

## II-201 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE NÍQUEL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁREA DE MINERAÇÃO

**Ana Carolina Moreira Araújo<sup>(1)</sup>**

Engenheira Ambiental pela Universidade Católica de Brasília (UCB). Mestranda em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

**Paulo Henrique Oliveira Marinho<sup>(2)</sup>**

Engenheiro Ambiental e Sanitarista pela Universidade Federal do Goiás (UFG). Mestrando em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

**Nora Katia Saavedra del Aquila Hoffmann<sup>(3)</sup>**

Doutora em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela EESC – USP. Professora associada da Escola de Engenharia Civil e Ambiental da UFG (EECA/PPGEAS/UFG).

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Universitária, nº. 1488. Setor Universitário. CEP 74605-220 -Tel: (62) 32096541 - e-mail: [carol.moreirax@gmail.com](mailto:carol.moreirax@gmail.com)

### RESUMO

A mineração constitui um dos pilares da economia brasileira, e ao mesmo tempo é extremamente nociva do ponto de vista ambiental e sanitário. Existe atualmente pelo mundo, diversificadas maneiras para se alcançar a atividade minerária sustentável, uma delas é a biolixiviação, já implantada por outras empresas do ramo, para a extração de cobre, sendo uma tecnologia menos nociva ao ambiente que o processo comum, a pirometalurgia. Apesar da biolixiviação utilizar micro-organismos para extração de minério, a atividade de bactérias do gênero *Acidithiobacillus* liberam produtos que aumentam a concentração de ácido sulfúrico nessa extração, o que não é nada viável do ponto de vista ambiental, sanitário e econômico. A proposta do projeto é utilizar bactérias isoladas de área de mineração que não liberam compostos prejudiciais ao meio ambiente e que tenham mecanismos de resistências favoráveis para a concepção da biorremediação de metais pesados na própria área da atividade extrativista. Os isolados previamente selecionados de solo serpentínico da região de Barro Alto - GO, pertencem aos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes. Foram realizadas curvas de crescimento das bactérias selecionadas, em microplaca de 96 poços e em frasco do tipo Erlenmeyer aletado de policarbonato, para realizar as análises dos possíveis mecanismos de resistência bacteriano ao níquel, metal de interesse, utilizando das fontes de sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) e cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) em diferentes concentrações. Dentre todos os isolados, a bactéria *Mucilaginibacter* sp. SAP B3, apresentou um grande potencial para realizar o processo de biorremediação. O fato de possuir um mecanismo de resistência que tolera e de alguma forma se beneficia com a presença do níquel, faz com que este isolado sobreviva a situações de estresse causado por este metal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorremediação, Sustentabilidade, Mineração.

### INTRODUÇÃO

A mineração é um motor do desenvolvimento e já foi a atividade pioneira na ocupação do território brasileiro<sup>1</sup>. Essa atividade não escolhe o local para se implantar, pois a localização das reservas minerais é obra da natureza, conceito que se denomina de rigidez locacional. No entanto, a exploração mineral é uma das atividades econômicas que mais provocam transformações de ordem ambiental, variando de acordo com as características do ambiente, o tipo de minério explorado e a utilização de tecnologias específicas para extração mineral<sup>2</sup>. A mineração é uma atividade antrópica geradora em grande potencial de diversos impactos ambientais englobados em quatro categorias: poluição da água, poluição do ar, poluição sonora, e abatimento do terreno bem como sua contaminação<sup>3</sup>.

Existem estratégias alternativas para se alcançar a atividade minerária sustentável, uma delas é uma variação da hidrometalurgia, conhecida como biolixiviação. Esse processo constitui na utilização de microrganismos para auxiliar a remoção do minério de interesse, gerando menos resíduos que o processo físico-químico tradicional. A biolixiviação já é utilizada para mineração de cobre, as bactérias utilizadas nesse processo já patenteadas são

acidófilas, pois a geração natural de ácido sulfúrico deixa o pH ácido. A exemplo de microrganismo utilizado para a realização da biolixiviação de cobre temos a bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, que em sua atividade, liberam produtos que aumentam a concentração de ácido sulfúrico na extração do minério, o que não é nada viável do ponto de vista ambiental, sanitário e econômico<sup>4</sup>.

O mecanismo de obtenção dos minérios é baseado nos princípios da biorremediação, exercido pelos organismos vivos, geralmente plantas e microrganismos, utilizados tecnologicamente a fim de se degradar ou remover contaminantes nocivos do meio ambiente. Este processo biotecnológico de biorremediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica como uma alternativa viável para o tratamento de problemas de contaminação em vários tipos de ambientes por resíduos e efluentes industriais<sup>5</sup>. Um exemplo de microrganismo utilizado é a bactéria *Cupriavidus metallidurans* que tem sido avaliada para biorremediação de amostras contaminadas com metal pesado provenientes de processos minerários, o grande empecilho do uso desta bactéria é que ela não é capaz de adsorver os íons metálicos, pois possui mecanismo de resistência que expulsa extracelularmente todo o metal absorvido, deixando-o novamente biodisponível no meio<sup>6</sup>.

As bactérias possuem vários tipos de mecanismos de resistência para a tolerância de metais pesados, o que faz com que ela possa sobreviver ao ambiente de estresse causado pela presença de altas concentrações de metais pesados. Seis mecanismos de sobrevivência às concentrações elevadas de metais já são conhecidos em bactérias: exclusão por barreiras de permeabilidade, sequestro intracelular por ligação a proteínas, sequestro extracelular, mecanismos de transporte ativo da espécie metálica para fora da célula por bombas de efluxo, mecanismos de desintoxicação enzimática do metal para uma forma menos tóxica e redução da sensibilidade ao metal nos alvos celulares<sup>7</sup>.

O mecanismo utilizado no processo de resistência ao metal depende do organismo que o emprega, o ambiente em que ele está inserido e à carga metálica a que está exposto. A resposta celular à toxicidade de um metal é muito complexa e, portanto, geralmente mais de um mecanismo de resistência é utilizado<sup>8</sup>. Entender os mecanismos utilizados pelos microrganismos para resistir a concentrações tóxicas de metal é a base para a utilização dos mesmos em processos biotecnológicos, como a biorremediação, que no caso, presa pelos mecanismos referentes ao sequestro intracelular ou extracelular da espécie metálica, também chamados de mecanismos de bioacumulação ou biossorção, respectivamente.

A região do Centro-Oeste brasileiro possui uma atividade minerária muito intensiva na extração de variados tipos de minério. Segundo o relatório anuário mineral brasileiro do DNPM<sup>9</sup> de 2016, o níquel está entre os oito minerais que se destacam no cenário da extração minerária por corresponder a 98,5% do valor da produção comercializada da classe dos metálicos, totalizando 67,5 bilhões de reais para a economia brasileira. Ainda sobre este relatório, no Estado do Goiás as reservas de níquel correspondem a 74,78% do total do País. O níquel é uma das principais preocupações devido aos seus maiores usos em países em desenvolvimento<sup>10</sup>. Este, assim como outros metais pesados, não é biodegradável e é tóxico em níveis elevados. Na região de Barro Alto – GO situa-se um pólo de extração de níquel realizado pela empresa Anglo American, a qual impulsionou a realização da pesquisa em busca de propiciar uma atividade de mineração sustentável para a empresa. Diferentemente de outras atividades mineradoras do Brasil, o minério apresenta pH neutro, assim, a tecnologia desenvolvida para biolixiviação de cobre não pode ser utilizada.

Assim, a proposta do projeto é utilizar bactérias isoladas de área de mineração que não liberam compostos prejudiciais ao meio ambiente e que tenham mecanismos de resistências favoráveis para a concepção da biorremediação de metais pesados na própria área da atividade extrativista.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Dois estudos isolaram e classificaram bactérias presentes nas mesmas áreas isolados de solos em Barro Alto, essas bactérias pertencem ao filo Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes<sup>11,12</sup>. As bactérias obtidas apresentam várias características desejáveis para um posterior desenvolvimento tecnológico: são de fácil cultivo, não liberam compostos prejudiciais ao meio ambiente e crescem em pH neutro. Assim, a hipótese norteadora desse trabalho é de que bactérias com capacidade de bioacumulação de níquel apresentam um potencial em realizar o processo de biorremediação de níquel em solo contaminado.

Para determinar a tolerância ao níquel destes isolados bacterianos, foi avaliada a Concentração Máxima Tolerada (MTC, do inglês Maximum Tolerable Concentration) em meio sólido, para tal, foram cultivados e mantidos em meio de cultura composto por caldo nutritivo R2A com Ágar nutriente e acrescidos de diferentes fontes do metal na presença de sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) e cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) nas concentrações: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; e 64 mmol/L. Para essas fontes de níquel uma solução 1 M foi preparada e esterilizada por filtração, que foi adicionada ao meio de cultura depois de autoclavado. Todos os produtos químicos utilizados no presente estudo foram de grau analítico. Os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri por arranhões e foram deixados durante uma semana em estufa a 30 °C. A concentração máxima tolerada (MTC) foi determinada como a concentração de níquel em que o crescimento bacteriano ainda pode ser observado. A partir dos resultados da MTC, foram selecionadas as bactérias que representam diferentes filos isolados e que apresentaram crescimento significativo para ambas as fontes de níquel utilizadas.

Com estes novos isolados bacterianos selecionados, foram realizadas curvas de crescimento em meio líquido, em microplaca de 96 poços, com o objetivo de ter uma visão ampla do seu crescimento, e em frasco do tipo Erlenmeyer aletado de policarbonato, para realizar as análises da quantificação do níquel, afim de apontar o possível mecanismo de resistência realizado por estas bactérias. Assim, o crescimento foi realizado em caldo R2A acrescido de ambas fontes de níquel  $\text{NiCl}_2$  e  $\text{NiSO}_4$ , nas concentrações: 0,5; 1; 2; 4; 8; e 16 mmol/L, com três réplicas para cada concentração e fonte de níquel. Para o crescimento em microplaca foi inoculado um volume final de 250  $\mu\text{L}$ , a amostra foi colocada em um equipamento espectrofotômetro de microplaca PowerWave HT (BioTek) a 30°C em agitação mínima, sendo aferida a absorbância em 600 nm, a cada 2 horas até que o inóculo atingisse a fase estacionária.

Para o crescimento em Erlenmeyer, cada frasco continha 100mL de meio do mesmo caldo R2A acrescido das fontes de níquel nas concentrações: 0,5; 1; 2; e 4 mmol/L, preparados em triplicata. Também foi preparado em triplicata frascos sem inóculo como controle (branco). O crescimento foi avaliado no período aproximado de duas semanas (a depender da bactéria), a 30°C em 180 rpm, fazendo leituras pontuais da absorbância a 600 nm, em intervalos aproximados de 12 horas (a depender da bactéria), no equipamento de espectroscopia Ultrospec 3100pro (Amersham Biosciences).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da concentração máxima tolerada das fontes analisadas de níquel, bem como sua respectiva classificação taxonômica realizada em trabalhos anteriores, estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Classificação taxonômica dos isolados bacterianos e a sua Concentração Máxima Tolerada (MTC). A MTC foi realizada em meio de cultura sólido.**

Classificação Taxonômica		MTC (mmolL <sup>-1</sup> )		
Gênero	Filo	Isolado	$\text{NiCl}_2$	$\text{NiSO}_4$
<i>Bradyrhizobium</i>	Proteobacteria	LAT C8*	16	16
<i>Variovorax</i>	Proteobacteria	SAP E12*	8	4
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	Proteobacteria	SAP H2	16	16
<i>Bradyrhizobium</i>	Proteobacteria	SAP B2	16	16
<i>Mucilaginibacter</i>	Bacteroidetes	SAP B3*	16	16
<i>Streptomyces</i>	Actinobacteria	LAT H3	64	64
<i>Nocardia</i>	Actinobacteria	SAP E5*	64	64
<i>Streptomyces</i>	Actinobacteria	SAP E9	16	16
<i>Kitasatospora</i>	Actinobacteria	SAP B12	32	64
<i>Streptomyces</i>	Actinobacteria	LAT A10*	8	8

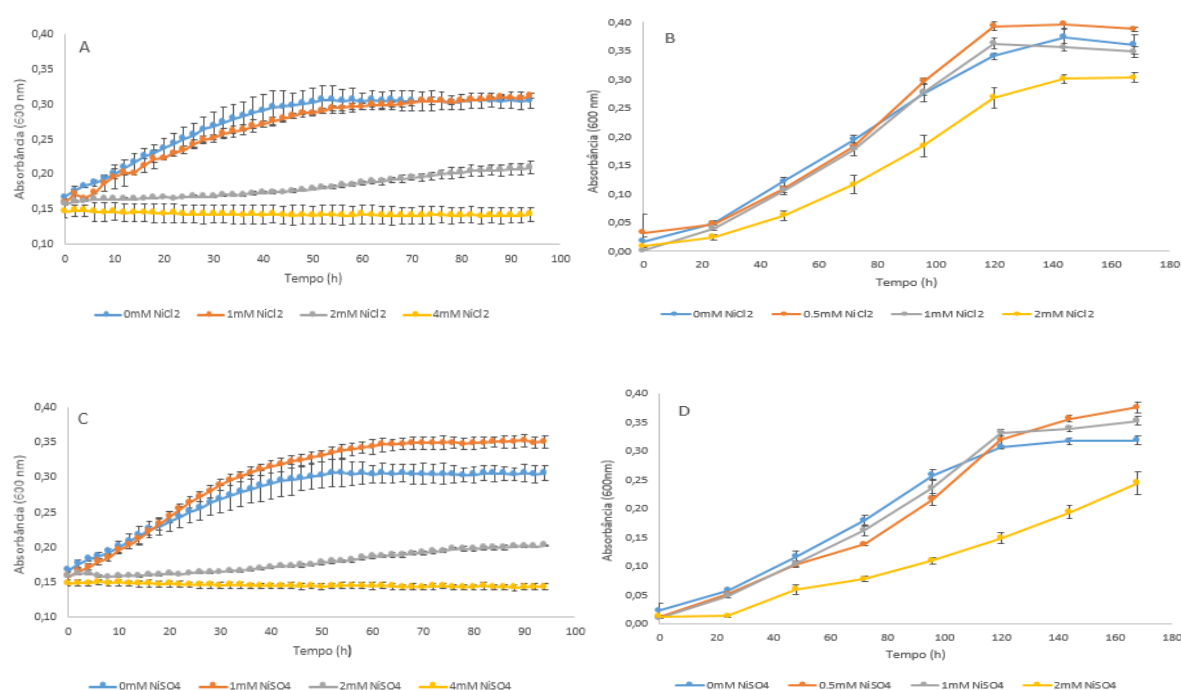
\*Isolados utilizados na pesquisa para o crescimento em meio líquido.

Fonte: Com adaptações<sup>11,12</sup>.

Para o isolado *Bradyrhizobium* sp. LAT C8, foi feito um comparativo entre o crescimento em microplaca e em frascos tipo Erlenmeyer, com o objetivo de mostrar que o crescimento em ambos os casos é equivalente, o que

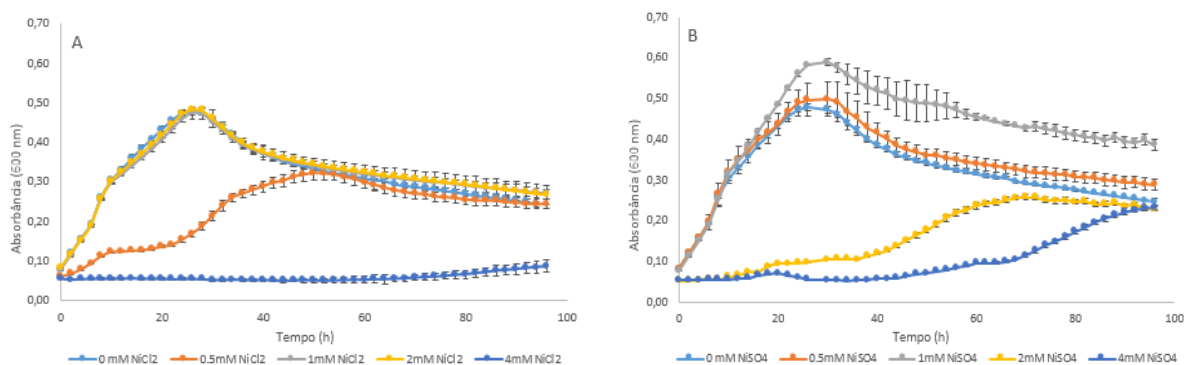
muda é o volume do meio de cultura e da disponibilidade do metal no frasco tipo Erlenmeyer (Figura 2). O isolado não mostrou crescimento nas concentrações de 4 mmol/L, para ambas as fontes de níquel. Foi observado que o crescimento em microplaca é mais lento, apresentando uma fase Lag mais longa. O isolado LAT C8 não apresentou diferença de crescimento entre as concentrações toleradas, tanto para a fonte de sulfato quanto para o cloreto. Para isolados do gênero *Bradyrhizobium* de rizosfera de plantas de solos serpentínicos da Nova Caledônia, que toleram até 15 mmol/L de  $\text{NiCl}_2$ , a resistência é obtida através de bombas como *cnr* e *nre*<sup>13</sup>. A tolerância dos isolados de *Bradyrhizobium* de Barro Alto é parecida (16 mmol/L de  $\text{NiCl}_2$  e  $\text{NiSO}_4$ ), portanto é possível que estes isolados também estejam usando bombas de efluxo como mecanismo de tolerância às concentrações tóxicas de níquel.

**Figura 1 – Curva de crescimento isolado *Bradyrhizobium* sp. LAT C8, em ambas fontes de níquel  $\text{NiCl}_2$  (A e B) e  $\text{NiSO}_4$  (C e D). O crescimento realizado em A e C foi na microplaca. O crescimento realizado em A e B foram em frascos de erlenmeyer aletados de policarbonato. As barras de erro mostram para ambos os casos o desvio padrão das médias.**



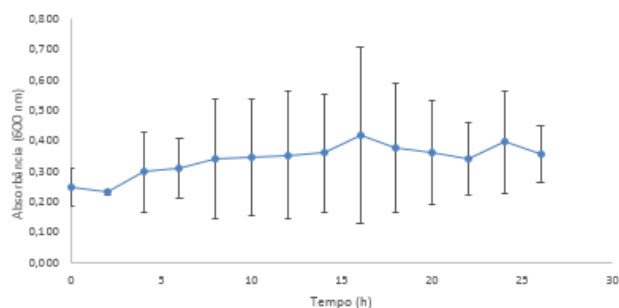
Para os resultados de crescimento em meio líquido observamos que o isolado *Mucilaginibacter* sp. SAP B3 mostrou um crescimento maior em meios que continham  $\text{NiSO}_4$  do que  $\text{NiCl}_2$ . Na presença de  $\text{NiCl}_2$  obteve-se um crescimento nas concentrações de 1 e 2 mmol/L, o que é igual ao crescimento sem a fonte de níquel (0 mmol/L). Entretanto, na presença de  $\text{NiSO}_4$  obteve-se um maior crescimento nas concentrações de 0,5 e 1 mmol/L do que sem a fonte de níquel (0 mmol/L). Observou-se também um crescimento bacteriano gradual das concentrações de 2 e 4 mmol/L, apresentando uma fase Lag, fase em que a atividade bacteriana não é detectada, mais longa do que na presença do cloreto (Figura 2), apesar do cloreto ser mais tóxico em relação ao sulfato<sup>13</sup>.

**Figura 2 – Curva de crescimento em microplaca do isolado *Mucilaginibacter* sp. SAP B3 em ambas fontes de níquel  $\text{NiSO}_4$  (B) e  $\text{NiCl}_2$  (A). Apenas as fontes que mostraram crescimento foram representadas. As barras de erro mostram o desvio padrão das médias.**



As bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria são bastante diversas, se caracterizam pela tendência em formar micélio, um emaranhado de filamentos ramificados denominados hifas<sup>14</sup>. Assim, para o isolado *Streptomyces* sp. LAT A10 não foi possível realizar o crescimento em microplaca, pois apresentou uma formação muito expressiva de micélios, o que em meio de cultura líquido dificulta a leitura da absorbância. Nesse caso, a cultura do meio líquido não se distribui de forma homogênea para a leitura nos aparelhos, gerando um alto desvio padrão (Figura 5).

**Figura 3 – Curva de crescimento em microplaca do isolado *Streptomyces* sp. LAT A10 em meio de cultura sem níquel. As barras de erro mostram o desvio padrão da média.**



## CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas é possível dizer que a bactéria do filo Bacteroidetes, o isolado *Mucilaginibacter* sp. SAP B3, tem um grande potencial para realizar o processo de biorremediação. O fato do seu metabolismo celular possuir um mecanismo de resistência que tolera e de alguma forma se beneficia com a presença do níquel, faz com que este isolado sobreviva a situações de estresse causado por este metal.

O isolado do filo Proteobacteria, *Bradyrhizobium* sp. LAT C8, não são recomendadas para realizar o processo de biorremediação, devido ao seu mecanismo de resistência ser associado a bombas de efluxo, que transporta para fora da célula o níquel, metal de interesse.

Para o isolado *Streptomyces* sp. LAT A10 do filo Actinobacteria, não foi possível avaliar a sua bioacumulação pelos métodos realizados neste trabalho, devido a sua alta tendência em formar micélios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARANHÃO, N., 2006. Planejamento de recursos hídricos e a atividade mineral, Seminário Nacional Geociências do Projeto Setor Mineral: Tendências Tecnológicas – Painel Recursos Hídricos, Rio de Janeiro, jul.
2. FERREIRA, R.V.; SÁ, L. A. C. M. Cartografia aplicada à extração mineral – estudo de caso. In: XIX Congresso Brasileiro de Cartografia, 1999, vol. 1, Recife.
3. FARIAS, C. E. G., 2002. Mineração e meio ambiente no Brasil. Relatório Preparado para o CGEE. PNUD – Contrato 2002/001604.
4. BEVILAQUA, D., LEITE, A. L. L. C., GARCIA JR., O., TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 587-592, 2002.
5. BORÉM, Aluizio. Biotecnologia e meio ambiente. Viçosa, 2008.
6. SCHENBERG, A. C. G. Biotechnology and sustainable development. *Estudos Avançados*, v. 24, n. April 2008, p. 7–17, 2010.
7. BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.
8. HAFERBURG, G.; KOTHE, E. Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol*, v. 47, n. 6, p. 453-67, dec. 2007.
9. BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Anuário Mineral Brasileiro: Principais Substâncias Metálicas. Brasília, DF: DNPM, 2016.
10. JOBBY, R., JHA, P., DESAI, N. *Sinorhizobium*, a potencial organism for bioremediation of nickel. *International Journal of Advanced Research*, vol. 3, p. 706-717, 2015.
11. RODRIGUES, C. A. Riqueza de bactérias associadas a solos ultramáficos em áreas do Cerrado. Brasília: Universidade Católica de Brasília, 2013.
12. SENA, M. W. F. Identificação de bactérias com tolerância ao níquel em solos serpentínicos do cerrado. Brasília: Universidade Católica de Brasília, 2012.
13. CHAINTREUIL, C. et al. Nickel resistance determinants in bradyrhizobium strains from nodules of the endemic new caledonia legume *serianthes calycina*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 24, p. 8018-8022, 2007.
14. PELCZAR JR. J. M.; CHAN E. C. S.; KRIEG N. R., 1996. Microbiologia: conceitos e aplicações. Volume II, 2ª ed., MAKRON Books do Brasil Editora.