

## ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS EM DRENAGEM ÁCIDA DE MINA COM AJUSTE DE PH

**Debora Carvalho Rocha Jaloto Avila**  
dejaloto@hotmail.com

**Matheus Souza Spagiari**  
souzasp@hotmail.com

**Jeferson Fossatti**  
jefersonfossatti@yahoo.com.br

**Delmar Bizani**  
delmar@unilasalle.edu.br

Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, Canoas, RS

### RESUMO

A mineração é uma atividade de grande impacto ambiental, capaz de provocar as mudanças mais sérias sobre o meio ambiente. A biorremediação é uma nova alternativa para o tratamento de áreas impactadas, através da ocorrência de microrganismos para degradar substâncias tóxicas. Para que isso aconteça, devem existir as condições químicas necessárias para o crescimento dos microrganismos no meio impactado. O objetivo deste trabalho é avaliar o crescimento de microrganismos, realizando o ajuste de pH e com suplementação de 0,5% de Glicose.

**Palavras-Chave:** Drenagem ácida de mina; biorremediação; bioprocesso; ajuste de pH.

### ABSTRACT

*Mining is an activity of large environmental impact, capable to cause the most serious changes on the environment. Bioremediation is a new alternative for treatment of impacted areas, that is done by the occurrence of microorganisms to degrade toxic substances. For this happen, there must be the chemical conditions necessary for the growth of microorganisms in the impacted area. The objective of this study is to evaluate the growth of microorganisms, making the pH adjustment and supplementation of 0.5% Glucose.*

**Keywords:** Acid mine drainage; bioremediation, bioprocess, pH adjustment.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos graves problemas resultantes da industrialização é a contaminação de solos e corpos hídricos com elementos e compostos químicos perigosos. A mineração é uma atividade humana de grande impacto ambiental, capaz de provocar as mudanças mais sérias sobre o meio ambiente, gerando milhões de toneladas de rejeitos contendo pirita ( $\text{FeS}_2$ ). As drenagens ácidas de minas (DAM) são geradas quando minerais sulfetados presentes em resíduos de mineração

(rejeitos ou estéreis) oxidam naturalmente em presença de água e oxigênio. Essa solução ácida age como agente lixiviante dos minerais presentes no resíduo, produzindo um percolado rico em metais dissolvidos e íons sulfato (SOARES e TRINDADE, 2003).

Em áreas de mineração de carvão, os níveis do pH resultam da dissociação do ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), produzido a partir da oxidação da pirita ( $FeS_2$ ) presente nos rejeitos. O processo de oxidação da pirita contribui para o declínio dos níveis de pH do solo e das águas. Tal processo acelera o intemperismo das argilas contidas nos estéreis e rejeitos da mineração, fazendo com que a drenagem superficial contenha, além dos contaminantes típicos dos rejeitos de mineração, elevados teores de metais pesados (ZANARDI e PORTO, 1991).

Existem muitos estudos no intuito de remediar a geração de DAM, pelo grande impacto ambiental da metalurgia extrativista. Atualmente, entre os métodos mais comuns para o tratamento de DAM, estão os métodos químicos, como a neutralização com cal ou outros componentes alcalinos. Esse tratamento resulta na precipitação de íons de sulfato e cátions de metais pesados. Os custos operacionais desses processos são normalmente elevados, enquanto a eficiência de remoção de sulfato e metais é relativamente baixa (LUPTAKOVA e KUSNIEROVA, 2005).

Os metais pesados estão presentes naturalmente no meio ambiente, mesmo que não haja ação antrópica. O aumento em sua concentração pode ocorrer tanto por processos naturais quanto por atividades humanas. O intemperismo e a lixiviação do solo são exemplos de processos naturais que geram o aparecimento de metais pesados na água e no solo, entretanto, a extração e o beneficiamento de minerais são atividades antrópicas associadas à contaminação do meio ambiente (MUNIZ et al., 2006).

Uma das consequências negativas associadas aos metais pesados no ambiente é a sua acumulação na cadeia alimentar e sua persistência na natureza (BUENO et al., 2008). Presentes nos corpos hídricos, os íons metálicos ou seus compostos facilmente atingem os peixes, a partir da cadeia alimentar aquática ou tendo como importante sítio de captação o epitélio das brânquias, concentrando-se em músculos e vísceras abdominais, como fígado, rins e trato gastrintestinal (BJERREGAARD e ANDERSEN, 2007).

De maneira geral, os limites de tolerância a esses microelementos, considerados essenciais ao desenvolvimento de plantas ou animais, são muito baixos. Dentre eles, destacamos o ferro (Fe), elemento vital para a maioria dos organismos vivos, participando de

uma série de processos metabólicos; o cobalto (Co), necessário para a formação da vitamina B12; o cobre (Cu), componente essencial de enzimas como a tirosinase, citocromo oxidase e superóxido dismutase; o manganês (Mn), presente em metaloproteínas como a piruvato descarboxilase; o cromo (Cr), elemento necessário para o metabolismo do colesterol, gordura e glicose; e o níquel (Ni), que participa da regulação de lipídeos e síntese de fosfolipídeos (KLASSEN e WATKINS, 2001).

Dentre os metais com ampla utilização na indústria e causadores de impactos ambientais, podemos citar o cobre, o chumbo e o cromo. O cobre não é tóxico para os seres humanos com precisão, mas seu uso extensivo aumenta os níveis no ambiente, podendo causar sérios problemas de saúde. O chumbo é um veneno altamente tóxico e cumulativo, e pode danificar o sistema nervoso, rins e sistema reprodutivo, particularmente em crianças. O chumbo pode contaminar o meio ambiente a partir de fontes antropogênicas, bem como processos geoquímicos naturais. O cromo é altamente solúvel em água e cancerígeno para o ser humano (CONGEEVAAM S. *et al.*, 2007; BUENO *et al.*, 2008).

Junto com o progresso industrial, aumenta a preocupação da poluição do solo e da água por metais pesados. Os graves problemas ambientais gerados pelo aumento considerável dos descartes de efluentes industriais contaminados com metais pesados nos rios e mares, aliados às exigências das leis ambientais, estimulam as pesquisas nessa área, visando à obtenção de métodos alternativos de baixo custo e de maior eficiência no tratamento de águas e despejos (AGUIAR *et al.*, 2002).

O tratamento biológico desperta grande interesse justamente em função dos baixos custos e reduzido impacto no ambiente, ao contrário dos tratamentos químicos usualmente utilizados. Além disso, o Brasil apresenta grande potencial de uso para biorremediação na recuperação de áreas contaminadas, devido à grande biodiversidade e ao clima, que favorecem os processos biológicos no tratamento da poluição.

A biorremediação envolve a utilização de microrganismos de ocorrência natural (nativos), ou cultivados, para degradar ou imobilizar contaminantes em águas e solos. Dentre os microrganismos utilizados, as bactérias são as mais empregadas e, por conseguinte, são consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. São importantes, em função de seus efeitos bioquímicos e por destruírem ou

transformarem os contaminantes potencialmente perigosos em compostos menos danosos ao ser humano e ao meio ambiente (NRC, 1993).

A tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por microrganismos que utilizam o poluente em suas atividades biológicas na forma de nutriente. Em geral, um composto orgânico, quando oxidado, perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como aceptor final de elétrons quando presente, e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamada de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, quando o oxigênio não está presente, microrganismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

A degradação do poluente e recuperação de uma área impactada pode ser influenciada por diversos fatores. Dentre os fatores químicos, temos a composição química da matriz ambiental, que determina a capacidade nutritiva, o pH, a umidade, o teor de oxigênio dissolvido, o potencial redox do meio e a estrutura química do poluente. Metais pesados, quando presentes, podem interagir com enzimas produzidas pelos microrganismos, inibindo a sua atividade e, conseqüentemente, a sua capacidade degradativa. Entre os parâmetros físicos que influenciam na degradabilidade, estão: natureza física da matriz onde o composto é encontrado (solo, água, sedimento), temperatura e luz. Porém, a biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de microrganismos capazes de metabolizar a molécula original e seus produtos degradados (GAYLARDE *et al.*, 2005).

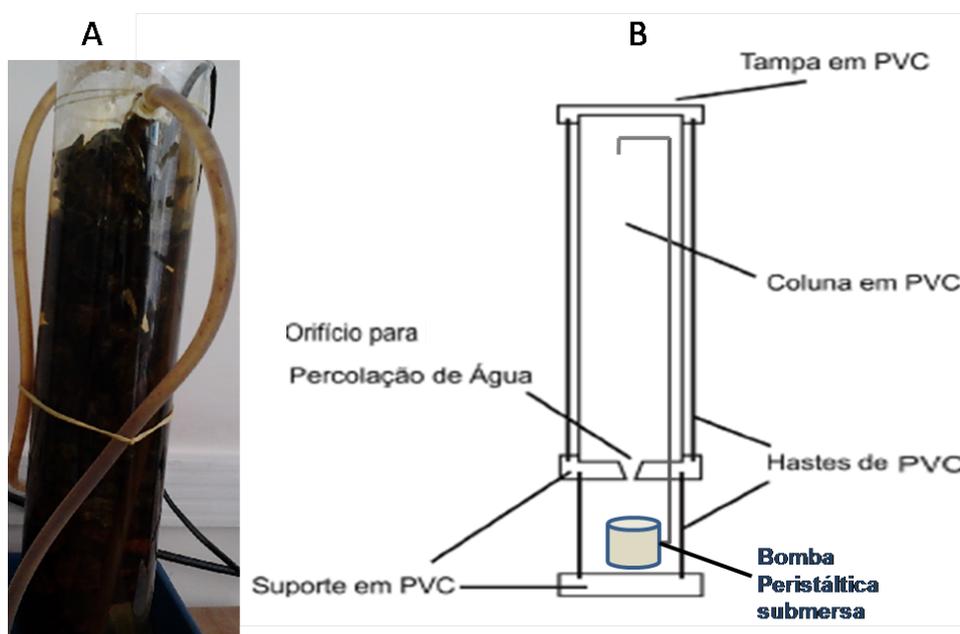
Diante do exposto, este trabalho se propõe a estudar o ajuste de pH, um dos fatores que podem influenciar na possibilidade de utilização de bactérias no tratamento de drenagens ácidas de minas provenientes da mineração de carvão.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Lasalle, em Canoas/RS.

As amostras de drenagem ácida (DAM) foram produzidas em laboratório, utilizando amostras de rejeitos de carvão provenientes de mineração local, rico em pirita, gentilmente cedido pela empresa de mineração COPELMI Mineração Ltda.

A produção de água de drenagem foi realizada em uma coluna de vidro (0,5m x 0,1m x 0,1m) com a percolação direta de água, durante o período de três dias. A coluna (Figura 1) possui em sua base bomba peristáltica, para recircular a água de lixiviação, sob uma camada de rocha suporte, previamente lavada, na quantidade suficiente para ser coberta com água. A recirculação da lixívia ou DAM permitiu um fluxo contínuo de 180 L/h.



**Figura 1** – Produção de DAM em laboratório. A) Produção de DAM em coluna de vidro com aeração forçada; B) Esboço do sistema utilizado. Fonte: Autoria própria, 2012.

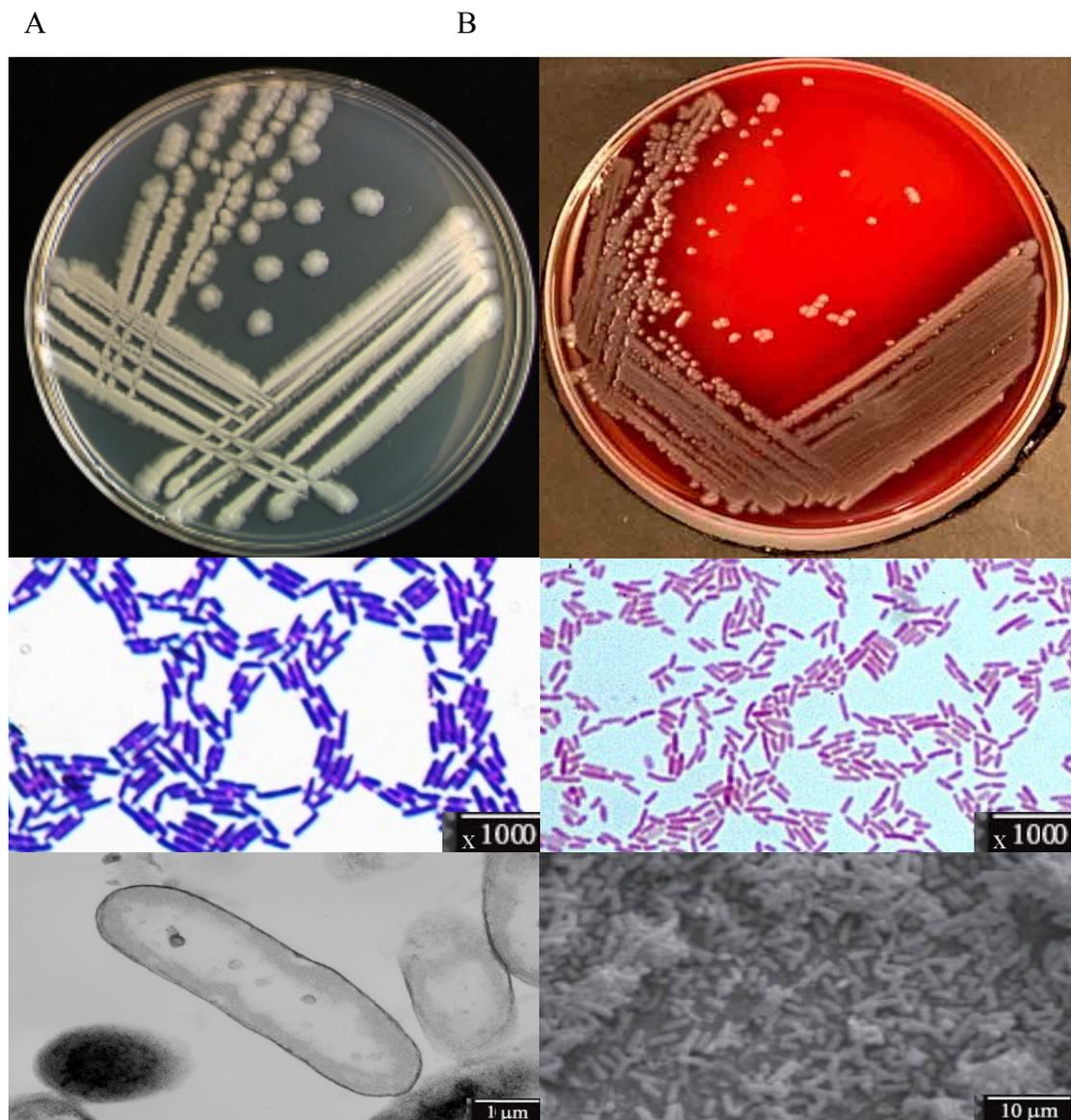
Todo material utilizado na prática, inclusive na produção de DAM, foi autoclavado a uma temperatura de 121° C a 1,5 atm por 15 min.

A DAM produzida em laboratório apresentou um pH de 2,91. Após adicionada a suplementação de 0,5% de Glicose<sup>1</sup>, o pH elevou-se para 3,3. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,5, numa primeira etapa com solução de hidróxido de sódio (NaOH) e, na etapa posterior, com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>).

<sup>1</sup> Sigma-Aldrich Co. CAS n° 50-99-7/Cod. n° 5767, St. Louis Missouri. 63178, USA.

O efluente produzido foi fracionado em amostras de 100 mL, onde os microrganismos foram inoculados à temperatura ambiente em capela com auxílio de material autoclavado e depois incubados em estufa a 32°C constantes.

As amostras de bactérias utilizadas foram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Unilasalle, previamente identificadas e estocadas sob refrigeração. As linhagens bacterianas selecionadas para este estudo foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Ambas as linhagens são isolados ambientais.



**Figura 2** – Cultivo bacteriano; A) *B. subtilis* em meio BHI. B) *P. aeruginosa* em ágar sangue 5%; abaixo suas morfologias respectivas em MO e MET. Fonte: Autoria própria, 2012.

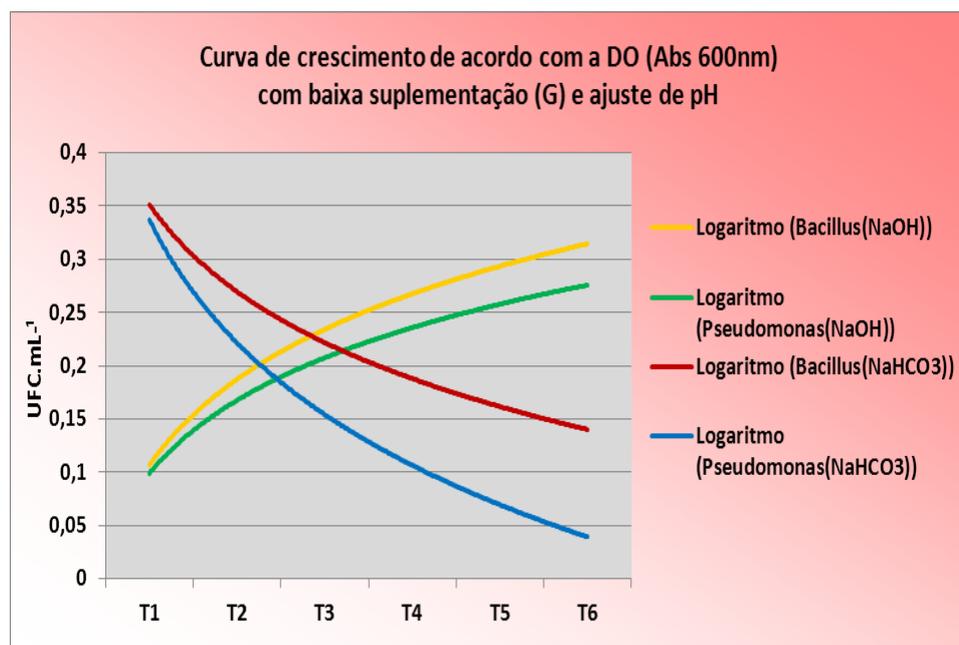
As linhagens bacterianas utilizadas no experimento foram cultivadas em placas de ágar BHI<sup>2</sup> e ágar sangue 5% e incubadas a 32°C por 24 horas, conforme mostra a Figura 2. A preparação dos pré-inóculos das linhagens foram feitas previamente em caldo de cultura BHI e incubadas nas mesmas condições anteriores. Desses, foram retirados 5 mL da cultura de cada linhagem e colocados nos frascos contendo o meio com DAM utilizado no bioprocesso.

O acompanhamento do bioprocesso foi feito pela retirada de alíquotas de 1 mL, analisadas em espectrofotômetro ( $A_{600nm}$ ) com a finalidade de determinar o comportamento biológico das linhagens e estabelecer uma curva de comportamento bacteriano.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos evidenciam comportamentos diferentes, que variaram de acordo com a solução que foi utilizada para ajuste de pH.

A seguir, a Figura 3 apresenta o crescimento logarítmico dos microrganismos testados após suplementação com 0,5% de Glicose e ajuste de pH com diferentes substâncias.



**Figura 3** – Curva de crescimento bacteriano de unidades formadoras de colônia por mililitro ( $UFC.Ml^{-1}$ ) das linhagens testadas com ajuste de pH e baixa suplementação de Glicose (G). Fonte: Autoria própria, 2012.

<sup>2</sup> Brain Heart Infusion Agar-Cód. M1406, 500 gr. HIMEDIA Laboratory - Manual of Medical Microbiology, Atlanta, Ga.: US. DHEW, 2012.

Foram verificados resultados de crescimento significativos para as bactérias analisadas, a partir da correção com hidróxido de sódio, enquanto a correção com bicarbonato de sódio não favoreceu o crescimento das bactérias analisadas.

Além de pesquisas em escala de bancada, há evidências de sistemas comerciais de bio sorção que estão disponíveis, porém, na sua maioria, todos dependem muito da faixa de pH para serem efetivos. Essas substâncias biorreagentes podem ser empregadas na remoção de metais alcalinoterrosos. Grande parte delas tem sido usada no tratamento de drenagem ácida de minas. Calfa e Torem (2007) destacam o processo AMT–Bioclaim™ desenvolvido pela Advanced Mineral Technologies Inc., o qual utiliza a bactéria *Bacillus subtilis* como subproduto de um processo de fermentação. Esse bio sorvente mostrou ser eficiente na remoção de Ag, Cd, Cu, Pb e Zn.

Um dos limites para a biorremediação direta da DAM usando microrganismos vivos é seu próprio pH. Neste experimento, onde o pH foi ajustado para 6,5 com solução de hidróxido de sódio, pôde-se observar que os microrganismos estudados apresentaram crescimento considerável com apenas 0,5% de Glicose de suplementação.

Entretanto, Soares et al. (2006) estudaram a existência de microrganismos autotróficos e heterotróficos controlando o processo de oxidação de S e a produção de  $\text{SO}_4^{2-}$  em sistemas naturais de drenagens ácidas. Para esses autores, o gênero *Thiobacillus*, por exemplo, atua em ampla faixa de pH, que varia de 1,5 a 9,0. Algumas bactérias heterotróficas, como dos gêneros *Artrobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, que por sua vez suportam uma faixa de pH bem mais reduzida, também produzem  $\text{SO}_4^{2-}$  por processos cometabólicos. Assim, é possível que a tendência metabólica desses microrganismos se deva a mecanismos de sucessão de espécies adaptadas a diferentes valores de pH, à medida que há liberação e transformação de  $\text{H}^+$  enquanto o sulfato é produzido. Contudo, tal hipótese não foi avaliada no presente estudo.

A existência de bactérias no processo de oxidação da pirita foi descoberta em 1957. Algumas das principais bactérias envolvidas nas reações de oxidação e suas condições ambientais favoráveis, bem como seus produtos finais da biotransformação, já têm despertado o interesse industrial e ecológico, esse último no que tange à biorremediação.

Dentre elas, a de maior interesse é a *T. ferrooxidans*. Por suportar as condições de pH, esta oxida sulfetos a sulfatos e gera ácido sulfúrico, atuando na produção de águas ácidas de

minas. Ainda atua como catalisadora em ambientes ácidos, ou seja, pode acelerar substancialmente a taxa de oxidação de sulfato e de íons  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  (FAGUNDES, 2005).

O ritmo de produção de águas ácidas é muito variável, sendo muito difícil determinar seu potencial de geração, devido à grande heterogeneidade do meio. Em qualquer caso, a velocidade de formação depende do pH, oxigênio dissolvido, temperatura, pressão e luz, concentração de bactérias oxidantes da pirita, aptidão de nutrientes para as bactérias, quantidade de pirita e sua granulometria, tolerância das bactérias aos metais presentes, formação de minerais secundários e mineralogia da envolvente (FOSSATTI e BIZANI, 2013)

Assim sendo, o desenvolvimento de tecnologias que empregam microrganismos, além de se apresentar como uma técnica eficiente e de baixo custo, ainda demonstra vantagens e desvantagens quando comparado aos demais métodos utilizados. Porém, vale ressaltar que tal método possibilita a reutilização de novas etapas de remoção, como a recuperação do metal na biomassa. De todo modo, ainda se faz necessário um entendimento maior dos mecanismos de biorremediação, principalmente no seu desenvolvimento em escala industrial.

#### 4. CONCLUSÃO

Este trabalho comprovou que os microrganismos, dependendo dos fatores que são submetidos, reagem de forma específica em relação às substâncias presentes. Sendo assim, qualquer prática de biorremediação deve ser iniciada com um extenso e cauteloso estudo físico, químico e microbiológico da área contaminada.

Dependendo das condições da região, a cinética de biodegradação dos compostos será mais rápida ou mais lenta. As condicionantes do meio, devidamente estudadas, devem nortear não apenas a melhor técnica de extração ou eliminação do contaminante, como também a possibilidade de biodegradação dos poluentes.

As linhagens bacterianas selecionadas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, destacam-se por apresentarem desenvolvimento representativo em meios contendo suplementação reduzida de fonte de carbono, entre outras condições adversas, quando realizado o correto ajuste de pH. Em vista disso, como no deste experimento, podem responder positivamente na biorremediação de drenagem ácida de mina.

De acordo com o levantamento bibliográfico, também é preciso considerar a possibilidade de uma tendência metabólica desses microrganismos, relacionada ao mecanismo

de sucessão de espécies adaptadas a diferentes valores de pH, à medida que há liberação, transformação de íon  $H^+$  e formação de sulfato. Desta forma, as linhagens bacterianas estudadas podem apresentar alterações do seu comportamento em diferentes faixas de pH.

Sendo assim, é de grande valor econômico e ambiental que estudos mais aprofundados relativos ao emprego adequado de microrganismos na remoção de metais pesados sejam feitos, não só com o intuito de mitigação de áreas impactadas, mas também na busca de soluções para os impactos da extração de recursos minerais.

Torna-se um desafio na área de biotecnologia ambiental a procura por novas tecnologias viáveis e de baixo impacto para o meio ambiente, que certamente irão ao encontro do desenvolvimento sustentável, podendo conduzir à mitigação do problema ambiental sem gerar efeitos nocivos.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR M. R. M. P., NOVAES A. C.. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Quim. Nova*, Vol. 25, N°. 6B, 1145 -1154, 2002.

BJERREGAARD, P.; ANDERSEN, O. Ecotoxicology of metals – sources, transport, and effects in the ecosystem. In: NORDBERG, G.F. et al. (Ed.). *Handbook on the toxicology of metals*. 3.ed. San Diego, California: Elsevier, 2007. Cap. 13, p. 251-280.

BUENO, B.Y.M., TOREM, M.L. MOLINA, F. E MESQUITA, L.M.S. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R.opacus*: Equilibrium and Kinetic studies. *Minerals Engineering* 21 (1), p. 65-75, 2008.

CALFA, B. A; TOREM, M. L. Biorreagentes: aplicações na remoção de metais pesados contidos em efluentes líquidos por biossorção/bioflotação. *Rem: Rev. Esc. Minas, Ouro Preto*, v. 60, n. 3, Sept. 2007.

CONGEEVARAM, S., DHANARANI S., PARK J., DEXILIN M. E THAMARAISELVI K. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials* 146, p. 270-277, 2007.

CORDAZZO, J. Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas. Dissertação (mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC – Florianópolis, SC, 2000.

FAGUNDES, J. R. T. Balanço hídrico do bota-fora BF4 da mina de Urânio Osamu Utsumi, como subsídio para projetos de remediação de drenagem ácida. Escola de Minas, Departamento de Engenharia Civil, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG. 147 p. 2005.

FOSSATTI, J., BIZANI, D., Estudo do bioprocesso utilizando bactérias aeróbias no tratamento da drenagem ácida da mineração de carvão. Dissertação de Mestrado – Curso de Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração – Centro Universitário La Salle (UNILASALLE). Canoas – RS, 2013.

GAYLARDE C. C., BELLINASSO M. DE C., MANFIO G. P. Biorremediação. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, nº34, p. 36-43, janeiro/junho, 2005.

KLASSEN CD, WATKINS III JB Toxicologia, a Ciência Básica dos Tóxicos, de Casarett e Doull. Portugal: Editora McGraw-Hill, 2001.

LUPTAKOVA A. E KUSNIEROVA M. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. Department of Mineral Biotechnologies, Institute of Geotechnics of Slovak Academy of Sciences. Hydrometallurgy 77, p. 97–102, 2005.

MUNIZ, D. H. DE F. E OLIVEIRA-FILHO E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. Ciências da Saúde, v. 4, n. 1 / 2, p. 83-100, 2006.

NRC: National Research Council. In situ Biorremediation: When does it work? Whashington DC, National Academy Press, 1993.

SOARES P.S.M. E TRINDADE R.B.E. Sistemas passivos abióticos para o tratamento de Drenagens Ácidas de Mina (DAM). Contribuição técnica elaborada para o Seminário Brasil-Canadá de Recuperação Ambiental de Áreas Mineradas, CETEM/MCT. Vol.1, 273-90, Florianópolis-SC, 2003.

SOARES, E., R. et al . Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão. Rev. Bras. Ciênc. Solo, Viçosa, v. 30, n. 1, Feb. 2006.

ZANARDI JR. V, PORTO M L. Avaliação do sistema de lagoas em áreas de mineração de carvão a céu aberto: metais pesados em água, planta e substrato. Boletim do Instituto de Biociência, n.49, p. 1-83, 1991.