i>	Cd (II)	164.8	Arica <i>et al.</i> , 2004
<i>Funalia trogii</i>	Zn (II)	42.1	Arica <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhizopus nigricans</i>	Cr (VI)	12.7	Bai e Abraham, 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Cr (VI)	36.8	Goyal <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Pb (II)	55.6	Salehizadeh e Shojaosadati, 2003

### 2.5.1.3- Algas

As algas compreendem vários grupos de seres vivos aquáticos e autotróficos, ou seja, que produzem a energia necessária ao seu metabolismo através da fotossíntese. A maior parte das espécies de algas são unicelulares e, mesmo as mais complexas – algumas com

tecidos diferenciados – não possuem verdadeiras raízes, caules ou folhas. Embora tenham sido consideradas, durante muito tempo, como plantas, apenas as algas verdes têm uma relação evolutiva com as plantas superiores; os restantes grupos de algas representam linhas independentes de desenvolvimento evolutivo, paralelo às que levaram à formação de plantas superiores (Raven e Johnson, 1986).

As algas definem um tipo de biomassa com inúmeras vantagens para a biossorção, das quais se destaca o facto das suas estruturas macroscópicas poderem ser facilmente divididas em partículas de biossorvente (Vieira e Volesky, 2000) e portanto, com apenas algumas algas se podem tratar grandes quantidades de efluente, o facto das algas necessitarem de poucos requisitos nutricionais e o facto das algas geralmente não produzirem substâncias tóxicas, ao contrário de outros microrganismos como as bactérias ou fungos (Kiran *et al.*, 2006).

Kiran *et al.* (2007) afirmam ainda que a acumulação de iões metálicos nas superfícies das algas depende de diferentes parâmetros como sejam a carga iónica do ião metálico, a espécie de alga e a composição química da solução contendo o ião metálico. Algumas algas colhidas em oceanos apresentaram grandes capacidades de biossorção de iões metálicos (Figueira *et al.*, 2000; Volesky e Holan, 1995). Foi verificado também que as algas castanhas apresentam particular capacidade de actuação na remoção de metais pesados (Volesky e Holan, 1995).

A acumulação de iões metálicos por algas parece ocorrer em duas etapas: uma etapa inicial, normalmente designada por acumulação passiva, em que se estabelecem ligações na superfície das células, rápidas e reversíveis, que ocorrem após um curto período de contacto entre os microrganismos e o metal; durante esta fase podem ocorrer variados processos tais como adsorção, permuta iónica, coordenação, complexação, microprecipitação e quelação e uma segunda etapa, correspondente a uma acumulação activa, lenta e irreversível, dependente do metabolismo e que envolve o transporte de iões metálicos através da membrana, para o citoplasma da célula. Os mecanismos responsáveis por esta acumulação incluem ligações covalentes, reacções redox, precipitação superficial, cristalização na superfície da célula, difusão no interior da célula e ligações a proteínas ou outros sítios intracelulares (Martins, 2004).

A capacidade de remoção das algas, bem como a afinidade para algum metal específico pode ainda ser manipulado com a realização dum pré-tratamento da biomassa (Figueira *et al.*, 2000). A biossorção de chumbo pela alga castanha, *Laminaria japonica*, foi testada por

Luo *et al.* (2006) após pré-tratamento com epíclorohidrina (2 tratamentos diferentes, EC1 e EC2), com permanganato de potássio (PC) ou simplesmente lavada com água destilada (DW). Estes autores concluíram que a bioadsorção do chumbo é fortemente condicionada pelo valor de pH e observaram que o valor de pH para o qual a remoção é máxima é de 5,3. Os valores máximos de acumulação obtidos foram de 1,67 mmol/g (346 mg/g), 1,62 mmol/g (336 mg/g), 1,54 mmol/g (319 mg/g) e 1,21 mmol/g (251 mg/g), respectivamente para o tratamento com EC1, EC2, PC e DW. Estes resultados permitiram aos autores concluir que as algas pré-tratadas têm maior potencial como bioadsorvente para a remoção de metais pesados de águas residuais.

Senthilkumar *et al.* (2006) testaram o potencial para a bioadsorção de Zn (II) de onze diferentes espécies de microalgas marinhas a diferentes valores de pH, e concluíram que a alga verde *Ulva reticulata*, exibe o maior valor de acumulação com 36,1 mg/g a pH 5,5 e para uma concentração inicial de Zn (II) de 100 mg/l. Estes autores avaliaram a performance das algas mediante a realização de isotérmicas de adsorção e posteriormente, por ensaios em contínuo utilizando colunas de leito fixo. A dessorção dos íons de zinco (II) foi também efectuada tendo sido utilizado para o efeito  $\text{CaCl}_2$  0,1 M, a diferentes condições de pH, em três ciclos de adsorção-dessorção. Foi verificado que durante os ciclos de regeneração havia alguma perda da capacidade de bioadsorção por parte das algas. Os processos de dessorção, que podem ser químicos ou térmicos, permitem por um lado recuperar o metal para outras aplicações e por outro reutilizar o bioadsorvente. A viabilidade económica dum processo de dessorção depende fortemente do valor comercial do metal a recuperar, do custo de operação e do custo do bioadsorvente.

Volesky *et al.* (1999) trabalharam extensivamente com um dos melhores tipos de biomassa capazes de remover metais, a alga *Sargassum*. Estes autores compararam os valores de uptake de três diferentes espécies de *Sargassum* em relação ao Cd e Cu, usando para tal isotérmicas de equilíbrio. O uptake para o Cd, para um óptimo de pH de 4,5, foi de 87 mg/g para a espécie *Sargassum vulgare*, 80 mg/g para *Sargassum fluitans* e de 74 mg/g para *Sargassum filipendula*. Em relação ao Cu, e também para o mesmo valor de pH, os valores foram de 59 mg/g, 56 mg/g e 51 mg/g, respectivamente para as espécies *Sargassum vulgare*, *Sargassum filipendula* e *Sargassum fluitans*.

Na tabela seguinte apresentam-se alguns dos mais recentes valores da capacidade de bioadsorção, para diferentes espécies de algas e para diferentes metais pesados, encontrados na literatura.

Tabela 2.5.1.3.1- Capacidade de bioissorção de diversas espécies de algas para diferentes iões metálicos

<b>Espécie de algas</b>	<b>Metal</b>	<b>Q<sub>máx.</sub> (mg/g)</b>	<b>Referência</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd (II)	86.6	Aksu e Donmez, 2006
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ni (II)	58.4	Aksu e Donmez, 2006
<i>Lyngbya putealis</i>	Cr (VI)	48.0	Kiran <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cr (VI)	18.2	Arica <i>et al.</i> , 2005
<i>Sargassum baccularia</i>	Cd (II)	83.2	Hashim e Chu, 2004
<i>Sargassum siliquosum</i>	Cd (II)	82.1	Hashim e Chu, 2004
<i>Padina tetrastomatica</i>	Cd (II)	59.6	Hashim e Chu, 2004
<i>Chaetomorpha linum</i>	Cd (II)	54.0	Hashim e Chu, 2004
<i>Gracilaria changii</i>	Cd (II)	25.9	Hashim e Chu, 2004
<i>Gracilaria edulis</i>	Cd (II)	27.0	Hashim e Chu, 2004
<i>Gracilaria salicornia</i>	Cd (II)	18.0	Hashim e Chu, 2004

#### 2.5.1.4- Resíduos biológicos

Determinados resíduos agrícolas/florestais podem revelar potencial como adsorventes de baixo custo, dada a sua abundância, reduzido valor comercial e considerando o facto de criarem problemas de deposição. Estima-se que estes subprodutos originam uma quantidade de cerca de 320.000 ton/ ano de resíduos de baixo valor comercial, resíduos estes normalmente compostos por lenhite e celulose como constituintes maiores. Os grupos funcionais normalmente associados aos resíduos agrícolas/florestais incluem álcoois, aldeídos, cetonas, grupos carboxílicos, fenólicos e outros grupos. Estes grupos apresentam capacidade para sequestrar/acumular metais pesados por substituição de iões de hidrogénio por iões metálicos em solução ou por doação de um par de electrões de maneira a formar complexos com os iões metálicos presentes em solução (Ofomaja e Ho, 2006).

Na literatura encontram-se variados estudos utilizando resíduos biológicos tais como carolo de milho modificado para remoção de Cd, Pb e Zn (Vaughan *et al.*, 2001), carvão preparado a partir de bagaço de cana de açúcar para a remoção de Cd e Zn (Mohan e Singh, 2002), carvão de casca de amêndoa, caroço de azeitona, casca de coco e caroço de pêssego para remoção de Cd e Zn (Ferro-Garcia *et al.*, 1988), entre numerosos outros.

Na tabela seguinte apresentam-se alguns dos mais recentes valores da capacidade de bioissorção para diferentes tipos de resíduos e para diferentes metais pesados, que incluem resíduos tão diversos tais como pinhões, amêndoa de coqueiro, folhas de chá, resíduos de azeitona, resíduos de cortiça, cassava (um tubérculo utilizado na alimentação, na África Ocidental) e lamas activadas.

Tabela 2.5.1.4.1- Capacidade de bioissorção de diversos resíduos biológicos para diferentes iões metálicos

Resíduo biológico	Metal	Q <sub>máx.</sub> (mg/g)	Referência
Carvão de bagaço	Cd (II)	6.2	Srivastava <i>et al.</i> , 2006
Carvão de bagaço	Ni (II)	6.5	Srivastava <i>et al.</i> , 2006
Cassava ( <i>Manihot sculenta</i> )	Cr (VI)	61.8	Horsfall Jr. <i>et al.</i> , 2006
Amêndoa de coqueiro (copra)	Cd (II)	1.8	Ofomaja e Ho, 2006
<i>Aroucaria angustifolia</i> (pinhão)	Cu (II)	32.2	Lima <i>et al.</i> , 2006
Folhas de chá preto	Cr (VI)	455.0	Hossain <i>et al.</i> , 2005
Folhas de chá	Pb (II)	73.0	Ahluwalia e Goyal, 2005
Resíduos de azeitona	Cu (II)	10.2	Pagnanelli <i>et al.</i> , 2005
Resíduos de azeitona	Cd (II)	5.5	Pagnanelli <i>et al.</i> , 2005
Resíduos da cortiça	Cu (II)	14.0	Chubar <i>et al.</i> , 2004
Resíduos da cortiça	Ni (II)	10.0	Chubar <i>et al.</i> , 2004
Lamas activadas	Cu (II)	50.0	Salehizadeh e Shojaosadati, 2003
Lamas activadas	Zn (II)	138.0	Salehizadeh e Shojaosadati, 2003

### 2.5.1.5- Bactérias

Uma bactéria é um organismo unicelular, procarionte, que pode ser encontrado na forma isolada ou em colónias e pertencente ao reino Monera. Descobertas por Anton van Leeuwenhoek em 1683, as bactérias foram inicialmente classificadas entre as plantas; em 1894, Ernst Haeckel incluiu-as no reino Protista e actualmente as bactérias compõem um dos três domínios do sistema de classificação cladístico (a Cladística é um método de análise das relações evolutivas entre grupos de seres vivos, de modo a obter a sua "genealogia"). Vulgarmente, utiliza-se o termo "bactéria" para designar também as archaeobactérias, que actualmente constituem um domínio separado. As bactérias são normalmente microscópicas ou submicroscópicas (detectáveis apenas ao microscópio

electrónico), com dimensões máximas tipicamente da ordem dos 0,5 a 5 micrómetros (Holt *et al.*, 1994).

O uso de bactérias como bioSORVENTES apresenta inúmeras vantagens das quais se destaca o seu pequeno tamanho, a ubiquidade, a capacidade de crescimento em condições controladas e a resiliência a uma gama alargada de condições ambientais (Urrutia, 1997). Por serem extremamente pequenas, as bactérias apresentam a maior área superficial por unidade de volume, de qualquer forma independente de vida. Este factor, aliado ao elevado número de sítios activos para a quimiosorção presentes nas suas paredes, faz das bactérias excelentes bioSORVENTES (Beveridge, 1989).

Os polímeros estruturais presentes nas paredes das células das bactérias fornecem grupos funcionais acídicos como os carboxílicos, fosforílicos e grupos amino, que são directamente responsáveis pela reactividade das células bacterianas (Kulczycki *et al.*, 2002). Todas as superfícies das bactérias são intrinsecamente reactivas em relação aos metais dissolvidos, apesar dos diferentes formatos das superfícies entre as diferentes espécies de bactérias. Foi provado que, em alguns casos, as células em crescimento são capazes de remover metais continuamente através de mecanismos internos de desintoxicação (Godlewska-Zylkiewicz, 2006).

De entre os numerosos trabalhos de bioSORÇÃO com bactérias publicados nos últimos anos, destacam-se os de Fein *et al.* (1997), que usou *Bacillus subtilis* para estudar as interacções da bactéria com Cd, Cu, Pb e Al. Os seus resultados não apenas quantificam as constantes de desprotonação para os importantes grupos funcionais das paredes das células bacterianas como também quantificam as constantes de estabilidade de adsorção de importantes metais para com os sítios de bioSORÇÃO. As paredes das células bacterianas são carregadas negativamente em condições de pH ácido e os grupos funcionais da parede celular apresentam um elevado grau de afinidade para com os iões metálicos em solução. Mais recentemente Carlos Green-Ruiz (2006), utilizou biomassa de *Bacillus* sp. para a remoção de mercúrio. Nesse estudo foi usada biomassa morta para bioSORVER iões de Hg (II) a partir de soluções aquosas a seis diferentes valores de concentração inicial. Foi observado que 0.2 g (peso seco) de biomassa removeram de 0.023 mg (para 0.25 mg/l de Hg (II)) até 0.681 mg (para 10.0 mg/l Hg (II)).

A capacidade de bioSORÇÃO das diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tem sido estudada com diferentes microrganismos. Churchill *et al.* (1995) usaram estirpes Gram-negativas de *Escherichia coli* K-12 e de *Pseudomonas aeruginosa* e uma estirpe Gram-



positiva de *Micrococcus luteus* para demonstrar a bioissorção de Cu (II), Cr (III), Co (II) e Ni (II). A análise da eficiência da bioissorção, em termos de uptake, sugere que as células de *Escherichia coli* são as mais eficientes na remoção de cobre, crómio e níquel, tendo-se verificado que a bioissorção do cobalto é mais eficiente com *Micrococcus luteus*. Estes resultados são contestados por outros autores que afirmam que, em geral, as bactérias Gram-positivas têm uma maior capacidade de bioissorção devido à maior espessura da sua camada de peptidoglicano que contém numerosos sítios activos para a bioissorção (Van Hullebusch *et al.*, 2003). Os resultados obtidos no âmbito desta tese confirmam este facto, ou seja, entre as bactérias testadas, as Gram-positivas apresentam maiores capacidades de remoção quando em sistema fechado (Quintelas, 2007a).

Estudos interessantes foram também realizados por Hu *et al.* (1996) que trabalharam com *Pseudomonas aeruginosa* CSU, uma estirpe geneticamente não modificada da bactéria, conhecida como sendo um espécie eficiente para a remoção de urânio hexavalente dissolvido. Esta estirpe revelou ser capaz de remover significativamente mais urânio que certos bioissorventes patenteados derivados de algas ou fungos. Outro estudo a merecer destaque foi o de Li *et al.*, 2006, onde foram utilizadas células de *Synechococcus* sp. para estudar os mecanismos de bioissorção de Cr (VI). Estes autores estudaram as cinéticas de bioissorção, analisando o efeito do pH, temperatura e concentração inicial de crómio hexavalente, e fizeram a análise por FTIR das células antes e após o contacto como o crómio. A conjugação destes factores permitiu-lhes tirar conclusões acerca dos mecanismos de bioissorção do crómio por parte deste tipo de bactérias. Concluíram então que a bioissorção de Cr (VI) segue dois passos sequentes, um passo de fixação de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  por força electrostáticas existentes nos sítios activos protonados, seguido por um passo de redução do  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  a  $\text{Cr}^{3+}$  por grupos reductores presentes na superfície do bioissorvente.

Quintelas e Tavares (2001, 2002) efectuaram trabalhos com um biofilme de *Arthrobacter viscosus* suportado em carvão activado granular e utilizado para a remoção de crómio, cádmio, ferro e chumbo. Fazendo uma análise global ao comportamento dos quatro metais estudados verificaram que existem grandes diferenças de comportamento entre os metais crómio e cádmio e os metais chumbo e ferro. Em relação ao cádmio tudo parece apontar para o facto deste metal ser muito tóxico para a bactéria utilizada. O melhor comportamento global verificado para o chumbo e para o ferro poderá ser justificado com a possível maior afinidade destes metais para com os sítios de ligação à bactéria. Esta maior afinidade poderá estar relacionada com a atracção exercida pela carga negativa das células bacterianas sobre os catiões ferro e chumbo. O mais elevado peso atómico do chumbo e o relativamente pequeno raio iónico do ferro contribuem para o seu melhor desempenho

(Avery e Tobin, 1992). Outra estirpe de *Arthrobacter* foi estudada por Horton *et al.*, 2006, que testaram a utilização de *Arthrobacter aurescens* na redução de crómio hexavalente. Estes autores concluíram que esta bactéria não só tem capacidade para reduzir o Cr (VI) como também consegue interagir com outros metais tais como mercúrio, chumbo, níquel ou cobre.

Na tabela seguinte apresentam-se alguns dos mais recentes valores da capacidade de bioissorção, para diferentes espécies de bactéria e para diferentes metais pesados, retirados de trabalhos recentemente publicados.

Tabela 2.5.1.5.1- Capacidade de bioissorção de diversas espécies de bactérias para diferentes iões metálicos

<b>Espécie de bactéria</b>	<b>Metal</b>	<b>Q<sub>máx.</sub> (mg/g)</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus</i> sp.	Pb (II)	92.3	Tunali <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus</i> sp.	Cu (II)	16.3	Tunali <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas</i> sp.	La (III)	1.9	Kazy <i>et al.</i> , 2006
Consórcio bacteriano	Cr (VI)	90.9	Sannasi <i>et al.</i> , 2006
Consórcio bacteriano	Pb (II)	238.1	Sannasi <i>et al.</i> , 2006
Consórcio bacteriano	Cu (II)	178.9	Sannasi <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus thuringiensis</i> (células vegetativas)	Cr (VI)	28.6	Sahim e Ozturk, 2005
<i>Bacillus thuringiensis</i> (esporos)	Cr (VI)	34.2	Sahim e Ozturk, 2005
<i>Streptococcus equisimilis</i>	Cr (VI)	25.9	Goyal <i>et al.</i> , 2003
<i>Arthrobacter</i> sp.	Pb (II)	130	Salehizadeh e Shojaosadati, 2003
<i>Zoogloea ramigera</i>	Cu (II)	29	Salehizadeh e Shojaosadati, 2003
<i>Bacillus firmus</i>	Zn (II)	418	Salehizadeh e Shojaosadati, 2003

#### **2.5.1.5.1- Microrganismos usados no desenvolvimento deste trabalho de investigação**

Para a execução do trabalho experimental descrito nesta tese foram utilizados os seguintes géneros de bactérias: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Streptococcus*. Das suas principais características bem como de algumas curiosidades se dará conta nos pontos seguintes.

##### **Arthrobacter sp.**

As bactérias do género *Arthrobacter* são normais habitantes do solo e exercem várias funções importantes na área da remoção de produtos químicos. Recentemente foi descoberto que várias espécies de *Arthrobacter* podem reduzir o crómio hexavalente, o qual causa sérios problemas ambientais e graves problemas de saúde no ser humano. Estas bactérias são também capazes de degradar pesticidas agrícolas e são importantes agentes de mineralização de matéria orgânica (Perry e Staley, 1997).

As *Arthrobacteria* são bactérias esféricas e de tamanho uniforme, na sua fase estacionária de crescimento. São caracterizadas pelo seu pleomorfismo (propriedade de certos seres inferiores apresentarem diferentes formas ao longo da vida) e variabilidade Gram, ou seja, estas bactérias são Gram-negativas, no início da fase de crescimento, tornando-se Gram-positivas em fases posteriores (Paul e Clark, 1989). Estas bactérias são nutricionalmente versáteis, usando uma variedade de substratos no seu metabolismo oxidativo incluindo nicotina, ácidos nucleicos e vários herbicidas e pesticidas. A temperatura óptima de crescimento situa-se entre 25-30 °C e a sua cápsula contém glucose, galactose e ácido manurónico (Neidhart *et al.*, 1990).

Estudos indicam que pelo menos duas espécies de *Arthrobacter*, *Arthrobacter globiformis* e *Arthrobacter nicotianae*, exibem metabolismo anaeróbio. Em camadas superiores do solo habitadas por *Arthrobacteria*, as mudanças na concentração de oxigénio são frequentes e estas espécies de *Arthrobacter* tiveram de adoptar estratégias de crescimento independentes do oxigénio de modo a sobreviver a períodos de limitação no teor de oxigénio. Estas espécies usam nitrato como aceitador de electrões no final da cadeia respiratória, reduzindo-o para amónia via nitrito (Eschbach *et al.*, 2003).

### **Bacillus sp.**

Em 1872, Ferdinand Cohn, um estudante de Robert Koch (Heinrich Hermann Robert Koch, médico, patologista e bacteriologista alemão; foi um dos fundadores da microbiologia e um dos principais responsáveis pela actual compreensão da epidemiologia das doenças transmissíveis), reconheceu e deu o nome à bactéria *Bacillus subtilis*. Este acontecimento é o primeiro relato da descoberta de uma bactéria do género *Bacillus* (Handelsman, 2004).

As bactérias do género *Bacillus* são em forma de bastonete, Gram-positivas, aérobias obrigatórias ou facultativas (Turnbull, 1996). Ubíquas na Natureza, incluem espécies patogénicas e não patogénicas. Em condições ambientais extremas, as células produzem endosporos ovais que podem permanecer “adormecidos” por longos períodos de tempo. Estas características originalmente definiam o género, mas actualmente nem todos os elementos deste género apresentam estas características (Madigan e Martinko, 2005).

A inusual resistência dos seus endosporos a agentes químicos e físicos, o desenvolvimento de um ciclo de formação de endosporos, a produção de antibióticos, a toxicidade dos seus esporos para muitos insectos e a espécie patogénica *Bacillus anthracis*, atraíram atenção contínua para o género desde o tempo de Koch. Existe uma grande diversidade na fisiologia entre os membros do género e actualmente as características dos membros deste género incluem: a degradação de quase todos os substratos derivados de plantas e animais, incluindo celulose, amido, pectina, proteínas, agar, hidrocarbonetos e outros; a produção de antibióticos, a nitrificação e desnitrificação, a fixação de azoto, a autotrofia, a acidofilia (capacidade para viver em ambientes ácidos), a termofilia, o parasitismo e a formação de esporos (Turnbull, 1996).

### **Escherichia sp.**

O nome deste género de bactérias provém do seu descobridor, Theodor Escherich, médico austríaco, que viveu nos finais do século XIX. Dentro deste género, a bactéria *Escherichia coli* foi e é muito estudada enquanto modelo geral para os mecanismos biológicos das bactérias (FDA, 2002).

*Escherichia* é um género de bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, em forma de bastão, da família *Enterobacteriaceae* (Madigan e Martinko, 2005). Habitantes do tracto gastrointestinal dos animais de sangue quente, as espécies do género *Escherichia* proporcionam uma dose de vitamina K aos seus

hospedeiros. Algumas das espécies de *Escherichia* são patogénicas para os humanos (Guentzel, 1996) e são conhecidas como a causa mais comum de infecções do aparelho urinário (Ronald, 2003), de doenças do foro gastrointestinal desde a diarreia à disenteria (Madigan e Martinko, 2005), bem como a uma gama alargada de outros estados patogénicos. Enquanto a *Escherichia coli* é a responsável pela grande maioria das doenças provocadas por bactérias do género *Escherichia*, outros membros deste género são também causadores de doenças em seres humanos (Pien *et al.*, 1985; Chaudhury *et al.*, 1999).

A *Escherichia coli* é um dos poucos seres vivos capazes de produzir todos os componentes da sua constituição a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes. Possui fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia. Muitas produzem exotoxinas. São muito sensíveis aos ambientes secos, incompatíveis com a sua sobrevivência. Possuem lipopolissacarídeos (LPS), como todas as bactérias Gram-negativas. Os lipopolissacarídeos activam o sistema imunitário de forma desproporcionada e a vasodilatação excessiva provocada pelas citocinas produzidas pode levar ao choque séptico e morte em casos de septicémia.

### **Streptococcus sp.**

*Streptococcus* sp. são bactérias com forma de coco, Gram-positivas e causadoras de doenças no ser humano. A maioria das espécies no entanto é inofensiva. São dos patogénicos mais comuns. Os cocos agrupam-se em colónias lineares ou aos pares. São imóveis, já que não possuem órgãos de locomoção (como flagelos e cílios). Nenhum fabrica a enzima catalase, sendo portanto catalase-negativos, uma distinção importante em relação ao género *Staphylococcus*. Todos os estreptococos são anaeróbios facultativos, podendo viver na ausência de oxigénio (fermentando os nutrientes em ácido láctico) mas preferindo a sua presença (Ryan e Ray, 2004).

As bactérias do género *Streptococcus* são classificadas de acordo com a sua capacidade de provocar lise (morte celular) em eritrócitos hemolíticos: na fracção alfa (hemolise incompleta), na fracção beta (hemolise total) ou na fracção gama (nenhuma hemolise) (Patterson, 1996). Também podem ser classificadas de acordo com os carboidratos nas suas membranas, de acordo com a classificação de Rebecca Lancefield, uma microbiologista americana, classificação essa ainda em vigor (Lancefield 1933; Facklam, 2002):

1. Grupo A: *Streptococcus pyogenes* é o mais importante representante deste grupo e sendo beta-hemolítico causa a faringite estreptocócica, a mais comum forma de faringite.
2. Grupo B: A espécie mais importante é o *Streptococcus agalactiae*, que pode ser beta ou gama-hemolítico. Causa meningite em neonatos.
3. Grupo C: Aqui destaca-se a espécie *Streptococcus pneumoniae* que é alfa-hemolítica e causa pneumonia.
4. Grupo D: Inclui o importante grupo das *Streptococcus viridans* (não são uma espécie mas antes um grupo de espécies de características muito similares). São frequentes nos dentes e podem causar abscessos dentários ou endocardite. Muitos dos primitivos elementos deste grupo D foram posteriormente reclassificados e colocados no género *Enterococcus* (que inclui as espécies *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans* e *S. avium*) (Ruoff, 1990).

## 2.5.2- Biofilmes: Ciência e Aplicações

### 2.5.2.1- Conceito e importância

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades de microrganismos ligados a uma superfície (O'Toole *et al.*, 2000; Le Cloirec *et al.*, 2003). De acordo com Jefferson (2004) existem quatro potenciais incentivos à formação de biofilmes:

- 1- Defesa (protecção contra condições adversas): os biofilmes resistem melhor a condições desfavoráveis como por exemplo à privação de nutrientes, mudanças de pH, aos radicais de oxigénio, a desinfetantes e antibióticos, à fagocitose, do que as células livres;
- 2- Colonização (formação de biofilme como mecanismo para permanecer num nicho favorável): os microrganismos desenvolvem inúmeras estratégias de sobrevivência e uma delas prende-se com a fixação a ambientes favoráveis. Quando em ambiente ideal os microrganismos libertam proteínas para a sua superfície, chamadas MSCRAMM's (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules), que normalmente desempenham um papel chave nas fases iniciais de adesão dos microrganismos a superfícies sólidas (Patti *et al.*, 1994);
- 3- Comunidade (utilização de benefícios cooperativos): existem algumas semelhanças entre biofilmes bacterianos e organismos multicelulares. Por exemplo, as bactérias,

mesmo na forma isolada, podem pressentir alterações no meio que as rodeia e isso permite-lhes ajustar os seus processos metabólicos de modo a maximizar o uso de substratos disponíveis e a aumentar a protecção às condições adversas. Quando as bactérias crescem na forma de biofilme, estas alterações a nível de processos metabólicos podem ser divididas/partilhadas pelas bactérias de modo a existir uma diferenciação celular (células com diferentes fins) como nos organismos multicelulares;

- 4- Modo espontâneo de crescimento: em laboratório, as bactérias geralmente crescem na forma livre, mas o utópico microcosmos criado nos recipientes de cultura foi desenhado para maximizar as taxas de crescimento das bactérias e não para reproduzir as condições ambientais normais das bactérias. As bactérias passam a maior parte da sua existência natural crescendo como biofilmes. É possível que a existência de um suporte apropriado para a ligação, seja condição única para estimular a formação do biofilme. Existem muitas evidências de que imediatamente após a adesão inicial das bactérias a um suporte sólido, começam a ocorrer alterações nos genes reguladores (O'Toole *et al.*, 2000; Kuchma e O'Toole, 2000). Isto sugere que as células efectivamente pressentem as superfícies sólidas às quais se ligam e este sinal funciona como estímulo em cascata, ou seja transmite às células próximas o modelo para a formação do biofilme.

Os biofilmes podem ter efeitos tanto benéficos como prejudiciais no meio ambiente, na saúde humana e nos equipamentos industriais. São exemplos de biofilmes benéficos, os biofilmes fixados a suportes sólidos no interior dos bio-reactores de tratamento de efluentes, onde os microrganismos contribuem para a degradação da poluição. A utilização de *Acetobacter* na produção de vinagre por oxidação biológica do etanol e a extracção de cobre por lixiviação microbiológica são outros exemplos da utilidade dos biofilmes microbianos (Bryers, 1994). Por outro lado, os filmes biológicos que aderem e crescem em permutadores de calor, em membranas de osmose inversa e em circuitos de distribuição de água são indesejáveis pois fazem aumentar a queda de pressão, provocam corrosão, introduzem resistências térmicas nos permutadores de calor e contaminam a água de abastecimento público (Melo, 1994).

A acumulação/sequestro de iões metálicos com recurso a biofilmes é relatada por diversos autores: Quintelas e Tavares (2001, 2002) usaram um biofilme de *Arthrobacter viscosus* para remover Cr (VI), Cd (II), Pb (II) e Fe (II) e Quintelas *et al.* (2006) utilizaram um biofilme da mesma bactéria para remover clorofenol, ortocresol e fenol com ou sem a presença de Cr

(VI). Kang *et al.* (2006) aplicaram um biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* para remover Cr (III), Ni (II) e Co (II) e Leonhauser *et al.* (2006) estudaram o comportamento de um biofilme de *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas putida* na remoção de mercúrio. Quintelas *et al.* (2007a, 2007b) utilizaram três diferentes biofilmes, de *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* e *Streptococcus equisimilis*, para a remoção de Cr (VI). A utilização conjunta dum biofilme suportado em GAC com um biofilme suportado em zeólitos naturais foi testada por Lameiras (2007). Singh *et al.*, (2006) realizaram um elaborado trabalho de revisão sobre a formação e regulação de biofilmes, a importância da transferência de genes e discutiram a aplicação de processos de bioremediação com recurso a biofilmes.

### 2.5.2.2- Mecanismos de formação

Os mecanismos de formação de biofilmes têm sido estudados por vários autores. Palmer e White (1997) traçam em linha gerais os passos para as fases iniciais da formação de biofilmes que incluem interações célula-superfície (suporte) e célula-célula, seguido pelo desenvolvimento do biofilme maduro. Nessa altura, as determinantes moleculares requeridas para estes passos ainda não tinham sido identificadas, mas muitos dos pressupostos do modelo destes autores continuam a ser verdadeiros. Alguns estudos prévios sobre as fases iniciais da ligação de bactérias a suportes sugerem que modelos químicos simples podem explicar o comportamento das bactérias durante esta fase inicial de ligação (Marshall *et al.*, 1977; McEldowney e Fletcher, 1986; Grasso *et al.*, 1996; Fletcher, 1996). Embora estes passos químicos simples devam contribuir para as interações célula-superfície (suporte), os processos de ligação na fase inicial são muito mais complexos.

Os estudos sobre a formação de biofilmes indicam que os biofilmes são uma etapa estável num ciclo biológico que inclui iniciação, maturação, manutenção e dissolução (Figura 2.5.2.2.1). As bactérias parecem iniciar o desenvolvimento do biofilme em resposta a estímulos ambientais específicos tais como a disponibilidade de nutrientes. Estes biofilmes continuam o seu desenvolvimento de acordo com o grau de fornecimento de novos nutrientes, mas quando são privados dos mesmos, começam a desligar-se da superfície e voltam à forma isolada e livre de crescimento. A depleção local de nutrientes despoleta uma busca de fontes alternativas, de acordo com as adaptações que as bactérias sofrem quando os nutrientes se tornam escassos (O'Toole *et al.*, 2000).

A figura seguinte pretende representar de uma forma esquemática o modelo de desenvolvimento de biofilmes focado no parágrafo anterior.



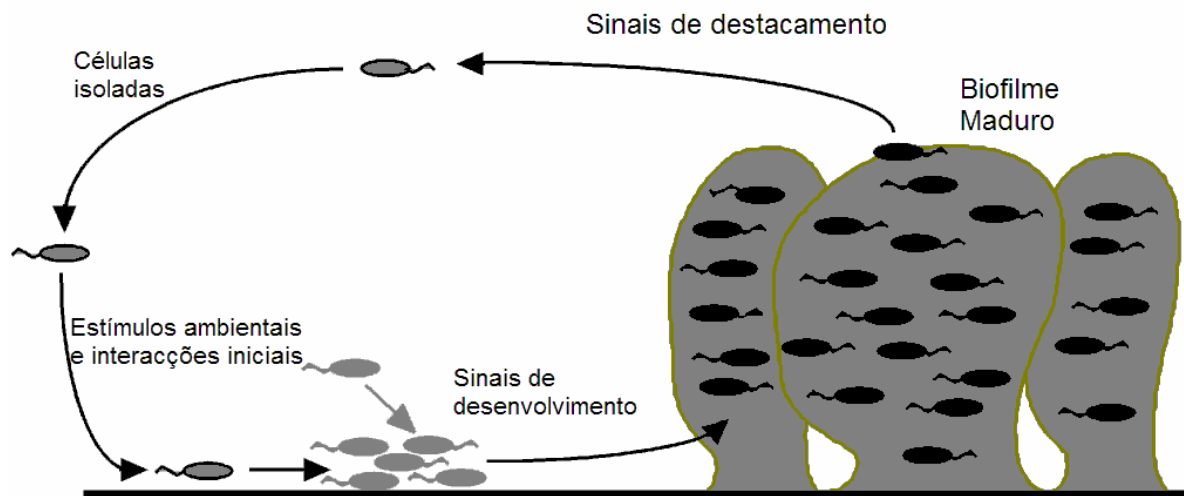


Figura 2.5.2.2.1- Modelo de desenvolvimento de um biofilme, segundo O’Toole *et al.*, 2000.

Na passada década foi desenvolvido outro estudo (Melo, 1994), no qual se afirmava que os principais fenómenos envolvidos na formação de biofilmes em contacto com um meio líquido são: formação de uma monocamada de moléculas orgânicas na superfície do suporte (“filme condicionador”), transporte de microrganismos e outras partículas para a superfície, adesão de microrganismos à superfície, transporte de nutrientes/substrato (tanto através do líquido para a interface líquido-biofilme, como no interior do filme microbiano), reacção bioquímica no interior da biopelícula (consumo de substrato, com crescimento dos microrganismos e produção de polímeros), transporte de metabolitos desde o interior da película microbiológica para o exterior, erosão superficial ou descolamento súbito (“sloughing off”) de porções de biofilme. Os processos envolvidos na formação e acumulação de biofilmes descritos por Melo (1994) foram mais tarde confirmados por Xavier *et al.* (2003).

Os fenómenos descritos por Melo (1994) e Xavier *et al.* (2003) encontram-se representados na Figura 2.5.2.2.2.

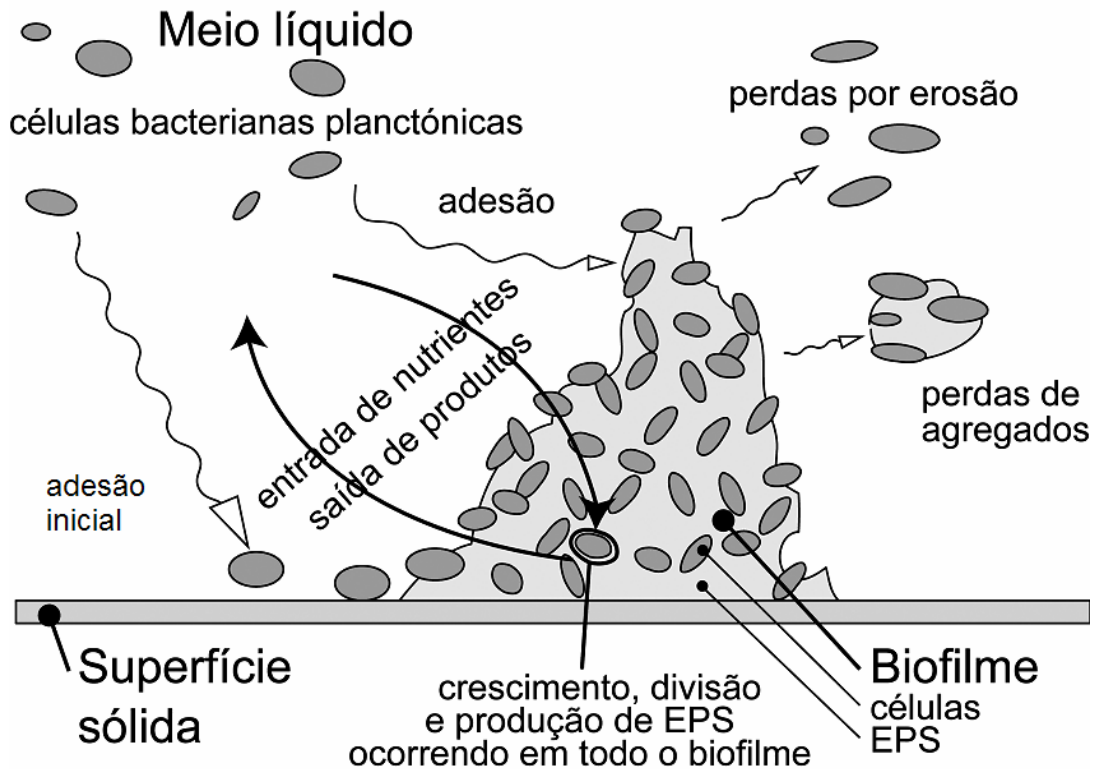


Figura 2.5.2.2.2- Etapas na formação de um biofilme segundo o modelo apresentado por Melo (1994) e Xavier *et al.* (2003) (Adaptado de Xavier *et al.* (2003)).

Ainda segundo estes autores, o estabelecimento da monocamada de moléculas orgânicas na superfície do suporte é rápida após o transporte e a adsorção ao suporte de moléculas orgânicas existentes no líquido. Estas moléculas podem formar cadeias poliméricas que, por interacção com a superfície dos microrganismos, estabelecem pontes suficientemente fortes para permitir aos microrganismos uma adesão estável. Uma vez constituída a primeira camada de microrganismos, a posterior adesão de outros microrganismos é favorecida.

O transporte de substrato/nutrientes é feito por difusão desde a superfície até ao interior do biofilme. O biofilme vai, deste modo, crescendo tanto em massa como em espessura, através da reprodução dos microrganismos e da segregação de polímeros extracelulares. Ao mesmo tempo, as forças hidrodinâmicas exteriores e outros fenómenos (produção de gás pelos microrganismos, por exemplo) provocam a erosão ou o deslocamento de partes do biofilme. Este efeito, contrário ao crescimento da película, é tanto mais intenso quanto maiores forem a espessura da película microbiana e a velocidade do líquido. Deste modo, o biofilme tende a atingir uma espessura máxima que se mantém quase constante ao longo do tempo, com flutuações à volta de um valor médio (Melo, 1994).

Uma vez estabelecido um ponto de apoio dos microrganismos a um suporte, estes começam a sofrer uma série de mudanças que lhes permitem adaptar-se à vida numa superfície. São estas mudanças que constituem uma nova área de investigação visto terem sido ainda pouco exploradas. As adaptações que entretanto já foram observadas incluem a produção/libertação de grandes quantidades de exopolissacáridos que podem proteger o biofilme e promover a resistência aos agentes biocidas (O'Toole, 2000).

### **2.5.2.3- A importância dos exopolissacáridos (EPS)**

A síntese de substâncias poliméricas extracelulares por parte das bactérias constitui um aspecto de especial relevância no desenvolvimento de biofilmes.

A composição principal dos EPS inclui uma complexa mistura de polielectrólitos macromoleculares tais como polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos (Omoike e Chorover, 2004), lípidos ou substâncias húmicas (Van Hullebusch *et al.*, 2003). Por outro lado, estas moléculas constituintes dos EPS contêm grupos funcionais ionizáveis tais como grupos carboxílicos, fosfóricos, amino e hidroxílicos (Van Hullebusch *et al.*, 2003). São várias as importantes funções que podem ser atribuídas aos EPS. Destacam-se a adesão a superfícies, a agregação de células bacterianas em flocos, a estabilização da estrutura flocular, a formação de uma barreira de protecção que confere ao biofilme resistência a biocidas ou outros agentes prejudiciais, a retenção de água, a sorção de compostos orgânicos exógenos que permite a acumulação de nutrientes a partir do ambiente e actividades enzimáticas, tais como a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutrientes metálicos (Comte *et al.*, 2006). De facto, a matriz de EPS é um meio que permite a cooperação e a comunicação entre as células promovendo agregados microbianos.

Algumas das funções anteriormente descritas têm um papel chave nos processos de bio-sorção. Aquino e Stuckey (2004) afirmam que na presença de crómio, a biomassa parece produzir mais EPS (principalmente produtos microbianos solúveis), indicando que tal pode ajudar a enfrentar com êxito o stress provocado pela presença de metais.

O importante papel dos EPS no processo de formação dos biofilmes- tanto nas fases iniciais como nas fases posteriores - é confirmada pelos estudos efectuados por Jefferson (2004), nos quais se compararam os genes necessários para a formação de um biofilme com os genes envolvidos na síntese de polissacáridos.

É extraordinário que a maioria dos microrganismos pareçam capazes de efectuar o seu percurso de vida na forma de biofilme, independentemente das suas capacidades fisiológicas. Existem estudos que sugerem que a hidrofobicidade global e/ou carga da superfície de uma bactéria podem servir como um bom indicador das superfícies/suportes que a mesma pode colonizar (Costerton *et al.*, 1995).

Neste trabalho de investigação foi usado como suporte para a formação do biofilme, o carvão activado granular (GAC), que será objecto de apresentação no ponto seguinte.

### **2.5.3- Carvão activado**

O uso de carvão nos mais variados processos remonta a tempos muito recuados. A utilização de carvão para a filtração de água para beber já era feita pelos Hindus na Índia e usado com fins medicinais (adsorvente e agente purificante) pelos Egípcios em 1500 a.C. (Cheremisinoff e Angelo, 1980).

O carvão consiste em material carbonizado a temperaturas e pressões elevadas. Existem carvões das mais variadas proveniências. De acordo com a matéria-prima que lhe deu origem, serão produzidos carvões com propriedades diferentes. As matérias-primas mais comuns utilizadas no fabrico de carvões activados incluem madeira, serradura, lenhite, turfa, carvão de pedra, cascas de coco e resíduos de petróleo (AWWA, 1971).

As características mais importantes na escolha do tipo de carvão são a estrutura porosa, tamanho das partículas e área superficial total (Clark, 1989). Após a selecção do material a usar, existem vários métodos que visam a activação do carvão. Este processo de activação consiste na “limpeza” dos espaços da rede cristalina por remoção de partículas soltas de carvão e na remoção de espécies adsorvidas na superfície. Existem dois tipos de activação (Mohan e Pittman Jr, 2006):

- 1- a activação física ou térmica, que envolve a carbonização a 500-600°C com o objectivo de eliminar a matéria orgânica, seguida de activação propriamente dita um gás oxidante como o CO<sub>2</sub>, vapor de água ou gás combustível a 800-1000°C para desenvolver a porosidade e a área superficial;
- 2- a activação química, que envolve a incorporação de aditivos inorgânicos: cloretos metálicos, como o cloreto de zinco ou o ácido fosfórico, KOH, sais de amónia,

boratos, óxido de cálcio, compostos férricos e ferrosos, dióxido de manganésio, sais de níquel, entre outros, no carvão antes da sua carbonização.

Ainda segundo aqueles autores, a diferença entre a activação química e a activação física reside no número de passos requeridos para a activação e na temperatura de activação. A activação química ocorre num passo enquanto a activação física necessita de dois passos, carbonização e activação. As temperaturas de activação nos processos de activação física situam-se entre os 800 e os 1000°C, sendo mais altas que as temperaturas utilizadas nos processos de activação química (200- 800°C).

Os carvões activados podem classificar-se em carvões ácidos e carvões básicos, de acordo com a classificação de Steenberg (Mattson e Mark Jr, 1971):

- 1- os carvões activados a temperaturas entre 200 e 400°C, chamados carvões L, geralmente desenvolvem superfícies acídicas e originam soluções de baixo valor de pH. Estes carvões adsorvem bases, são hidrofílicos e têm potencial zeta negativo;
- 2- os carvões activados a temperaturas na gama 800-1000°C, chamados carvões H, desenvolvem superfícies básicas e, em solução, fazem subir o valor de pH. Adsorvem ácidos e tem um potencial zeta positivo. No entanto, quando os carvões estão a arrefecer, se estiverem em contacto com o ar, o potencial zeta muda de positivo para negativo devido à formação de superfícies óxidas acídicas.

A indústria da água utiliza o carvão activado das mais variadas formas. O carvão activado em pó (PAC) é frequentemente usado para tratar os problemas relacionados com o odor e sabor da água. Mallevialle e Suffet (1992) referem também o seu uso na destruição do ozono residual e na prevenção da contaminação química. O PAC é depois removido da água por processos de coagulação, floculação e sedimentação.

O carvão activado granular (GAC) é usado em colunas de filtração nos processos tradicionalmente usados nas estações de tratamento de água para consumo humano. A camada de GAC pode ser revestida por microrganismos capazes de metabolizar compostos orgânicos presentes na água (Hoehn, 1996).

Os carvões activados, pela elevada área superficial, carácter microporoso e natureza química da sua superfície, elevada capacidade e velocidade de adsorção, são potenciais adsorventes para a remoção de metais pesados de águas residuais (Koby et al., 2005; Song et al., 2006).

A figura seguinte pretende ilustrar o carácter microporoso do carvão. É bem visível o sistema de poros e fissuras. Esta particularidade confere ao carvão uma elevada área superficial em comparação com a superfície exterior da partícula.

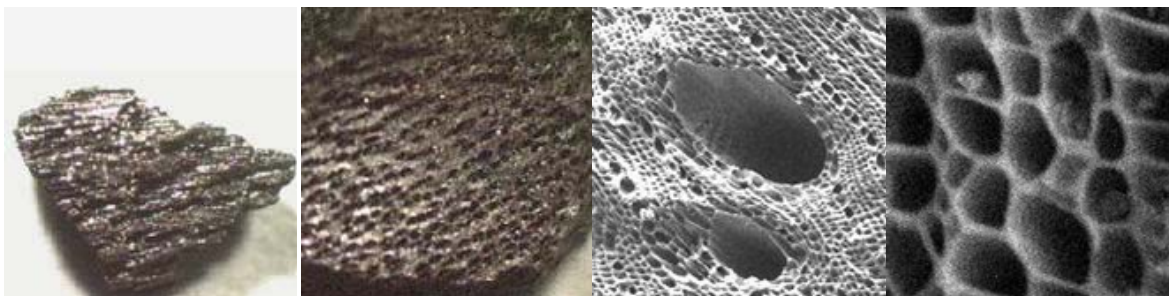


Figura 2.5.3.1- Estrutura microporosa do carvão (retirado de <http://ewr.cee.vt.edu/>).

A utilização conjunta de carvão activado com um biofilme foi efectuada pela primeira vez na década de 90 por Scott (Scott *et al.*, 1995; Scott e Karanjkar, 1998). Desde então vários trabalhos foram desenvolvidos utilizando diferentes microrganismos para a remoção de diferentes metais pesados, na presença ou não de compostos orgânicos. Destacam-se os trabalhos de Quintelas e Tavares (2002, 2001) e Quintelas *et al.* (2006, 2007a, 2007b).

#### **2.5.4- Mecanismos de bioissorção**

A complexidade da estrutura dos diversos microrganismos implica a existência de diferentes mecanismos para capturar iões metálicos por parte das células (Veglio e Beolchini, 1997). Assim, os mecanismos de bioissorção são também variados e em alguns casos ainda não completamente entendidos.

Segundo aqueles autores, os mecanismos de bioissorção podem ser classificados como dependentes ou como independentes do metabolismo celular.

De acordo com a localização na célula do metal removido à solução, a bioissorção pode ser classificada como:

- 1- acumulação extracelular/ precipitação
- 2- sorção à superfície da célula/ precipitação

3- acumulação intracelular.

A Figura 2.5.4.1 resume os vários mecanismos de bioissorção.

O transporte do metal através da membrana celular produz acumulação intracelular, a qual é dependente do metabolismo celular. Isto implica que este tipo de bioissorção só ocorra em células viáveis e normalmente associa-se ao sistema de defesa dos microrganismos, por reacção à presença de um metal tóxico. A bioissorção não é imediata pois requer um tempo de equilíbrio necessário à reacção do microrganismo (Figura 2.5.4.1, Veglio e Beolchini, 1997).

No caso em que ocorrem interacções físico-químicas entre o metal e os grupos funcionais da superfície das células, baseadas em adsorção física, troca iónica e complexação, existe uma sorção na superfície celular, a qual é independente do metabolismo (Figura 2.5.4.1). As paredes celulares da biomassa microbiana, maioritariamente compostas por polissacarídeos, proteínas e lípidos, oferecem grande quantidade de grupos funcionais capazes de capturar iões metálicos, como sejam os grupos carboxílicos, hidroxílicos, sulfato, fosfato e grupos amino. Este fenómeno físico-químico de bioissorção de metais, independente do metabolismo, é relativamente rápido e pode ser reversível (Kuyucak e Volesky, 1988). Predominando este mecanismo, na realidade o mecanismo mais comum, a biomassa apresenta todas as características químicas duma resina de troca iónica ou de um carvão activado, revelando, assim, enormes vantagens a nível industrial, fundamentalmente pela possibilidade de dessorção e de reutilização da biomassa.

A eventual precipitação pode ocorrer tanto em solução como na superfície das células (Ercole *et al.*, 1994). Além disso, pode ser dependente do metabolismo celular se, na presença de metais tóxicos, o microrganismo produzir compostos que favorecem o processo de precipitação. Por outro lado, a precipitação pode ser independente do metabolismo das células, ocorrendo após uma interacção química entre o metal e a superfície celular.

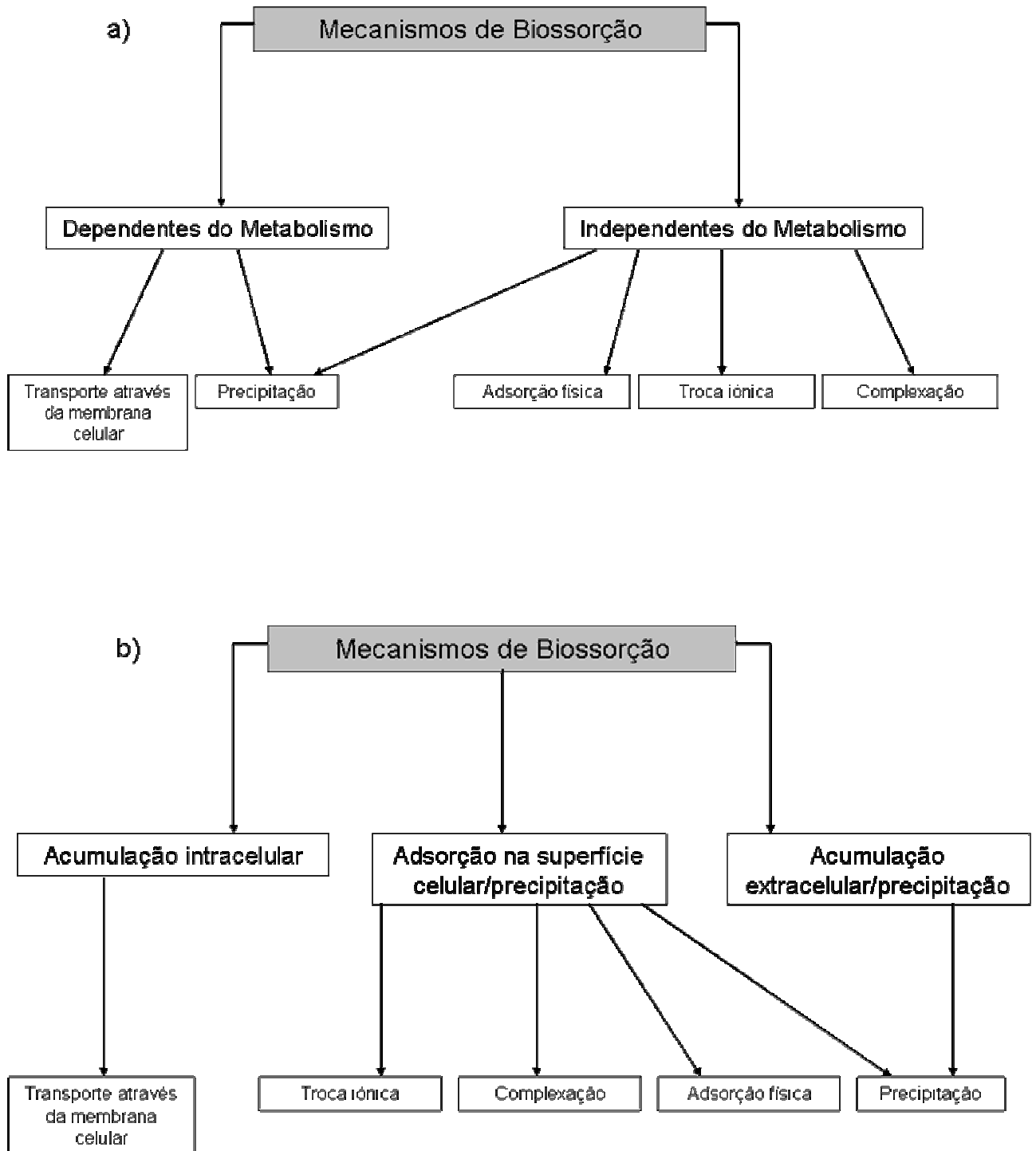


Figura 2.5.4.1- Mecanismos de bioacumulação. Em a) Classificação de acordo com a dependência em relação ao metabolismo celular, em b) Classificação de acordo com a localização do metal removido (Veglio e Beolchini, 1997).



A biossorção de íons metálicos em soluções aquosas por biofilmes foi estudada por Le Cloirec (2003), que estabeleceu e discutiu os mecanismos de interação entre os íons metálicos e os biofilmes em termos de difusão, transferência de massa e sorção.

Segundo este autor, o mecanismo de biossorção correspondente à transferência dos íons da solução para o biofilme e às interações entre os íons e o biofilme, é descrito por vários passos que se encontram representados esquematicamente na Figura 2.5.4.2.

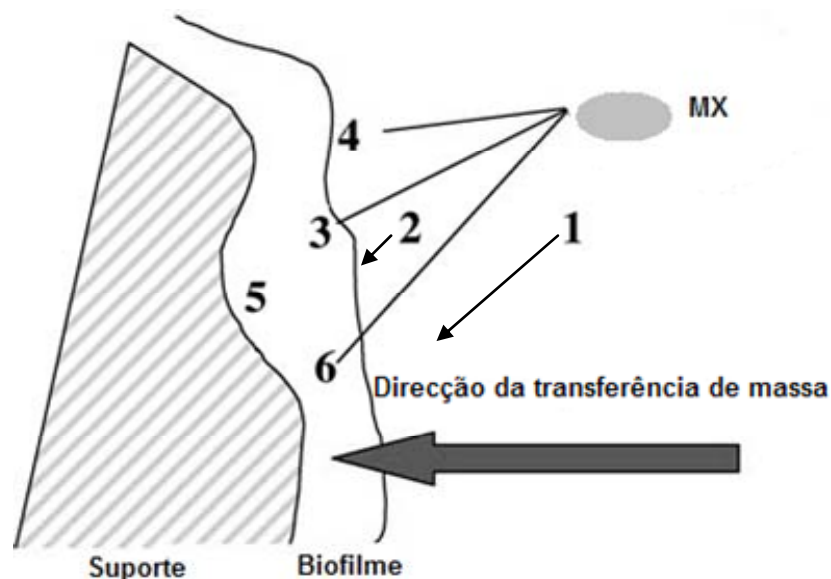


Figura 2.5.4.2- Representação esquemática dos mecanismo de remoção de íons metálicos incluindo difusão no líquido-bioacumulação-biossorção-difusão no biofilme; MX representa o íon metálico (Adaptado de Le Cloirec *et al.*, 2003).

Os diferentes passos, representados na figura, podem ser descritos da seguinte forma:

- 1- difusão massiva: os íons metálicos presentes na solução difundem para a superfície externa do biofilme, devido aos gradientes de concentração de soluto existentes entre a solução e o sólido;
- 2- transferência de massa externa: a transferência de massa ocorre ao longo da camada limite sobreposta ao biofilme; a espessura da camada é função da turbulência do sistema;

- 3- o íon metálico interage muito rapidamente com o biofilme e especialmente com a parede das bactérias. Estas interações parecem ser complexas e os mecanismos podem ser resultado de múltiplos passos onde se inclui:
- bioacumulação- ocorre somente em células vivas e é uma das possíveis interações entre microrganismos e íons metálicos em solução que passam por caminhos metabólicos; os metais são incorporados e participam em todas as fases do crescimento microbiano, alguns serão mesmo essenciais para a realização de funções biológicas;
  - oxidação e/ou redução por enzimas de modo a obter um composto menos tóxico, como por exemplo, a redução de Hg (II) a Hg por parte de uma dehidrogenase presente no citoplasma;
  - produção de enzimas capazes de degradar compostos orgânicos e/ou metálicos;
  - precipitação extracelular por metabolitos produzidos por bactérias;
  - complexação extracelular de íons metálicos que pode ocorrer por interação com compostos quelantes ou com compostos orgânicos como, por exemplo, o acetato, gluconato e citrato, presentes nos biofilmes;
  - bioadsorção na superfície das bactérias, que inclui mecanismos como adsorção (interações de Van der Waals), troca iónica, complexação, quelação e precipitação (Volesky, 1990);
- 4- lenta difusão à superfície: após uma interação fraca, os íons difundem na superfície do bioadsorvente, neste caso, a difusividade é muito baixa e os íons metálicos interagem com as paredes das bactérias de acordo com os mecanismos descritos no passo 3;
- 5- difusão para o interior do biofilme antes das reações de interação com as bactérias;
- 6- interações com as bactérias presentes no interior do biofilme sendo os mecanismos similares aos descritos no passo 3.

Mais recentemente, Mohan e Pittman Jr. (2006) referem que a adsorção de Cr (VI) por bioadsorventes consiste em dois tipos de uptake:

- 1- os íons de crómio hexavalente são removidos por adsorção no interior do bioadsorvente;

- 2- o Cr (VI) é reduzido a Cr (III) e este estado trivalente é adsorvido à superfície externa do bioissorvente.

Os parâmetros principais que condicionam o mecanismo de bioissorção de Cr (VI)/Cr (III) são: pH, temperatura, grau de mistura ou gradiente de velocidade, concentração de crómio, tamanho das partículas, quantidade e tipo de bioissorvente.

A investigação sobre as interações entre os bioissorventes e as espécies iónicas presentes em solução (protões, metais pesados, alcalinos e alcalino-terrosos) é um passo fundamental para o aumento da “performance” de bioissorção e para a optimização das condições de operação. Neste sentido, os modelos de equilíbrio/cinética são importantes ferramentas matemáticas para generalizar os sistemas de bioissorção ao tratamento de efluentes industriais reais e para identificar condições óptimas de operação (Pagnanelli *et al.*, 2005).

No ponto seguinte serão discutidos os modelos utilizados para descrever os processos de bioissorção referidos nesta dissertação, tanto para os ensaios em sistema fechado (descontínuo) como para os ensaios em sistema aberto (contínuo).

### **2.5.5- Bioissorção aplicada à remoção de compostos orgânicos**

Vários autores têm estudado a remoção de compostos orgânicos: destacam-se os trabalhos efectuados por Aktas e Çeçen (2007) que estudaram a remoção de 2-clorofenol por quatro tipos de carvão activado e fizeram estudos de biodegradação e bioregeneração utilizando lamas activadas; os estudos de Radhika e Palanivelu (2006) que utilizaram carvões preparados a partir de casca de coco para a remoção de *p*-clorofenol e 2, 4, 6 – triclorofenol e fizeram a comparação dos resultados com os obtidos utilizando carvão activado comercial e concluíram que as taxas de remoção são bastante similares; os trabalhos de Wu e Yu (2006, 2007) que utilizaram um fungo, *Phanerochaete chrysosporium*, para a remoção de 2, 4 – diclorofenol, 2 – clorofenol, 4 – clorofenol e fenol e, ainda, os de Rubín *et al.* (2006) com a alga castanha, *Sargassum muticum*, para a remoção dos mesmos compostos. Wu e Yu concluíram que o fungo utilizado apresentava melhores resultados de remoção para o fenol enquanto os segundos chegaram à conclusão que a alga castanha por eles utilizada removia mais eficazmente o 4- clorofenol. Estudos mais aprofundados da remoção de fenol foram efectuados por Cañizares *et al.* (2006) e por Przepiórski (2006), com carvões modificados, por Efremenko e Sheintuch (2006) que estudaram a capacidade de adsorção, selectividade e estrutura porosa do carvão usando como modelo a remoção de fenol e por Vasquez *et al.*, (2006) que utilizaram um resíduo florestal, casca de pinheiro- *Pinus pinaster*, para ensaios

de equilíbrio e de cinética. Estudos de remoção de *o*-cresol são mais raros, no entanto destacam-se os de Eren e Afsin (2007) que estudaram a remoção de cresol usando argilas de troca catiónica, os de Wernert *et al.* (2006) que estudaram a adsorção de cresol em membranas de diálise e zeólitos e os de Lin *et al.* (2006) que testaram a adsorção deste composto em argilas e posterior tratamento com membranas de filtração. A utilização de microrganismos para a remoção de cresóis foi estudada por Tallur *et al.* (2006) que estudaram a biodegradação de *p*-cresol por *Bacillus* sp e concluíram que esta bactéria é capaz de utilizar *p*-cresol como fonte de carbono e energia. Estes autores afirmam que os microrganismos desempenham um papel vital na biodegradação de compostos tóxicos presentes no ambiente e que a bioremediação é o método mais eficiente em termos de relação custo-benefício para a completa destruição de poluentes orgânicos. Estudos desenvolvidos por Ryan *et al.* (2007) com o fungo *Trametes versicolor* permitiram obter uptakes de  $0.125 \text{ g}_{\text{fenol}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$  e de  $0.231 \text{ g}_{\text{o-cresol}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ , por dia de utilização do sistema. A remoção de crómio em conjunto com um composto orgânico, no caso o pentaclorofenol, foi estudada por Srivastava *et al.*, (2007), que utilizou três diferentes estirpes de bactérias e um fungo para remover estes compostos de um efluente proveniente da indústria de curtumes. Aksu e Akpinar (2001) estudaram a remoção conjunta de crómio e fenol utilizando um sistema anaeróbio de lamas activadas secas e Aksu e Gönen (2006) removeram os mesmos compostos utilizando lamas activas imobilizadas.

A utilização de células imobilizadas de bactérias do género *Arthrobacter* foi recentemente alvo de um estudo tendo em vista a degradação de fenol (Karigar *et al.*, 2006). Estes autores concluíram que células imobilizadas de *Arthrobacter citreus* são capazes de remover 5 mM (~ 0.47 mol/l) de fenol num período de 24h.

### 2.6- Modelação de sistemas de biossorção

O conhecimento de todos os fenómenos envolvidos num sistema de biossorção de metais pesados assume especial importância quando está em causa a redução da razão custo/benefício do mesmo sistema.

As experiências em sistemas descontínuos (sistemas fechados ou sistemas semi-contínuos) proporcionam informação fundamental sobre o comportamento dos materiais utilizados como biossorbentes, mas deve ser tido em mente que o fenómeno de biossorção revela-se diferente em processos contínuos e descontínuos, mesmo quando o mesmo material

biossorvente é utilizado. Por exemplo, o tamanho das partículas conserva-se normalmente maior em sistemas de leito fixo que em sistemas com agitação, e portanto o fenómeno de difusão interna é um parâmetro com mais influência no primeiro caso. Mas a diferença fundamental consiste no facto da concentração de soluto nunca atingir o equilíbrio em sistemas contínuos, pois existe uma chegada contínua de soluto à coluna (Rozada *et al.*, 2007).

Para representar de forma adequada um processo de remoção de metais pesados num sistema de colunas de leito fixo, é preciso fazer uma análise matemática do sistema, de modo a se descrever com fidelidade a curva de breakthrough do mesmo. Uma curva de breakthrough típica é representada como a razão entre a concentração de metal à saída do sistema e a concentração de entrada, em função do tempo de operação. A eficiência do processo de adsorção/biossorção pode ser estimada pela forma da curva de breakthrough do leito (Borba *et al.*, 2006). A determinação das dimensões mais adequadas a uma coluna de leito fixo utilizada para biossorção requer a aplicação de modelos matemáticos. A validação destes mesmos modelos é feita pela comparação entre as curvas de breakthrough experimentais e as curvas obtidas através das equações matemáticas. Os modelos desenvolvidos poderão então ser aplicados ao projecto e optimização dos processos à escala piloto e industrial. Os parâmetros obtidos a partir desses modelos matemáticos, permitem obter as variáveis operacionais óptimas, assim como as dimensões adequadas da coluna ou reactor, adaptadas ao sistema que se pretende avaliar.

Apesar dos modelos a seguir descritos se destinarem a fenómenos de adsorção, a sua aplicação a sistemas de biossorção tem sido largamente utilizada.

### **2.6.1- Isotérmicas de equilíbrio de adsorção**

O estudo das isotérmicas de adsorção/biossorção permite a obtenção de parâmetros descritivos das capacidades de fixação dos biossorbentes utilizados.

Vários investigadores representam os seus dados de equilíbrio de biossorção na forma de isotérmicas de adsorção, tais como as de Langmuir, Freundlich, Radke e Prausnitz, Reddlich-Petterson, Brunhauer, Emmett e Teller (BET) e Dubinnin-Radushkevich, entre outras.

Segundo Volesky (1999), o método mais apropriado para avaliar a capacidade de um bioissorvente é fazendo uma análise global da respectiva isotérmica de sorção. Qualquer outro método representa um potencial caminho para conclusões erróneas.

Os modelos das isotérmicas de adsorção são usados para descrever dados de sorção, ou, por outro lado, para descrever como o adsorbato interage com o adsorvente. Neste estudo foram testados seis diferentes modelos de isotérmicas e será feita de seguida uma breve descrição dos mesmos.

### 2.6.1.1- Modelo de Langmuir

Em 1918, Langmuir desenvolveu um modelo teórico para as isotérmicas de equilíbrio de adsorção onde se estabelece uma relação entre a quantidade de gás adsorvido por uma superfície e a pressão do gás. Esta isotérmica assume uma adsorção monocamada sobre uma superfície adsorvente homogénea. O modelo de adsorção de Langmuir pode ser expresso da seguinte forma:

$$Q_e = \frac{Q_{máx} b C_e}{1 + b C_e} \quad (1)$$

Nesta expressão,  $Q_e$  (mg/g) representa a quantidade de ião metálico adsorvido, no equilíbrio,  $Q_{máx}$  (mg/g) representa a capacidade máxima de adsorção, ambas normalizadas pela massa de adsorvente,  $C_e$  (mg/l) representa a concentração de metal em solução, no equilíbrio, e  $b$  (l/mg) é a constante de equilíbrio de adsorção (constante de Langmuir).

### 2.6.1.2- Modelo de Freundlich

Freundlich (1906) foi o primeiro a desenvolver uma equação capaz de representar uma isotérmica de adsorção. Esta equação, na forma exponencial, assume que a quantidade adsorvida tende para infinito, correspondendo à adsorção em camadas múltiplas e sobrepostas (Figueiredo e Ramoa Ribeiro, 1989). Este modelo empírico pode ser aplicado à adsorção não-ideal em superfícies heterogéneas e pode ser representado por:

$$Q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (2)$$

Aqui  $Q_e$  e  $C_e$  representam respectivamente, a quantidade de ião metálico adsorvido no equilíbrio, normalizada pela massa de adsorvente, e a concentração de metal em solução, no equilíbrio. As constantes  $K_f$  e  $n$  estão relacionadas com a capacidade e intensidade de adsorção, respectivamente.

A equação de Freundlich está de acordo com a equação de Langmuir para gamas de concentração moderadas mas, ao contrário da expressão de Langmuir, a equação de Freundlich não se pode reduzir a uma isotérmica linear (Lei de Henry) para concentrações baixas. Ambas as teorias apresentam a desvantagem de os dados de equilíbrio acima de uma certa gama de concentrações não poderem ser ajustados com um só conjunto de parâmetros (Allen *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2004).

### 2.6.1.3- Modelo de Redlich-Peterson

Redlich e Peterson (1959) propuseram o primeiro modelo de isotérmica contendo três parâmetros, o qual incorpora características de ambos os modelos Langmuir e Freundlich. Esta equação pode ser usada para representar equilíbrios de adsorção para uma gama alargada de concentrações e pode ser descrita como de seguida:

$$Q_e = \frac{K_R C_e}{1 + a_R C_e^\beta} \quad (3)$$

$K_R$  (l/g),  $a_R$  (l/mg) e  $\beta$  (a variar entre 0 e 1) são parâmetros empíricos sem significado físico (Vilar *et al.*, 2006). A baixos valores de concentração, a isotérmica de Redlich-Peterson aproxima-se da Lei de Henry e a altos valores de concentração o seu comportamento aproxima-se do modelo de Freundlich.

### 2.6.1.4- Modelo de Sips (ou modelo de Langmuir-Freundlich)

Sips, em 1948, propôs uma nova equação que pode ser representada por:

$$Q_e = \frac{K_s C_e^{1/bs}}{1 + a_s C_e^{1/bs}} \quad (4)$$

$K_S$  ( $l^{b_S}mg^{1-b_S}/g$ ) representa a capacidade máxima de adsorção,  $a_S$  ( $l/mg$ ) <sup>$b_S$</sup>  é um parâmetro relacionado com a afinidade para com o adsorvente e  $b_S$  é um parâmetro empírico que varia com o grau de heterogeneidade da superfície (Calace *et al.*, 2002). Esta equação é também chamada de isotérmica de Langmuir-Freundlich e o nome deriva do comportamento restritivo da equação. A baixos valores de concentração de adsorbato a equação reduz-se, efectivamente, à isotérmica de Freundlich e não obedece à Lei de Henry. A valores de concentração de adsorbato elevadas, a equação descreve a adsorção em monocamada, característica da isotérmica de Langmuir (Vijayaraghavan e Yun, 2007).

### 2.6.1.5- Modelo de Toth

Derivada a partir da teoria potencial, a equação de Toth (1971) é usada em sistemas heterogéneos. Esta assume uma distribuição quasi-Gaussiana, isto é a maioria dos sítios possuem uma energia de adsorção mais baixa do que o pico máximo de energia de adsorção. O modelo pode ser representado pela seguinte equação:

$$Q_e = \frac{K_t C_e}{(a_t + C_e)^{1/t}} \quad (5)$$

$K_t$  (mg/g),  $a_t$  e  $t$  representam as constants do modelo de Toth, sendo que  $K_t$  representa a capacidade de adsorção total,  $t$  é um parâmetro de dissociação e  $a_t$  (mg/l) corresponde à constante de equilíbrio da adsorção (Cañizares *et al.*, 2006).

### 2.6.1.6- Modelo de Dubinin-Radushkevich

Dubinin e Radushkevich (1947) afirmam que a curva característica da adsorção está relacionada com a estrutura porosa do adsorvente. A equação de Dubinin-Radushkevich é geralmente descrita como de seguida:

$$Q_e = q_D \exp (- B_D [RT \ln (1+1/C_e)]^2) \quad (6)$$

A constante,  $B_D$ , está relacionada com a energia livre média de adsorção por grama de adsorbato transferido para a superfície do sólido a partir duma distância infinita na solução e  $q_D$  representa a capacidade da monocamada (Sawalha *et al.*, 2006).  $T$  representa a temperatura (K) e  $R$  é a constante universal dos gases ideais.



O método mais simples para determinar os parâmetros das isotérmicas em modelos com apenas dois parâmetros (Langmuir, Freundlich and Dubinin-Radushkevich) consiste em linearizar a equação e aplicar uma regressão linear. Para as outras equações, os parâmetros dos modelos podem ser determinados utilizando métodos de regressão não-linear usando para tal a ferramenta MATLAB.

## 2.6.2- Sistemas abertos de leito fixo

A previsão do perfil de concentração em função do tempo ou curva de breakthrough para o adsorvente é um dos requisitos para o êxito no design de um sistema de colunas de leito fixo para a biossorção de metais pesados em águas residuais.

Vários autores se têm dedicado ao estudo dos mais variados modelos capazes de prever o comportamento dum processo de biossorção. Destacam-se os trabalhos de Veglió (2003), Ramirez *et al.* (2007), Borba *et al.* (2006) e Gerente *et al.* (2007). Nesta dissertação foram adaptados ao sistema de biossorção constituído por um biofilme de *A. viscosus* suportado em GAC os modelos de Adams- Bohart (1920), Wolborska (1989) e Yoon e Nelson (1984). Estes modelos foram recentemente utilizados para prever a adsorção e biossorção de diversos compostos poluente. A título de exemplo citam-se os trabalhos de Rozada *et al.* (2007) que aplicaram o modelo de Yoon e Nelson para a adsorção de azul de metileno, de Malcok *et al.* (2006) que aplicaram o mesmo modelo para a adsorção de Cr (VI) por *Quercus ithaburensis* e ainda os de Vijayaraghavan e Prabu (2006) na remoção de cobre por *Sargassum wightii*. A aplicação dos modelos de Adams- Bohart e Wolborska foi efectuada por Pakshirajan e Swaminathan (2006) na biossorção de Pb, Cu e Cd, por *Phanerochaete chrysosporium* num reactor de leito compactado e por Aksu e Gönen (2004) aplicado à biossorção de fenol por lamas activadas immobilizadas num reactor compactado. Mais recentemente, Pamukoglu e Kargi (2007) usaram o modelo de Adams-Bohart para determinar a capacidade de biossorção do cobre num reactor semi-contínuo.

Nos pontos seguintes serão destacados os modelos de Adams-Bohart, Wolborska e Yoon e Nelson.

### 2.6.2.1- Modelo de Adams- Bohart

Em 1920, os investigadores Adams e Bohart definiram as equações fundamentais que descrevem a relação entre  $C/C_0$  (concentração de adsorbato à saída da coluna normalizada pela concentração inicial) e  $t$  (tempo) num sistema de fluxo para a adsorção de cloro em carvão. Apesar de o trabalho desenvolvido por Adams-Bohart ter sido realizado originalmente, com um sistema de adsorção gás-carvão, a sua adaptação a outros sistemas tem sido conseguida com sucesso. O modelo proposto assume que a capacidade de adsorção é proporcional à capacidade residual de adsorção do carvão activado e à concentração das espécies a adsorver. A transferência de massa obedece às seguintes equações:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -k_{AB}qC_b \quad (11)$$

$$\frac{\partial C_b}{\partial Z} = -\left(\frac{k_{AB}}{U_0}\right)qC_b \quad (12)$$

Nestas equações,  $k_{AB}$  representa uma constante cinética ( $l/(mg.min)$ ),  $C_b$  representa a concentração de adsorbato na solução dentro da coluna ( $mg/l$ ),  $q$  representa a concentração de adsorbato na fase sólida, na coluna em qualquer tempo ( $mg/l$ ),  $U_0$  representa a velocidade superficial ( $cm/min$ ) e  $Z$  representa a altura do leito ( $cm$ ). Para a resolução deste sistema de equações diferenciais foram consideradas duas condições:  $t \rightarrow \infty$  e  $q \rightarrow N_0$ , (onde  $N_0$  representa a concentração de saturação ( $mg/l$ )). Após a resolução do sistema de equações diferenciais, é obtida a seguinte equação com os parâmetros  $k_{AB}$  and  $N_0$ :

$$\ln \frac{C}{C_0} = k_{AB}C_0t - k_{AB}N_0 \frac{Z}{U_0} \quad (13)$$

A partir desta equação podem-se obter os valores dos parâmetros por regressão linear, para uma determinada altura do leito fixo e um dado caudal de alimentação.

### 2.6.2.2- Modelo de Wolborska

Wolborska (1989) propôs outro modelo capaz de descrever a dinâmica de adsorção usando equações de transferência de massa para a descrição de mecanismos de difusão na gama

de baixas concentrações da curva de saturação. A transferência de massa em sistemas de leito fixo pode ser descrita pelas seguintes equações:

$$\frac{\partial C_b}{\partial t} + U_0 \frac{\partial C_b}{\partial Z} + \frac{\partial q}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_b}{\partial^2 Z} \quad (14)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -v \frac{\partial q}{\partial Z} = \beta_a (C_b - C_s) \quad (15)$$

Aqui,  $C_s$  é a concentração na interface sólido/liquido (mg/l),  $D$  representa o coeficiente de dispersão axial ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ),  $v$  representa a velocidade de deslocação da interface ( $\text{cm}/\text{min}$ ) e  $\beta_a$  representa o coeficiente cinético de transferência de massa externa ( $1/\text{min}$ ). Para a resolução deste sistema de equações diferenciais foram impostas as condições:

- $C_s \ll C_b$ ,  $v \ll U_0$
- a difusão axial é insignificante:  $D \rightarrow 0$  quando  $t \rightarrow 0$ .

A solução deste sistema de equações diferenciais pode ser aproximada a:

$$\ln \frac{C}{C_0} = \frac{\beta_a C_0}{N_0} t - \beta_a (C_b - C_s) \quad (16)$$

com

$$\beta_a = \frac{U_0^2}{2D} \sqrt{((1 + 4\beta_0 D / U_0^2) - 1)} \quad (17)$$

O autor observou que em leitos curtos ou a caudais altos, a difusão axial é desprezável e  $\beta_a = \beta_0$  (sendo que  $\beta_0$  representa o coeficiente externo de transferência de massa com um coeficiente de dispersão axial negligenciável). A velocidade de migração da frente em estado estacionário é determinada a partir da equação seguinte, lei de Wicke:

$$v = \frac{U_0 C_0}{N_0 + C_0} \quad (18)$$

Aqui  $N_0$  representa a concentração de saturação referida no modelo de Adams-Bohart. A equação que define o modelo de Wolborska é equivalente à equação do modelo de Adams-Bohart se o coeficiente  $k_{AB}$  for igual a  $\beta_a/N_0$ . Então, a partir da representação do  $\ln C/C_0$  versus  $t$  também se obtém os parâmetros deste modelo.

### 2.6.2.3- Modelo de Yoon e Nelson

Yoon e Nelson (1984) desenvolveram um modelo simples para descrever o processo de adsorção e de breakthrough de adsorbatos em carvão activado. Este modelo é baseado na suposição de que a probabilidade de adsorção de uma molécula de adsorbato é inversamente proporcional à cobertura da superfície e à probabilidade de breakthrough (Azsu e Gönen, 2004; Vijayaraghanvan e Pradu, 2006). O modelo Yoon e Nelson pode ser escrito pela seguinte equação:

$$\ln \frac{C}{C_0 - C} = k_{YN}t - \tau k_{YN} \quad (19)$$

Os valores de  $k_{YN}$  e  $\tau$  podem ser determinados através da representação gráfica do  $\ln (C/(C_0-C))$  versus  $t$ . O parâmetro  $k_{YN}$  representa o coeficiente cinético ( $\text{min}^{-1}$ ) e  $\tau$  representa o tempo (min) necessário para atingir 50% de breakthrough pelo adsorbato.

## 2.6- Referências bibliográficas

- Acar YB, Alshwabkeh AN.** 1993. Principles of electrokinetic remediation. *Environmental Science Technology* 27: 2638-2647.
- Agrawal A, Kumar V, Pandey BD.** 2006. Remediation options for the treatment of electroplating and leather tanning effluent containing chromium- a review. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review* 27: 99-130.
- Ahluwalia SS, Goyal D.** 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater, *Bioresource Technology* 98: 2243-2257.
- Ahluwalia SS, Goyal D.** 2005. Removal of heavy metals by waste tea leaves from aqueous solutions. *Engineering in Life Sciences* 5: 158-162.
- Akar T, Tunali S.** 2006. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. *Bioresource Technology* 97: 1780-1787.
- Aksu Z, Akpinar D.** 2001. Competitive biosorption of phenol and chromium(VI) from binary mixtures onto dried anaerobic activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 7: 183-193.
- Aksu Z, Donmez G.** 2006. Binary biosorption of cadmium (II) and nickel (II) onto dried *Chlorella vulgaris*: co-ion effect on mono-component isotherm parameters. *Process Biochemistry* 41: 860-868.
- Aksu Z, Gönen F.** 2006. Binary biosorption of phenol and chromium (VI) onto immobilized activated sludge in a packed bed: Prediction of kinetic parameters and breakthrough curves. *Separation and Purification Technology* 49: 205- 216.
- Aksu Z, Gönen F.** 2004. Biosorption of phenol by immobilized activated sludge in a continuous packed bed: prediction of breakthrough curves. *Process Biochemistry* 39: 599- 613.
- Aktas O, Çeçen F.** 2007. Adsorption, desorption and bioregeneration in treatment of 2-chlorophenol with activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* 141: 769-777.

**Allen SJ, Gan Q, Matthews R, Johnson PA.** 2003. Comparison of optimised isotherm models for basic dye adsorption by kudzu. *Bioresource Technology* 88: 143-152.

**Allen SJ, McKay J, Porter JF.** 2004. Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. *Journal of Colloid Interfacial Science* 280: 322-333.

**Aquino SF, Stuckey DC.** 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research* 38: 255–66.

**Arica MY, Tuzun I, Yalçın E, Ince O, Bayramoglu G.** 2005. Utilisation of native, heat and acid-treated microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* preparation for biosorption of Cr(VI) ions. *Process Biochemistry* 40: 2351-2358.

**Arica MY, Bayramoglu G, Yilmaz M, Ince O, Bektas S, Genc O.** 2004. Biosorption of Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> by Ca-alginate and immobilized fungus *Funalia trogii*. *Journal of Hazardous Materials B* 109: 191-199.

**Avery S, Tobin J.** 1992. Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3883-3889.

**AWWA (American Water Works Association).** 1971. Handbook of Public Water Supplies. McGraw Hill, p. 439.

**Bai RS, Abraham TE.** 2003. Studies on chromium(VI) adsorption-desorption using immobilized fungal biomass. *Bioresource Technology* 87: 17-26.

**Barnett JA, Payne RW, Yarrow D.** 1983. In: *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press

**Barrera H, Ureña- Núñez F, Bilyeu B, Barrera- Díaz.** 2006. Removal of chromium and toxic ions present in mine drainage by *Ectodermis of Opuntia*. *Journal of Hazardous Materials B* 136: 846-853.

**Barros AJM, Prasad S, Leite VD, Souza AG.** 2007. Biosorption of heavy metals in upflow sludge columns. *Bioresource Technology* 98: 1418–1425.

- Bayramoglu G, Çelik G, Arica MY.** 2006. Studies on accumulation of uranium by fungus *Lentinus sajor-caju*. *Journal of Hazardous Materials B136*: 345-353.
- Beveridge TJ.** 1989 The role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual Review Microbiology* 43: 147-171.
- Bishnoi NR, Bajaj M, Sharma N, Gupta A.** 2004. Adsorption of Cr (VI) on activated rice husk carbon and activated alumina. *Bioresource Technology* 91:305–307.
- Bódalo A, Gómez JL, Gómez E, Hidalgo AM, Alemán A.** 2005. Viability study of different reverse osmosis membranes for application in the tertiary treatment of wastes from the tanning industry. *Desalination* 180: 277-284.
- Bohart G, Adams EQ.** 1920. Some aspects of the behaviour of charcoal with respect to chlorine, *Journal of the American Chemical Society* 42: 523-544.
- Borba CE, Guiraradello R, Silva EA, Veit MT, Tavares CRG.** 2006. Removal of nickel (II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: experimental and theoretical breakthrough curves. *Biochemical Engineering Journal* 30: 184–191.
- Bruzzone G, Ghelli G, Perrone D.** 1992. US patent 5, 112.583.
- Bryers JD.** 1994. Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2: 9-23.
- Calace N, Nardi E, Petronio BM, Pietroletti M.** 2002. Adsorption of phenols by papermill sludges. *Environmental Pollution* 118: 315-319.
- Cañizares P, Carmona M, Baraza O, Delgado A, Rodrigo MA.** 2006. Adsorption equilibrium of phenol onto chemically modified activated carbon F400. *Journal of Hazardous Materials B131*: 243–248.
- Cassano A, Molinari R, Romano M, Drioli E.** 2001. Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane processes- a review. *Journal of Membrane Science* 181: 111–126.

- Chaudhury A, Nath G, Tikoo A, Sanyal SC.** 1999. Enteropathogenicity and antimicrobial susceptibility of new *Escherichia* spp. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 17: 85-87.
- Cheremisinoff PN, Angelo CM.** 1980. Carbon adsorption applications, Carbon adsorption handbook. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, Michigan, 1-54.
- Chubar N, Carvalho JR, Correia MJN.** 2004. Heavy metals biosorption on cork biomass: effect of the pre-treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 238: 51-58.
- Churchill SA, Walters JV, Churchill PF.** 1995. Sorption of heavy metals by prepared bacterial cell surfaces. *Journal Environmental Engineering* 121: 706-711.
- Clark RM.** 1989. Granular Activated Carbon: Design, Operation and Cost. Lewis Publishers.
- Comte S, Guibaud G, Baudu M.** 2006. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry* 41: 815-823.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711-745.
- Das C, Patel P, De S, DasGupta S.** 2006. Treatment of tanning effluent using nanofiltration followed by reverse osmosis. *Separation and Purification Technology* 50: 291–299.
- Decreto-Lei 236/98** de 1 de Agosto de 1998. Diário da República Portuguesa
- Decreto-Lei 243/01** de 5 de Setembro de 2001. Diário da República Portuguesa
- Demir A, Arisoy M.** 2007. Biological and chemical removal of Cr (VI) from waste water: cost and benefit analysis. *Journal of Hazardous Material* (online 8 Janeiro 2007)
- Dionex.** 1996. Technical note 26 LPN 34398-01 1M 7/96. Dionex Corporation
- Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK.** 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:143–152.



- Dubinín MM, Radushkevich LV.** 1947. Equation of the characteristic curve of activated charcoal. *Chem. Zentr.* 1: 875.
- Duffus JH.** 2001. Heavy metals- a meaningless term. *Chemistry International* 23: 163- 167.
- Duncan JR, Brady D, Stoll A.** 1994. Biosorption of heavy metals cations by non-viable yeast biomass. *Environmental Technology* 15: 429-438.
- Efremenko I, Sheintuch M.** 2006. Predicting solute adsorption on activated carbon: fenol. *Langmuir* 22: 3614-3621.
- Ercole C, Veglio F, Toro L, Ficara G, Lepidi A.** 1994. Immobilisation of microbial cells for metal adsorption and desorption. In: *Mineral Bioprocessing II*. Snowbird, Utah.
- Eren E, Afsin B.** 2007. Effect of cation exchanged bentonites (CEBs) on the aggregation of a cresol based dye. *Dyes and Pigments* 72: 228- 232.
- Eschbach M, Möbitz H, Rompf A, Jahn D.** 2003. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiology Letters* 223: 227-230.
- Facklam R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 613-630.
- FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition.** 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual* (8th ed.).
- Fein JB, Daughney CJ, Yee N, Davis TA.** 1997. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61: 3319-3328.
- Ferraz A, Tavares T, Teixeira JA.** 2004. Cr (III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Journal* 105: 11-20.
- Ferro-García MA, Rivera-Utrilla J, Rodríguez-Gordillo J, Bautista-Toledo I.** 1988. Adsorption of zinc, cadmium and copper on activated carbon obtained from agricultural by-products. *Carbon* 26: 363-373.

- Figueira MM, Volesky B, Ciminelli VST, Roddick FA.** 2000. Biosorption of metals in brown seaweed biomass. *Water Research* 34: 196-204.
- Figueiredo J, Ramoa Ribeiro F.** 1989. In: *Catálise heterogénea*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Fletcher M.** 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, ed. M. Fletcher, pp. 1–24. New York: Wiley & Sons
- Flett DS.** 1985. Development in separation science in hydrometallurgy. In *Mintek'50*, (L. F. Haughes, Ed.), Randberg, South Africa: Council for Mineral Technology, pp. 63–75.
- Flett DS.** 1993. Solution purification. *Hydrometallurgy* 30: 327–344.
- Freundlich H.** 1906. Adsorption in solutions. *Phys Chemie* 57: 384-410.
- Gerente C, Lee VKC, Le Cloirec P, McKay G.** 2007. Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption- mechanisms and models review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37: 41- 127.
- Gil RA, Cerutti S, Gásquez JA, Olsina RA, Martinez LD.** 2006. Preconcentration and speciation of chromium in drinking water samples by coupling of on-line sorption on activated carbon to ETAAS determination. *Talanta* 68: 1065-1070.
- Godlewska-Zylkiewicz B.** 2006. Microorganisms in inorganic chemical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384: 114-123.
- Goyal N, Jain SC, Banerjee UC.** 2003. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Advances in Environmental Research*. 7: 311-319.
- Grasso D, Smets BF, Strevett KA, Machinist BD, Van Oss CJ, Giese RF, Wu W.** 1996. Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science Technology* 30: 3604-3608.
- Green-Ruiz C.** 2006. Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary. *Bioresource Technology* 97: 1907-1911.

- Guentzel MN.** 1996. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter,* and *Proteus*. In: Baron's Medical Microbiology (Barron S, Albrecht T, Dianzani F, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch.
- Gupta VK, Shrivastava AK, Jain N.** 2001. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *spirogyra* species. *Water Research* 35: 4079-4089.
- Han R, Li H, Li Y, Zhang J, Xiao H, Shi J.** 2006. Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast. *Journal of Hazardous Materials* 137: 1569-1576.
- Hancock IC, Matis KA, Rousou EG, Zouboulis AI.** 1999. Removal of toxic metals from aqueous mixtures. Part 1: Biosorption. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74: 429-436.
- Handelsman J.** 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 68: 669–685.
- Hashim MA, Chu KH.** 2004. Biosorption of cadmium by brown, green and red seaweeds. *Chemical Engineering Journal* 97: 249-255.
- Hawksworth DL.** 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95:641-655.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN.** 1995. In: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Hoehn RC.** 1996. Class Notes: CE4104 Water and Wastewater Design. Virginia Tech.
- Holt JG, Krieg N, Sneath PHA, Staley JT, Stanley TW.** 1994. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilking Publishers, Baltimore, Maryland, USA.
- Horsfall Jr M, Ogban F, Akporhonor EE.** 2006. Sorption of chromium (VI) from aqueous solution by cassava (*Manihot sculenta* CRANZ) waste biomass. *Chemistry & Biodiversity* 3:161-173.
- Horton R, Apel WA, Thompson VS, Sheridan PP.** 2006. Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*. *BMC Microbiology* 6: 5-13.

- Hossain MA, Kumita M, Michigami Y, Mori S.** 2005. Optimization of parameters for Cr (VI) adsorption on used black tea leaves. *Adsorption* 11: 561-568
- Hu MZC, Norman JM, Faison NB, Reeves M.** 1996. Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU: Characterization and comparison studies. *Biotechnology and Bioengineering* 51: 237-247.
- International program on chemical safety,** Environmental health criteria 61, World health organization. Geneve, 1988
- Jefferson K.** 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236: 163-173.
- Kang SY, Bremer PJ, Kim KW, McQuillan AJ.** 2006. Monitoring metal ion binding in single-layer *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using ATR-IR spectroscopy. *Langmuir* 22: 286-291.
- Karigar C, Mahesh A, Nagenahalli M, Yun DJ.** 2006. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation* 17: 47–55.
- Kato I, Nagai S.** 1991. Treatment of chromium containing wastewater. Japan Kokai Tokkyo Koho, JP03, pp. 224–691.
- Kazy S, Das SK, Sar P.** 2006. Lanthanum biosorption by a *Pseudomonas sp.*: equilibrium studies and chemical characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 773-783.
- Kieszkowski M, Wasiak R.** 1985. *Powloki Ochr.* 23: 19–25.
- Kiran B, Kaushik A, Kaushik CP.** 2006. Biosorption of Cr (VI) by native isolate of *Lyngbya putealis* (HH-15) in the presence of salts. *Journal of Hazardous Materials* 141: 662- 667.
- Koby M, Dermirbas E, Senturk E, Ince M.** 2005. Adsorption of heavy metals ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. *Bioresource Technology* 96: 1518-1521.
- Kuchma SL, O'Toole GA.** 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current Opinion on Biotechnology* 11: 429-433.

- Kulczycki E, Ferris FG, Fortin D.** 2002. Impact of cell wall structure on the behaviour of bacterial cells as sorbents of cadmium and lead, *Geomicrobiology Journal* 19: 553-565.
- Kurtzman CP, Fell JW (Eds).** 1998. In: *The yeasts- A taxonomic study*. Elsevier. Amesterdam
- Kuyucak N, Volesky B.** 1988. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology Letters* 10: 137-142.
- Lameiras S, Quintelas C, Tavares MT.** 2007. Development of a biosorption system for chromium (VI) using a *Arthrobacter viscosus* biofilm supported on granular activated carbon and on natural zeolites. *Bioresource Technology* (online: 27 Março 2007)
- Lancefield RC.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *streptococci*. *Journal Experimental Medicine* 57: 571-595.
- Langmuir I.** 1918. Adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *Journal of the American Chemical Society* 40: 1361-1403.
- Le Cloirec P, Andrès Y, Faur-Brasquet C, Gérente C.** 2003. Engineered biofilms for metal ion removal. *ReViews in Environmental Science and Bio/Technology* 2: 177-192.
- Leonhauser J, Rohricht M, Wagner-Dobler I, Deckwer WD.** 2006. Reaction engineering aspects of microbial mercury removal. *Engineering Life Science* 6: 139-148.
- Li S, Jin-Lan X, Huan H, Zhen-Yuan N.** 2006. Biosorption mechanism of Cr (VI) onto cells of *Synechococcus* sp.. *Sciencepaper Online* (2006) (<http://www.paper.edu.cn>).
- Li NN.** 1968. US Pat. 3,410,794, Nov., 12.
- Lima EC, Royer B, Vaggetti JCP, Brasil JL, Simon NM, dos Santos Jr AA, Pavan FA, Dias SLP, Benvenuti EV, da Silva EA.** 2006. Adsorption of Cu (II) on *Araucária angustifolia* wastes: determination of the optimal conditions by statistic design experiments. *Journal of Hazardous Materials* 140: 211-220.
- Lin S- H, Hsiao R- C, Juang R- S.** 2006. Removal of soluble organics from water by a hybrid process of clay adsorption and membrane filtration. *Journal of Hazardous Materials B135*: 134–140.

- Lin Z, Wu J, Xue R, Yang Y.** 2005. Spectroscopic characterization of Au<sup>3+</sup> biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Spectrochimica Acta Part A* 61: 761–765.
- Luo F, Liu Y, Li X, Xuan Z, Ma J.** 2006. Biosorption of lead ion by chemically-modified biomass of marine brown algae *Laminaria japonica*. *Chemosphere* 64: 1122- 1127.
- Madigan M, Martinko J** (editors). 2005. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall.
- Mahramanlioglu M, Guclu K, Misirli T.** 2006. Removal of chromium (III) by the adsorbents produced from coal mining wastes. *Asian Journal of Chemistry* 18:145-154.
- Malkoc E, Nuhoglu Y, Abali Y.** 2006. Cr (VI) adsorption by waste acorn of *Quercus ithaburensis* in fixed beds: Prediction of breakthrough curves. *Chemical Engineering Journal* 119: 61–68.
- Malik A.** 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30: 261-278.
- Mallevalle J, Suffet M.** 1992. Influence and Removal of Organics in Drinking Water. Lewis Publishers.
- Marshall KC, Stout R, Mitchell R.** 1971. Mechanism of the initial events in the sorbtion of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology*. 68: 337–348.
- Martins R.** 2004. Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas. Tese de Doutoramento, FEUP, Universidade do Porto.
- Martins RJE, Pardo R, Boaventura RAR.** 2004. Cadmium (II) and zinc (II) adsorption by aquatic moss *Fontinalis antipyretica*: Effect of temperature, pH and water hardness. *Water Research*, 28, 693-699.
- Mattson JS, Mark Jr HB.** 1971. Activated Carbon. Marcel Dekker, New York.
- McEldowney S, Fletcher M.** 1986. Variability of the influence of physiological factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Applied Environmental Microbiology* 52: 460–465.
- Melo LF.** 1994. Biofilmes e o controlo da poluição. *Boletim de Biotecnologia* 48: 16-25.

- Mesquita LMS.** 1993. Remoção de ions cádmio de soluções por *Micrococcus luteus*. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ.
- Milne D.** 1952. *Met. Finish.*, 39, pp. 55–67.
- Mohan D, Pittman Jr.** 2006. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water- a review. *Journal of Hazardous Materials* 137: 762-811.
- Mohan D, Singh KP.** 2002. Single and multi component adsorption of cadmium and zinc using activated carbon derived from bagasse- an agricultural waste. *Water Research* 36: 2304-2318.
- Mohanty K, Jha M, Meikap BC, Biswas MN.** 2006. Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by *Eichhornia crassipes*. *Chemical Engineering Journal* 117: 71-77.
- Mor S, Ravindra K, Bishnoi NR.** 2006. Adsorption of chromium from aqueous solution by activated alumina and activated charcoal. *Bioresource Technology* 98: 954-957.
- Morisset P, Oswald JW, Draper CR, Pinner R.** 1954. *Chromium Plating*, Robert Draper. England, pp. 522–538.
- Morrison R, Boyd R. (Autores)** 1994. In: *Química Orgânica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Muter O, Lubinya I, Millers D, Grigorjeva L, Ventinya E, Rapoport A.** 2002. Cr (VI) sorption by intact and dehydrated *Candida utilis* cells in the presence of other metals. *Process Biochemistry* 38: 123-131.
- Naja G, Volesky B.** 2006. Behavior of the mass transfer zone in a biosorption column. *Environ. Sci. Technol.* 40:3996-4003
- Neben EW, Swanton WF.** 1951, *Plating*, 38:457–460.
- Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaecheter M.** 1990. *Physiology of the bacterial cell- a molecular approach*. Sinauer Associates (Eds.), Massachusetts

- Ofomaja AE, Ho Y-S.** 2006. Effect of pH on cadmium biosorption by coconut copra meal. *Journal of Hazardous Materials* 139: 356-362.
- Oliveira R.** 1993. Aparentamentos teóricos da disciplina de Processos de Separação em Biotecnologia. Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho.
- Omoike A, Chorover J.** 2004. Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: aqueous chemistry and adsorption effects. *Biomacromolecules* 5: 1219-1230.
- O' Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54: 49-79.
- Ottosen LM.** 1995. Electrodialytic remediation. Application to soils polluted from wood preservation, Ph.D. Thesis, Technical University of Denmark, 1995, p. 217.
- Pagnanelli F, Mainelli S, De Angelis S, Toro L.** 2005. Biosorption of protons and heavy metals onto olive pomace: Modelling of competition effects. *Water Research* 39: 1639-1651.
- Pakshirajan K, Swaminathan T.** 2006. Continuous Biosorption of Pb, Cu, and Cd by *Phanerochaete chrysosporium* in a Packed Column Reactor. *Soil & Sediment Contamination* 15: 187-197.
- Palmer R Jr, White DC.** 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology* 5: 435-440.
- Pamukoglu Y, Kargi F.** 2007. Biosorption of copper (II) ions onto powdered waste sludge in a completely mixed fed- batch reactor: estimation of design parameters. *Bioresource Technology* 98: 1155- 1162.
- Patterson MJ.** 1996. *Streptococcus*. In: *Baron's Medical Microbiology* (Barron S, Albrecht T, Dianzani F, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M.** 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review Microbiology* 48: 585-617.



**Paul EA, Clark FE (Eds).** 1996. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, London.

**Pien FD, Shrum S, Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C, Farmer JJ.** 1985. Colonization of human wounds by *Escherichia vulneris* and *Escherichia hermannii*. Journal of Clinical Microbiology 22: 283-285.

**Perry JJ, Staley JT.** 1997. Microbiology: dynamics and diversity. Harcourt Brace College Publishers (Eds)

**Prado Acosta M, Valdman E, Leite SGF, Battaglini F, Ruzal SM.** 2005. Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21:1157-1163.

**Przepiórski J.** 2006. Enhanced adsorption of phenol from water by ammonia-treated activated carbon. Journal of Hazardous Materials B135: 453–456.

**Quintelas C.** 2001. Recuperação e reutilização de metais pesados. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.

**Quintelas C, Tavares T.** 2001. Removal of chromium (VI) and cadmium (II) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. Biotechnology Letters 23: 1349-1353.

**Quintelas C, Tavares T.** 2002. Lead (II) and iron (II) removal from aqueous solution: Biosorption by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. Journal of Resource and Environmental Biotechnology 3: 196-202.

**Quintelas C, Sousa E, Silva F, Neto S, Tavares T.** 2006. Competitive biosorption of ortho-cresol, phenol, chlorophenol and chromium (VI) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. Process Biochemistry 41:2087-2091.

**Quintelas C, Fernandes B, Castro J, Figueiredo H, Tavares T.** 2007a. Comparison between the biosorption performance of three different biofilms supported on granular activated carbon for the removal of Cr (VI). Journal of Hazardous Materials (aceite)

- Quintelas C, Fernandes B, Castro J, Figueiredo H, Tavares T.** 2007b. Biosorption of Cr (VI) by a *Bacillus coagulans* biofilm supported on granular activated carbon (GAC). Chemical Engineering Journal (Online: 9 Abril 2007)
- Radhika M, Palanivelu K.** 2006. Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent—Kinetics and isotherm analysis. Journal of Hazardous Materials B138: 116–124.
- Ramirez M, da Silva MP, Selma G, Ferreira L, Vasco O.** 2007. Mathematical models applied to the Cr (III) and Cr (VI) breakthrough curves. Journal of Hazardous Materials (Online: 5 Dezembro 2006)
- Rautenbach R, Albrecht R.** 1989. In: Membrane Processes, Jonh Wiley & Sons Eds., New York.
- Raven PH, Johnson GB.** 1986. In: Biology. Mosby College Publishing (Eds), USA
- Reddlich O, Peterson DL.** 1959. A useful adsorption isotherm. Journal of Physical Chemistry 63: 1024.
- Ribeiro AB.** 1998. Use of electrodialytic remediation technique for removal of selected heavy metals and metalloids from soils, Ph.D. Thesis, Technical University of Denmark, 1998, p. 313.
- Ronald A.** 2003. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. Disease-a-month: DM 49: 71-82.
- Rollinson C (Ed).** 1975. Comprehensive Inorganic Chemistry, Pergamon Press, Oxford, Vol.3, Cap.36: 623-700.
- Rozada F, Otero M, Garcia AI, Morán.** 2007. Application in fixed-bed systems of adsorbents obtained from sewage sludge and discarded tyres. Dyes and Pigments 72: 47-56.
- Rubín E, Rodríguez P, Herrero R, Sastre de Vicente ME.** 2006. Biosorption of phenolic compounds by the brown alga *Sargassum muticum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 81: 1093–1099.

- Ruoff KL.** 1990. Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology 9: 75-79.
- Ryan D, Leukes W, Burton S.** 2007. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. Bioresource Technology 98: 579–587.
- Ryan KJ, Ray CG (editors).** 2004. Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
- Sahin Y, Ozeturk A.** 2005. Biosorption of chromium (VI) ions from aqueous solution by bacterium *Bacillus thuringiensis*. Process Biochemistry 40: 1895-1901.
- Salehizadeh H, Shojaosadati SA.** 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. Water Research 37: 4231-4235
- Sannasi P, Kader J, Ismail BS, Salmijah S.** 2006. Sorption of Cr (VI), Cu (II) and Pb (II) by growing and non-growing cells of a bacterial consortium. Bioresource Technology 97: 740-747.
- Sathishkumar M, Binupriya AR, Kavitha D, Yun SE.** 2007. Kinetic and isothermal studies on liquid- phase adsorption of 2,4- dichlorophenol by palm pith carbon. Bioresource Technology 98: 866-873.
- Sawalha MF, Peralta-Videa JR, Romero-González J, Gardea-Torresdey JL.** 2006. Biosorption of Cd(II), Cr(III), and Cr(VI) by saltbush (*Atriplex canescens*) biomass: Thermodynamic and isotherm studies. Journal of Colloid and Interface Science 300: 100-104.
- Scott JA, Karanjkar AM, Rowe DL.** 1995. Biofilm covered granular activated carbon for decontamination of streams containing heavy metals and organic chemicals. Minerals Engineering 8: 221-230.
- Scott JA, Karanjkar AM.** 1998. Immobilized biofilms on granular activated carbon for removal and accumulation of heavy metals from contaminated streams. Water Science and Technology 38: 197-204

- Sedman RM, Beaumont J, McDonald TA, Reynolds S, Krowech G, Howd R.** 2006. Review of the evidence regarding the carcinogenicity of hexavalent chromium in drinking water. *Journal of Environmental Science and Health Part C* 24:155–182.
- Sengupta AK, Kim L.** 1988. Modelling chromate ion-exchange processes. *AIChE Journal* 34: 2019-2029.
- Senthilkumar R, Vijayaraghavan K, Thilakavathi M, Iyer PVP, Velan M.** 2006. Seaweeds for the remediation of wastewaters contaminated with zinc(II) ions. *Journal of Hazardous Materials B136*: 791-799.
- Singh R, Paul D, Jain RK.** 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14: 389- 397.
- Sips R.** 1948. Combined form of Langmuir and Freundlich equations. *Journal of Chemical Physics* 16: 490-495.
- Solóniz MI, Balsalobre L, Alba C, Valderrama MJ, Peinado JM.** 2002. Feasibility of cooper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology*. 153: 173-180
- Song Z, Edwards SR, Burns RG.** 2006. Treatment of naphthalene-2-sulfonic acid from tannery wastewater by a granular activated carbon fixed bed inoculated with bacterial isolates *Arthrobacter globiformis* and *Comamonas testosterone*. *Water Research* 40: 495-506.
- Srivastava S, Ahmad AH, Thakur IS.** 2007. Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery effluents. *Bioresource Technology* 98: 1128–1132.
- Srivastava VC, Mall ID, Mishra IM.** 2006. Equilibrium modelling of single and binary adsorption of cadmium and nickel onto bagasse fly ash. *Chemical Engineering Journal* 117: 79-91.
- Strouhal M, Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Nemeč M.** 2003. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry* 60: 29-36.
- Tallur PN, Megadi VB, Kamanavalli CM, Ninnekar HZ.** 2006. Biodegradation of p-cresol by *Bacillus* sp. strain PHN 1. *Current Microbiology* 53: 529–533.

- Top EM, Springael D.** 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 14:262–269.
- Toth J.** 1971. State equations of the solid gas interface layer. *Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae* 69: 311-317.
- Turnbull PCB.** 1996. *Bacillus*. In: *Barron's Medical Microbiology* (Barron S, Albrecht T, Dianzani F, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch.
- Tunali S, Çabuk A, Akar T.** 2006. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal* 115: 203-211.
- Tunali S, Kiran I, Akar T.** 2005. Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. *Minerals Engineering* 18: 681-689.
- Urrutia MM.** 1997. *Biosorbent for Metal Ions* (Wase J and Forster C, eds.), Taylor and Francis Publishers , London.
- Valix M, Cheung WH, Zhang K.** 2006. Role of heteroatoms in activated carbon for removal of hexavalent chromium from wastewaters. *Journal of Hazardous Materials B* 135:395–405.
- Van Hullebusch ED, Zandvoort MH, Lens PNL.** 2003. Metal immobilization by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *ReViews in Environmental Science and Bio/Technology* 2: 9-33.
- Vázquez G, González-Álvarez J, Garcia AI, Freire MS, Antorrena G.** 2006. Adsorption of phenol on formaldehyde-pretreated *Pinus pinaster* bark: Equilibrium and kinetics. *Bioresource Technology* 98: 1535- 1540.
- Vaughan T, Seo CW, Marshall WE.** 2001. Removal of selected metal ions from aqueous solution using modified corncobs. *Bioresouce Technology* 78: 133-139.
- Veglio F, Beolchini F.** 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44: 301-316.
- Vegliò F, Esposito A, Reverberi AP.** 2003. Standardisation of heavy metal biosorption tests: equilibrium and modelling study. *Process Biochemistry* 38: 953-961.

- Vidali M.** 2001. Bioremediation: An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73:1163–1172.
- Vieira RHSF, Volesky B.** 2000. Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology* 3: 17-24.
- Vijayaraghavan K, Prabu D.** 2006. Potential of *Sargassum wightii* biomass for copper(II) removal from aqueous solutions: Application of different mathematical models to batch and continuous biosorption data. *Journal of Hazardous Materials B137*: 558–564.
- Vijayaraghavan K, Yun Y-S.** 2007. Utilization of fermentation waste (*Corynebacterium glutamicum*) for biosorption of Reactive Black 5 from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 141: 45–52.
- Vilar VJP, Botelho CMS, Boaventura RAR.** 2006. Equilibrium and kinetic modelling of Cd (II) biosorption by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste. *Water Research* 40: 291-302.
- Vogel TM.** 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7:311-316.
- Volesky B.** (1999). Biosorption for the next century. *International Biohydrometallurgy Symposium*. El Escorial, Spain (<http://ww2.mcgill.ca/biosorption/publication/BVspain/BVspain.htm>)
- Volesky B.** (Ed). 1990. *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Montreal.
- Volesky B, Holan ZR.** 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology progress* 11: 235-250.
- Volesky B, Weber J, Vieira RHSF.** 1999. Biosorption of Cd and Cu by different types of *Sargassum* biomass. In: Amils R., Ballester A. (eds), *Biohydrometallurgy and the environment towards the mining of the 21 st century (part B)*, Elsevier, Amsterdam.
- Wasiak R, Kieszowski M.** 1985. *Powloki Ochr.* 23: 14–17.
- Wernert V, Schäf O, Faure V, Brunet P, Dou L, Berland Y, Boulet P, Kuchta B, Denoyel R.** 2006. Adsorption of the uremic toxin *p*-cresol onto hemodialysis membranes and microporous adsorbent zeolite silicalite. *Journal of Biotechnology* 123: 164–173.

- Widada J, Nojiri H, Omori T.** 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:45–59.
- Wolborska A.** 1989. Adsorption on activated carbon of p-nitrophenol from aqueous solution. *Water Research* 23: 85-91.
- Wu J, Yu H-Q.** 2006. Biosorption of phenol and chlorophenols from aqueous solutions by fungal mycelia. *Process Biochemistry* 41: 44–49.
- Wu J, Yu H-Q.** 2007. Biosorption of 2, 4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresource Technology* 98: 253– 259.
- Xavier JB, Picioreanu C, Almeida JS, van Loosdrecht MCM.** 2003. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia* 76: 2-13.
- Yavuz R, Orbak I, Karatepe N.** 2006. Factors affecting the adsorption of chromium (VI) on activated carbon. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 41:1967-1980.
- Yoon YH, Nelson JH.** 1984. Application of gas adsorption kinetics--II. A theoretical model for respirator cartridge service life and its practical applications. *American Industrial Hygiene Association Journal* 45: 509-516.
- Zouboulis AI, Loukidou MX, Matis KA.** 2004. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry* 39: 909-916.