



AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PH EM FERMENTAÇÃO POR FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO MEIO CZAPEK MODIFICADO: POTENCIAL PARA BIOHIDROMETALURGIA DE BATERIAS DE LI-ÍON

Victor José Romão dos Santos ¹
João Gabriel Honorato Oliveira ²
Igor Romeiro dos Santos ³
Miriam Maria de Resende ⁴
Vicelma Luiz Cardoso ⁵

Reaproveitamento, reutilização e tratamento de resíduos (sólidos e líquidos)

Resumo

O aumento da demanda por baterias de íons de lítio (LIB), impulsionado pela eletrificação de veículos e pela popularização de dispositivos eletrônicos, traz à tona preocupações ambientais relacionadas ao descarte e à gestão de resíduos. A biohidrometalurgia se apresenta como uma alternativa sustentável para o tratamento desses resíduos, utilizando microrganismos para extrair metais valiosos de forma eficiente e ambientalmente amigável. Este estudo tem como objetivo avaliar a influência de diferentes níveis de pH inicial na produção de ácidos orgânicos por cinco espécies de fungos filamentosos. Os resultados mostraram que o fungo *A. niger* se destacou na produção de biomassa e ácido oxálico (8,04 e 4,94 g·L⁻¹, respectivamente), especialmente sob condição inicial de pH = 6,00. A espécie *T. hamatum* (CBMAI-1584) forneceu uma produção de ácido cítrico de 2,19 g·L⁻¹, bem como *P. oxalicum* (ATCC-24784) apresentou uma elevada taxa de metabolização de glicose (4,05 g·L⁻¹ de glicose residual), nas mesmas condições. Demonstrando potencial para aplicação em processos de recuperação seletiva de Li e Mn, em condições otimizadas de biolixiviação, destacando a relevância das interações entre ácidos orgânicos e metais nesse contexto.

Palavras-chave: Biohidrometalurgia; Fungos filamentosos; Baterias de Li-íon.

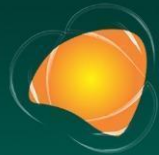
¹ Aluno do Curso de doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química, victorromao@ufu.br.

² Aluno do Curso de graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química, joao.honorato@ufu.br.

³ Estagiário de Pós-doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química, igor.dos@ufu.br.

⁴ Profa. Dra. dos Cursos de graduação e doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química, mresende@ufu.br.

⁵ Profa. Dra. dos Cursos de graduação e doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química, vicelma@ufu.br.



INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as baterias e pilhas do tipo botão de íons de lítio (LIB) têm se destacado como componentes fundamentais em dispositivos eletrônicos portáteis e veículos híbridos e elétricos. O avanço tecnológico e a popularização desses dispositivos promovem um aumento significativo na demanda por essas baterias. Segundo Huang et al. (2021), a produção global de baterias de íons de lítio cresceu exponencialmente, impulsionada pela necessidade de fontes de energia confiáveis e eficientes para suportar a mobilidade elétrica e a portabilidade dos eletrônicos modernos. Contudo, esse crescimento acelerado também levanta preocupações ambientais substanciais, principalmente no que tange ao descarte inadequado e à gestão dos resíduos dessas baterias.

Uma técnica promissora nesse cenário é a biohidrometalurgia, que surge como uma alternativa inovadora e sustentável no tratamento de resíduos de baterias de íons de lítio. A biohidrometalurgia envolve o uso de microrganismos, como bactérias e fungos, para extrair metais valiosos das baterias. Esta abordagem emergente tem ganhado atenção devido à sua capacidade de operar em condições suaves e ambientalmente benignas (SETHURAJAN; GAYDARDZHIEV, 2021). Embora a biohidrometalurgia ainda esteja em estágios iniciais de desenvolvimento para o tratamento de resíduos de baterias de íons de lítio, pesquisas recentes têm demonstrado seu potencial promissor.

A biohidrometalurgia oferece várias vantagens em relação às técnicas convencionais de tratamento de resíduos de baterias de Li-íon. Primeiramente, é uma abordagem mais sustentável, pois utiliza microrganismos naturais e não requer o uso de produtos químicos agressivos. Além disso, a biohidrometalurgia pode operar em temperaturas e pressões mais baixas, reduzindo significativamente o consumo de energia e os custos operacionais associados (DESMARAIIS et al., 2020).

No entanto, a biohidrometalurgia apresenta desafios, como a seleção e otimização de microrganismos adequados para a lixiviação eficaz de metais das baterias de íons de lítio. Além disso, o controle das condições de operação como o pH, a concentração de nutrientes e o tipo de sistema de operação, podendo ser em batelada ou batelada repetida, têm sido extensivamente estudados na literatura recentemente, buscando a otimização do processo (KAKSONEN et al., 2020).



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

Apesar dos desafios, a biohidrometalurgia representa uma abordagem promissora e inovadora para o tratamento de resíduos de baterias de íons de lítio, com potencial para oferecer soluções mais sustentáveis e eficientes em termos energéticos. Pesquisas adicionais são necessárias para otimizar e validar essa técnica em escala industrial, mas os resultados preliminares indicam que a biohidrometalurgia pode desempenhar um papel importante no futuro da reciclagem de baterias.

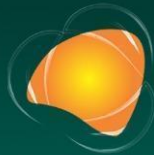
A compreensão dos mecanismos de interação entre os membros do consórcio microbiano é crucial para otimizar o desempenho do processo biohidrometalúrgico. A comunicação intercelular tem sido identificada como um dos principais mecanismos de regulação do metabolismo dentro do consórcio, influenciando diretamente a taxa de biolixiviação de metais (FANG et al., 2022).

Além disso, a adaptação dos microrganismos do consórcio a diferentes condições ambientais, como pH e concentração de íons metálicos, é um aspecto essencial a ser considerado para a viabilidade comercial da biohidrometalurgia. Estudos recentes têm explorado estratégias para otimizar a resistência e a atividade metabólica dos microrganismos do consórcio em ambientes extremos, visando aumentar a eficiência da extração de metais (DONG; ZAN; LIN, 2023; KAKSONEN et al., 2020).

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos de diferentes valores de pH inicial do meio Czapek modificado rico em glicose na produção de ácidos orgânicos por fungos filamentosos, de modo a determinar as espécies mais promissoras para aplicação em processos de biohidrometalurgia de baterias de Li-íon do tipo botão.

METODOLOGIA

Cinco espécies de fungos filamentosos foram utilizadas nos ensaios experimentais preliminares: três amostras do gênero *Trichoderma*, adquiridas da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI-1192 para *T. longibrachiatum*, CBMAI-1584 para *T. hamatum* e CBMAI-1677 para *T. harzianum*); uma amostra do gênero *Aspergillus* (*A. niger*), parte do acervo do Núcleo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia (NUCBIO/FEQ) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU); e uma amostra do gênero *Penicillium* (ATCC-24784, *P. oxalicum*), gentilmente doada pela Fundação Oswaldo Cruz.



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

O crescimento fúngico obtido em 1 placa de Petri após 4 dias foi coletado e transferido separadamente para cada frasco Erlenmeyer contendo 100 mL do meio Czapek modificado previamente preparado e autoclavado a 121 °C por 15 minutos (Tabela 01). O procedimento foi realizado em triplicata e separadamente para cada espécie, que foram e organizadas em dois grupos distintos com valores de pH inicial diferentes corrigidos com solução de HCL a 1,0 mol·L⁻¹: Bloco I com pH 3,0 e Bloco II pH 6,0, inicialmente.

Tabela 01: Composição do meio Czapek modificado.

Glicose [g·L ⁻¹]	Nitrato de sódio [g·L ⁻¹]	Fosfato dibásico de potássio [g·L ⁻¹]	Sulfato de magnésio [g·L ⁻¹]	Cloreto de potássio [g·L ⁻¹]	Sulfato ferroso [g·L ⁻¹]
30,00	2,00	1,00	0,50	0,50	0,01

A composição em sacarose foi substituída por glicose à mesma razão (m:v), bem como houve uma redução na fonte de nitrogênio (RABELO et al., 2023). Os frascos foram fechados e incubados por 7 dias em incubadora *shaker* com temperatura a 30 °C e agitação a 150 rpm. Testes em branco sem microrganismos foram realizados nas mesmas condições em triplicata como controle (Figura 01).



Figura 01: Ensaio de fermentação em incubadora *shaker*.

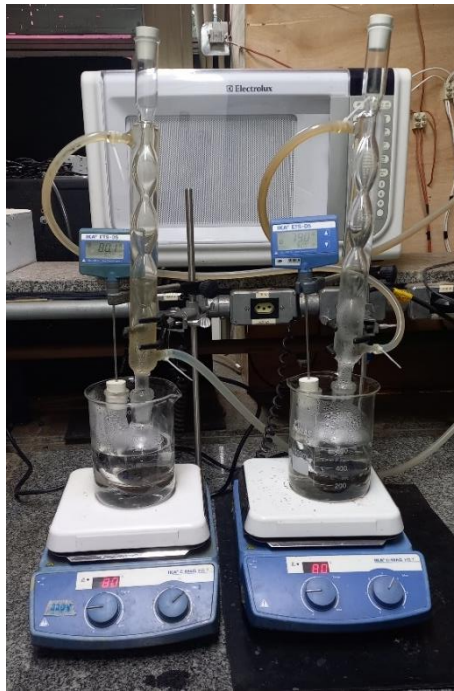
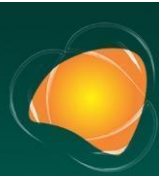


Figura 03: Unidade experimental de biolixiviação de bancada.

Após o período de reacondicionamento, promoveu-se a remoção dos resíduos insolúveis por centrifugação a 5000 rpm durante 20 min e, em seguida, filtração analítica (Figura 04).

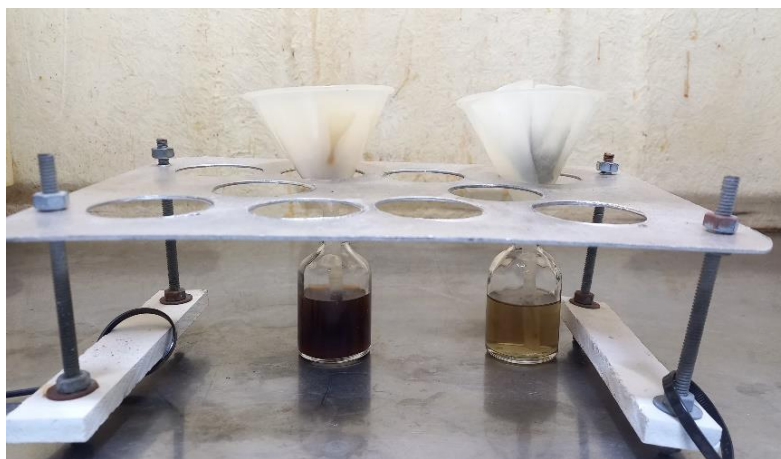


Figura 04: Filtração analítica para remoção de resíduos sólidos.



A eficiência da biolixiviação é monitorada através da análise da concentração dos metais nos líquidos após esta reação. Utilizou-se a técnica de espectrofotometria de absorção de atômica em chama de gás acetileno no equipamento da marca SHIMADZU, modelo AA-7000, permitindo a avaliação da eficácia dos extratos brutos na recuperação de lítio e manganês dos resíduos.

Observando a linearidade das curvas de calibração para estes metais, adotou-se um range de concentração de 0,5 até 10,0 ppm, tanto para o Li quanto para o Mn, em cinco concentrações diferentes: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; e 10,0 ppm, diluídas com HCl a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, conforme sugestão do manual do equipamento. A concentração de solução de amostra padrão é preparada de modo que a concentração de solução de amostra desconhecida seja um valor inserido. A absorbância de amostras desconhecidas é medida para obter a concentração do elemento alvo da curva de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da fermentação descritos na Tabela 02, mostram como diferentes tratamentos e condições iniciais influenciam a biomassa e o pH final das culturas fúngicas.

Tabela 02: Valore de biomassa fúngica e pH ao final de 7 dias de fermentação.

pH inicial	Tratamento	Biomassa média [g]	pH final
3,00	CBMAI-1192	$3,80 \pm 0,40$	6,88
	CBMAI-1584	$6,26 \pm 0,45$	3,66
	CBMAI-1677	$5,33 \pm 0,40$	6,64
	<i>A. niger</i>	$8,17 \pm 0,28$	2,00
	ATCC-24784	$6,96 \pm 0,52$	4,06
6,00	CBMAI-1192	$3,69 \pm 0,42$	6,96
	CBMAI-1584	$6,22 \pm 0,25$	3,63
	CBMAI-1677	$3,00 \pm 0,39$	6,76
	<i>A. niger</i>	$8,04 \pm 0,6$	1,91
	ATCC-24784	$7,31 \pm 0,53$	5,18



Nesta fermentação, utilizou-se uma menor fonte de nitrogênio no meio Czapek e a fonte de carbono utilizada foi glicose em 3% (m:v), ao comparar com o meio utilizado por Rabelo et al. (2023), o que pode ter impactado o crescimento das culturas e a acidez do meio.

A diferença inicial de pH pode influenciar significativamente a dinâmica do crescimento e produção de biomassa (KAKSONEN et al., 2020). *A. niger* apresenta a maior biomassa em ambos os blocos, 8,17 g·L⁻¹ no Bloco I e 8,04 g·L⁻¹ no Bloco II, sugerindo que este fungo pode ser mais eficiente em crescer sob as condições experimentais dadas, especialmente considerando a alta concentração de glicose. A biomassa de *A. niger* é consistente, independentemente da mudança de pH inicial.

CBMAI-1192 mostra baixos valores de biomassa média em ambos os blocos (3,80 g·L⁻¹ e 3,69 g·L⁻¹), indicando que este fungo pode não ter se adaptado bem ao aumento da glicose ou à uma menor fonte de nitrogênio, ou podendo ser uma característica intrínseca desta cultura (DUARTE et al., 2021). CBMAI-1677 e ATCC-24784 têm biomassa intermediária, com CBMAI-1677 mostrando uma leve diminuição no Bloco II (5,33 g·L⁻¹ para 3,00 g·L⁻¹), sugerindo uma sensibilidade a mudanças nas condições do meio ou aumento da glicose. ATCC-24784 tem uma leve diminuição em biomassa do Bloco I para o Bloco II, mas ainda permanece entre os maiores produtores.

A. niger e CBMAI-1584 mantêm um pH final ácido em ambos os blocos (2,00 e 1,91; 3,66 e 3,63, respectivamente), indicando que estes fungos podem estar produzindo quantidades de ácidos significativas, possivelmente como subproduto do metabolismo da glicose. CBMAI-1192, CBMAI-1677 e ATCC-24784 mostram pH final que se aproxima do neutro (6,96 para CBMAI-1192 e 6,76 para CBMAI-1677 e 5,18 para ATCC-24784, no Bloco II), sugerindo que estes fungos são menos acidificantes ou conseguem tamponar o meio mais efetivamente (LUO et al., 2023). Os resultados da glicose residual são mostrados na Figura 05.

A. niger é o mais prolífico e acidificante (Figura 06), o que pode ser vantajoso para processos que exigem acidez alta. CBMAI-1192 e CBMAI-1677 parecem ser menos adaptáveis às novas condições, com variações significativas na biomassa e pH final (KESHAVARZ et al., 2021). *A. niger* se destaca apresentando o menor valor de glicose residual em ambas as condições de pH (4,65 e 2,76 g·L⁻¹, respectivamente), junto com CBMAI-1584 e ATCC-24784 (no Bloco I: 12,52 e 15,81 g·L⁻¹; e no Bloco II: 13,39 e 4,06 g·L⁻¹, respectivamente).



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

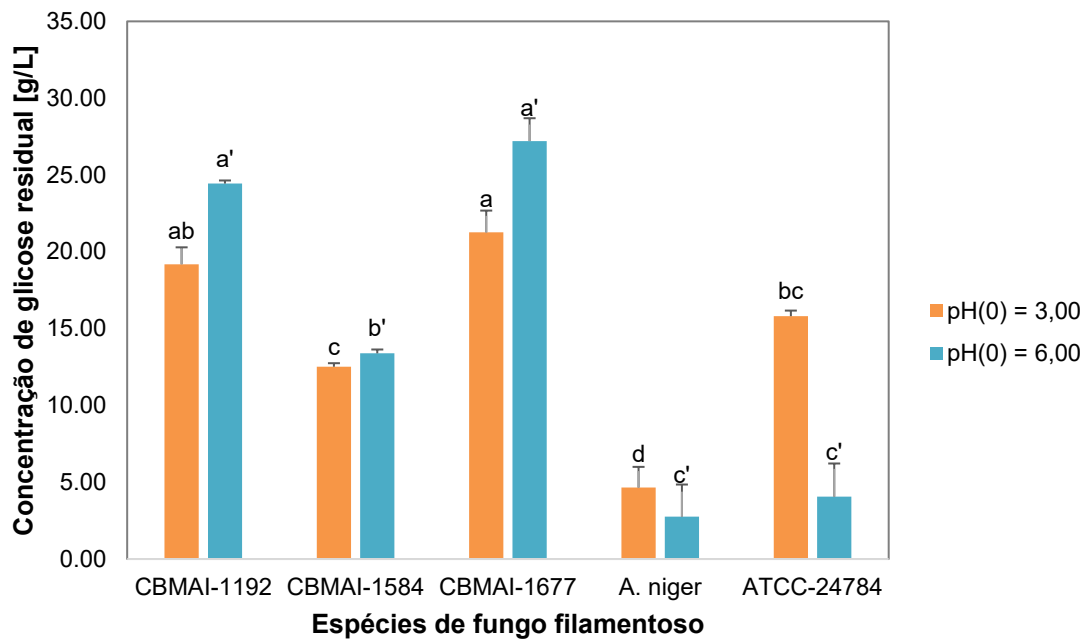


Figura 05: Concentração de glicose residual na fermentação.

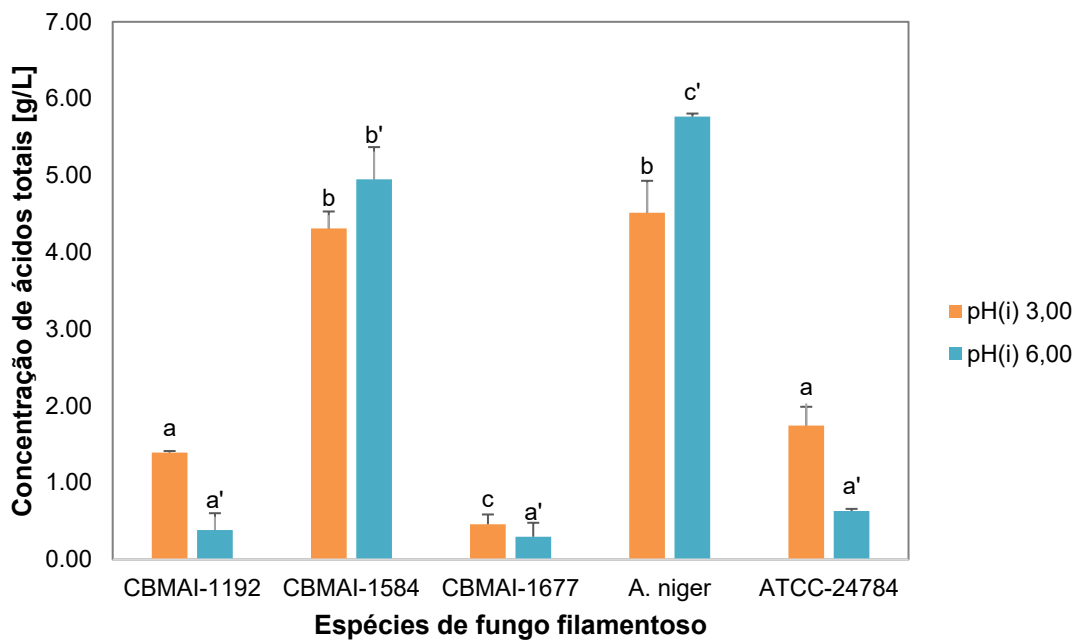


Figura 06: Produção de ácidos orgânicos totais na fermentação.



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

Em contraste, CBMAI-1677 e CBMAI-1192 têm as maiores concentrações de glicose residual (no Bloco I: 21,27 g·L⁻¹ e 19,19 g·L⁻¹; no Bloco II 27,21 g·L⁻¹ e 24,44 g·L⁻¹, respectivamente), sinalizando menor eficiência, podendo influenciar diretamente na produção de ácidos orgânicos, além de tornar mais dispendioso o processo de otimização (DUARTE et al., 2021). A análise da produção de ácidos orgânicos totais revela diferenças significativas entre os dois blocos experimentais.

A. niger possui um metabolismo altamente eficiente para a produção de ácidos orgânicos, incluindo o ácido oxálico (4,94 g·L⁻¹ no Bloco II) que é um produto de fermentação muito presente para este fungo (CHERGUI et al., 2021). CBMAI-1584 parece ter uma capacidade intrínseca para produzir ácido cítrico (2,19 g·L⁻¹ no Bloco II), assim como outros fungos em processos fermentativos como um produto primário do metabolismo da glicose (XU et al., 2024). A concentração de ácido tartárico produzido por ATCC-24784 foi semelhante aos valores reportados Li et al. (2016).

Devidos a estas características isoladas, aplicou-se os extratos obtidos na fermentação pelos fungos CBMAI-1584, *A. niger* e ATCC-24784 na biolixiviação dos resíduos de baterias de íons de lítio, contendo lítio (Li) e manganês (Mn), obtendo os resultados descritos na Tabela 03.

Tabela 03: Concentração de Li e Mn no líquido após biolixiviação.

Amostra	Concentração de Li (ppm)	Concentração de Mn (ppm)
Controle	2626,31 ± 353,95	109,14 ± 6,82
CBMAI-1584	2742,78 ± 42,94	89,87 ± 16,45
<i>A. niger</i>	2362,01 ± 58,52	6,77 ± 9,57
ATCC-24784	2179,80 ± 161,40	2,86 ± 4,04

Não foi observado uma diferença significativa na concentração de Li entre o controle e os extratos fúngicos utilizados. A variabilidade na concentração de Mn na biolixiviação, especialmente a observada no *A. niger* e ATCC-24784, pode estar relacionada aos mecanismos de precipitação do oxalato de manganês, resultando em uma baixa presença deste composto nos lixiviados utilizando condições experimentais preliminares (NASERI; MOUSAVI; KUCHTA, 2023).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam que os extratos produzidos na fermentação por CBMAI-1584, *A. niger* e ATCC-24784 apresentam potencial para aplicação na biolixiviação de metais provenientes de baterias de Li-íon do tipo botão, bem como na recuperação seletiva de Mn, desde que sejam utilizadas condições otimizadas nesse processo.

Este estudo destaca a importância de considerar as interações entre ácidos orgânicos e metais na otimização de processos de biolixiviação para maximizar a eficiência na recuperação de metais. Sendo importante avaliar etapas de purificação e recuperação dos ácidos orgânicos, tais como o oxálico e cítrico para aplicação em processos de biolixiviação indireta, com o intuito de otimizar esta etapa.

AGRADECIMENTOS

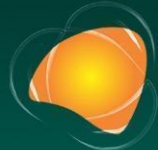
Gostaríamos de agradecer sinceramente aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

CHERGUI, D. et al. **Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, [s.l.], v. 28, n° 12, p. 7134–7141, 2021. ISSN: 1319562X, DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.08.013.

DESMARAIS, M. et al. **Biohydrometallurgical processes for the recovery of precious and base metals from waste electrical and electronic equipments: Current trends and perspectives.** *Bioresource Technology Reports*, [s.l.], v. 11, 2020. ISSN: 2589014X, DOI: 10.1016/j.biteb.2020.100526.

DONG, Y.; ZAN, J.; LIN, H. **Bioleaching of heavy metals from metal tailings utilizing bacteria and fungi: Mechanisms, strengthen measures, and development prospect.** *Journal of Environmental Management*, [s.l.], v. 344, 2023. ISSN: 10958630, DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.118511.



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

DUARTE, E. R. et al. **Hydrolysis of lignocellulosic forages by *Trichoderma longibrachiatum* isolate from bovine rumen.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, [s.l.], v. 36, 2021. ISSN: 18788181, DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102135.

FANG, X. et al. **Effect of diurnal temperature range on bioleaching of sulfide ore by an artificial microbial consortium.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 806, 2022. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150234.

HUANG, B. et al. **The functional separator for lithium-ion batteries based on phosphonate modified nano-scale silica ceramic particles.** *Journal of Power Sources*, [s.l.], v. 498, 2021. ISSN: 03787753, DOI: 10.1016/j.jpowsour.2021.229908.

KAKSONEN, A. H. et al. **Prospective directions for biohydrometallurgy.** *Hydrometallurgy*, [s.l.], v. 195, 2020. ISSN: 0304386X, DOI: 10.1016/j.hydromet.2020.105376.

KESHAVARZ, S. et al. **Bioleaching of manganese from a low-grade pyrolusite ore using *Aspergillus niger*: Process optimization and kinetic studies.** *Journal of Environmental Management*, [s.l.], v. 285, 2021. ISSN: 10958630, DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112153.

LI, Z. et al. **A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus Niger*.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, 2016. ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/srep25313.

LUO, Y. et al. **Cr(VI) Reduction and Fe(II) Regeneration by *Penicillium oxalicum* SL2-Enhanced Nanoscale Zero-Valent Iron.** *Environmental Science and Technology*, [s.l.], v. 57, n° 30, p. 11313–11324, 2023. ISSN: 15205851, DOI: 10.1021/acs.est.3c01390.

NASERI, T.; MOUSAVI, S. M.; KUCHTA, K. **Environmentally sustainable and cost-effective recycling of Mn-rich Li-ion cells waste: Effect of carbon sources on the leaching efficiency of metals using fungal metabolites.** *Waste Management*, [s.l.], v. 157, p. 47–59, 2023. ISSN: 0956-053X, DOI: 10.1016/J.WASMAN.2022.11.043.

RABELO, J. S. et al. **Tolerance of microorganisms to residual herbicides found in eucalyptus plantations.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 329, 2023. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.138630.

SETHURAJAN, M.; GAYDARDZHIEV, S. **Bioprocessing of spent lithium ion batteries for critical metals recovery – A review.** *Resources, Conservation and Recycling*, [s.l.], v. 165, 2021. ISSN: 18790658, DOI: 10.1016/j.resconrec.2020.105225.

XU, J. et al. **Study on the mechanism of sodium ion inhibiting citric acid fermentation in *Aspergillus niger*.** *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 394, 2024. ISSN: 18732976, DOI: 10.1016/j.biortech.2023.130245.