

III-538 - CONTRIBUIÇÕES PARA ALTERNATIVA TECNOLÓGICA DE BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUOS DE BAUXITA PELA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS ALCALIFÍLICOS EM LAGOAS VERMELHAS

Cláudio Antônio de Andrade Lima⁽¹⁾

Engenheiro Químico pela Universidade Federal de Minas Gerais. Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela EESC da Universidade de São Paulo. Professor Associado da Universidade Federal de Alfenas, lotado no ICT - Campus Avançado de Poços de Caldas.

Enne Gomes Alves

Bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Tocantins. Mestra em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Professora assistente da Faculdade Arnaldo Horácio Ferreira.

Elis Watanabe

Engenheira Ambiental pela Universidade Estadual do Pará. Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Alfenas.

Elize Ayumi Hayashi

Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Doutora em Ciências pelo Instituto de Microbiologia - UFRJ. Pós-Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Alfenas.

Fernanda Luisa de Oliveira Santos Neves

Bacharela Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Graduanda em Engenharia Química e bolsista de Iniciação Científica pela UNIFAL-MG.

Gunther Brucha

Biólogo pela Universidade Federal de São Carlos. Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo. Professor Adjunto da Universidade Federal de Alfenas, lotado no ICT - Campus Avançado de Poços de Caldas.

Endereço⁽¹⁾: Rodovia José Aurélio Vilela, 11999 - Cidade Universitária - Poços de Caldas - Minas Gerais - CEP: 37715-400 - Brasil - Tel: +55 (35) 3697-4749 - e-mail: claudio@unifal-mg.edu.br

RESUMO

Os resíduos de bauxita representam importantes preocupações econômicas e ambientais devido a magnitude da quantidade gerada, ao elevado custo envolvido em seu manejo e disposição, bem como, pelos riscos ao meio ambiente advindos da elevada alcalinidade que estes resíduos apresentam. A biorremediação *in situ* apresenta-se como opção tecnológica para tornar os resíduos de bauxita amigáveis ao meio ambiente. O objetivo do presente estudo foi isolar e identificar bactérias presentes em amostras coletadas de depósito típico localizado na região de Poços de Caldas - MG. Para tanto, amostras de resíduos foram coletadas das profundidades de 0,25, 0,50 e 1,0 m, inoculadas em cultura de enriquecimento com meio alcalino (pH 10,5) e mantidas em aerobiose, com subsequente cultivo para isolamento de cepas a partir das culturas enriquecidas. As cepas isoladas foram submetidas a análise por microscopia óptica, e o seu DNA extraído para amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram isoladas 6 cepas de bactérias (2 de cada profundidade). Os 6 isolados apresentaram forma bacilar, coloração Gram-positiva, e a análise do sequenciamento indicou que estas cepas estão distribuídas em 3 grupos alcalifílicos distintos, apresentando alto grau de similaridade (99%) com as seguintes espécies: *Bacillus cohnii*, *Bacillus pseudofirmus* e *Bacillus polygami* / *Bacillus clarkii*.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos de bauxita, lama vermelha, bactérias alcalifílicas, biorremediação.

INTRODUÇÃO

O alumínio é o terceiro elemento químico mais abundante na crosta terrestre e metal não ferroso mais utilizado no mundo, obtido industrialmente a partir da bauxita, um minério encontrado nos grupos climáticos Mediterrâneo, Tropical e o Subtropical (ABAL, 2014). No beneficiamento comercial da bauxita para produção de alumina e, por conseguinte, do metal de alumínio, é utilizado o “Processo Bayer”, processo este que promove a digestão do minério em meio alcalino com adição de grandes quantidades de hidróxido de sódio

(NaOH) e que na etapa de clarificação separa o aluminato de sódio do Resíduo de Bauxita (RB), um resíduo sólido industrial rico em óxido de ferro que também recebe a denominação genérica de lama vermelha.

A principal destinação adotada para os RB é a disposição final em grandes diques, de 10 a 50 hectares, com vida útil operacional de 5 a 10 anos. Após este tempo, o resíduo ainda apresenta-se como uma lama espessa, ainda com elevado pH (superior a 10), alta concentração de íons solúveis e escassez em matéria orgânica e nutrientes (SILVA FILHO et al., 2007; NGUYEN; BOGER, 1998). Caracteriza-se como disposição de lama, devido ao acréscimo de grande quantidade de água proveniente do processo para viabilizar bombeamento, deixando a Área de disposição final dos Resíduos de Bauxita-ARB com aparência de lagoa, por isto também conhecida como lagoa vermelha.

Esta opção tecnológica demanda extensas áreas com proporcional passivo ambiental, repercutindo em importantes preocupações econômicas e ambientais não só pela magnitude das quantidades geradas, elevados custos do manejo e disposição, como também, pelos riscos ao meio ambiente associados à elevada alcalinidade e capacidade de troca iônica destes resíduos.

De acordo com Ribeiro e colaboradores (2012) são gerados entre 0,3-1,0 tonelada RB para cada tonelada de alumínio produzido e já de acordo Silva Filho e colaboradores (2007), a partir de ampla revisão bibliográfica e inferências, sugere o intervalo entre 0,3 e 2,5 ton de lama vermelha/ton. Com base nestes valores e com os indicadores setoriais informados pela ABAL (2014) para o ano base de 2012, estima-se a geração anual de RB no Brasil entre 3 e 25 milhões de toneladas. Já em todo mundo estima-se que algo em torno de 90 milhões de toneladas destes resíduos gerados anualmente (KUMAR et al., 2006).

A maioria das pesquisas abordando alternativas tecnológicas para o RB versa sobre reuso ou reciclagem como estratégias ambientais de maior desempenho que a disposição controlada. Por outro lado, a viabilidade técnica e econômica tem como principal barreira a escala associada as grandes quantidades a serem movimentadas e reduzido valor comercial. A vertente da aplicação da biorremediação como opção tecnológica para tornar RB mais amigáveis ao meio ambiente ainda são incipientes.

Nos resíduos de bauxita podem existir microrganismos que estão com déficit metabólico, e que ao se fornecer os nutrientes necessários, se tornarão metabolicamente ativos. Assim, eles serão capazes de se multiplicar e aumentar sua taxa de respiração e produção de ácidos orgânicos, fazendo com que o pH da solução diminua, após um certo período de tempo (WILLIAMS; HAMDY, 1982).

A elevada alcalinidade dos RB, inicialmente fator de preocupação ambiental por sua condição de inibir processos biológicos surge também, como ambiente para a bioprospecção de microrganismos que possuem resistência ou tolerância à presença de condições e elementos deste habitat. Para isso, eles devem possuir propriedades bioquímicas intrínsecas e estruturais, adaptações fisiológica, genéticas e alterações morfológicas que lhes confirmem resistência e tolerância (KRISHNA et. al., 2014).

Organismos extremófilos são aqueles capazes de se desenvolver em condições ambientais extremas, que em relação ao pH podem ser divididos em acidófilos e alcalifílicos. As bactérias alcalifílicas possuem sua taxa de crescimento ótima em um pH entre 10 e 12 (KRULWICH ; GUFFANTI, 1989). Este tipo de bactéria produz ácidos orgânicos no meio fazendo com que o pH da solução diminua (HORIKOSHI, 1999). As alcalifílicas podem ser isoladas a partir de solos "normais" que apresentam condições alcalinas transientes geradas por atividades biológicas, porém, são naturalmente encontradas em ambientes alcalinos estáveis, como lagos de soda e em processos industriais (GRANT et al., 1990).

Neste contexto, torna-se fundamental conhecer os microrganismos alcalifílicos existentes junto aos resíduos de bauxita, assim como sua capacidade de produzir ácidos, para que se possa vislumbrar o uso destes em processos de bioremediação de RB. Como pouco se conhece sobre o estabelecimento de populações microbianas nos referidos locais, o objetivo do presente estudo foi isolar e identificar a microbiota alcalifílica cultivável presente nos resíduos de bauxita (RB) com potencial de contribuição para a opção da biorremediação deste resíduo a partir de amostras coletadas em área de disposição (ARB) localizada na região de Poços de Caldas - MG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Buscou-se selecionar uma ARB representativa, em pior condição para encontrar microrganismos, isto é, antes do início da fase de reabilitação da área. Chegou-se a escolha a uma área onde a alimentação foi suspensa em 2013, com amostras sendo coletadas em uma célula construída no topo, retiradas em diferentes profundidades e assim nomeadas: A (0,25 m); B (0,50 m) e C (1,0 m).

As amostras retiradas sugerem ser de RB depositados entre 23/08/10 e 05/11/10, isto é, com idade média de 4 anos.

Para enriquecimento dos microrganismos alcalifílicos, foi utilizado meio de cultura alcalino, adaptado de Agnew e colaboradores (1995). A composição final da cultura foi a seguinte: 73% meio mineral basal, pH 10,5, suplementado com extrato de levedura e oxalato de sódio; 1% solução traço de metais; 1% solução de vitaminas; 25% inóculo. A incubação foi feita em aerobiose, com agitação a 30°C e 150 RPM, por 6 dias. Uma série de cultivos por plaqueamento em ágar foi feita para isolamento de colônias. Foram selecionadas aleatoriamente 2 colônias originárias de cada amostra para análises posteriores. As culturas de cada cepa isolada foram coradas por Gram, visualizadas ao microscópio óptico e fotodocumentadas.

A identificação molecular dos isolados foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Para isso, o DNA dos isolados foi extraído através do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). O DNA extraído foi submetido à amplificação do 16S rRNA por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando os pares de *primers* (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3')/1401r (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA-ACG3') e 338f (5'ACTCCTACGGGAGGC AGCAG3')/ 1401r, específicos para o Domínio Bactéria. Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados utilizando o sistema ABI 3730 DNA Analyser. Os dados brutos do sequenciamento foram tratados através do Electropherogram Quality Analysis (TOGAWA; BRIGIDO, 2003), para a avaliação da qualidade do sequenciamento pelo Phred. As sequências selecionadas (próximo a 1200pb) foram comparadas com sequências já catalogadas no banco de dados do GenBank através do BLAST. Foi feito o múltiplo alinhamento e edição das sequências em estudo e das sequências de referência do GenBank, através do BioEdit, e a construção da árvore filogenética foi feita utilizando o MEGA 6.0.

RESULTADOS

Foram isoladas 6 cepas de bactérias (2 de cada profundidade) que apresentaram forma bacilar com tamanhos variando entre 2 a 4 µm, coloração Gram-positiva, conforme figura 1.

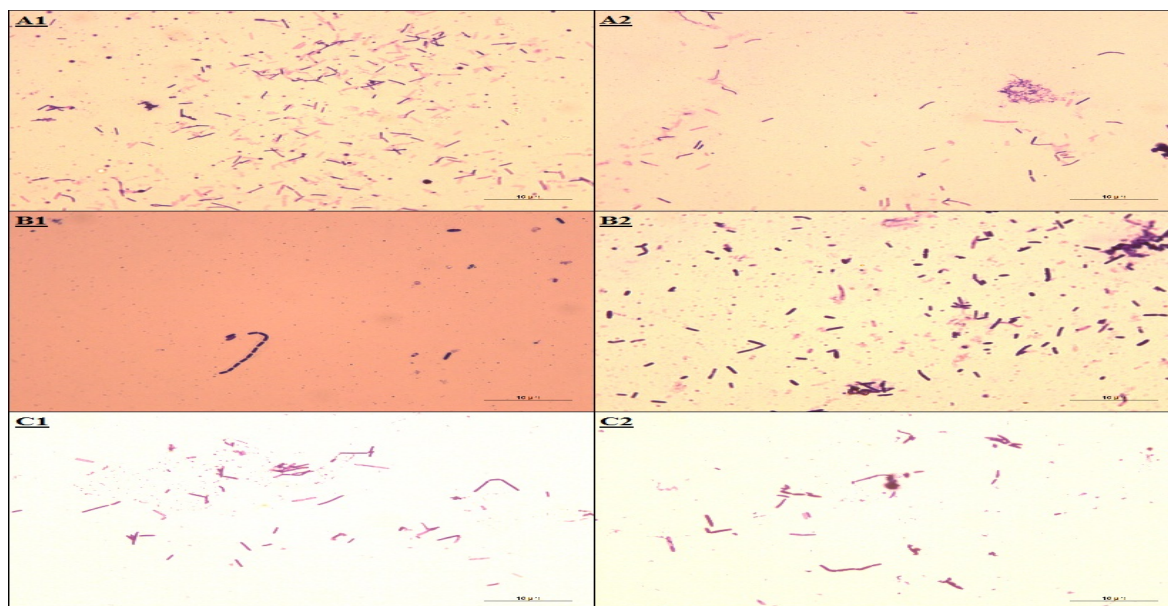


Figura 1: Fotos microscópicas (aumento de 1000x) das bactérias aeróbias isoladas, em lâminas de coloração Gram. Sendo: (A1) colônia 1 da amostra da profundidade de 0,25 m; (A2) colônia 2, 0,25 m; (B1) colônia 1, 0,50 m; (B2) colônia 2, 0,50 m; (C1) colônia 1, 1 m; e, (C2) colônia 2, 1 m.

Após os resultados do sequenciamento e tratamento dos dados, com aproximadamente 1200 nucleotídeos sequenciados, as cepas A1 e A2 mostraram índice de identidade de 99% com a espécie *Bacillus cohnii*; B1 e B2 similaridade de 99% para *Bacillus pseudofirmus*; C1 apresentou índice de identidade de 99% para *Bacillus clarkii* e 99% para *Bacillus polygoni* (Figura 2).

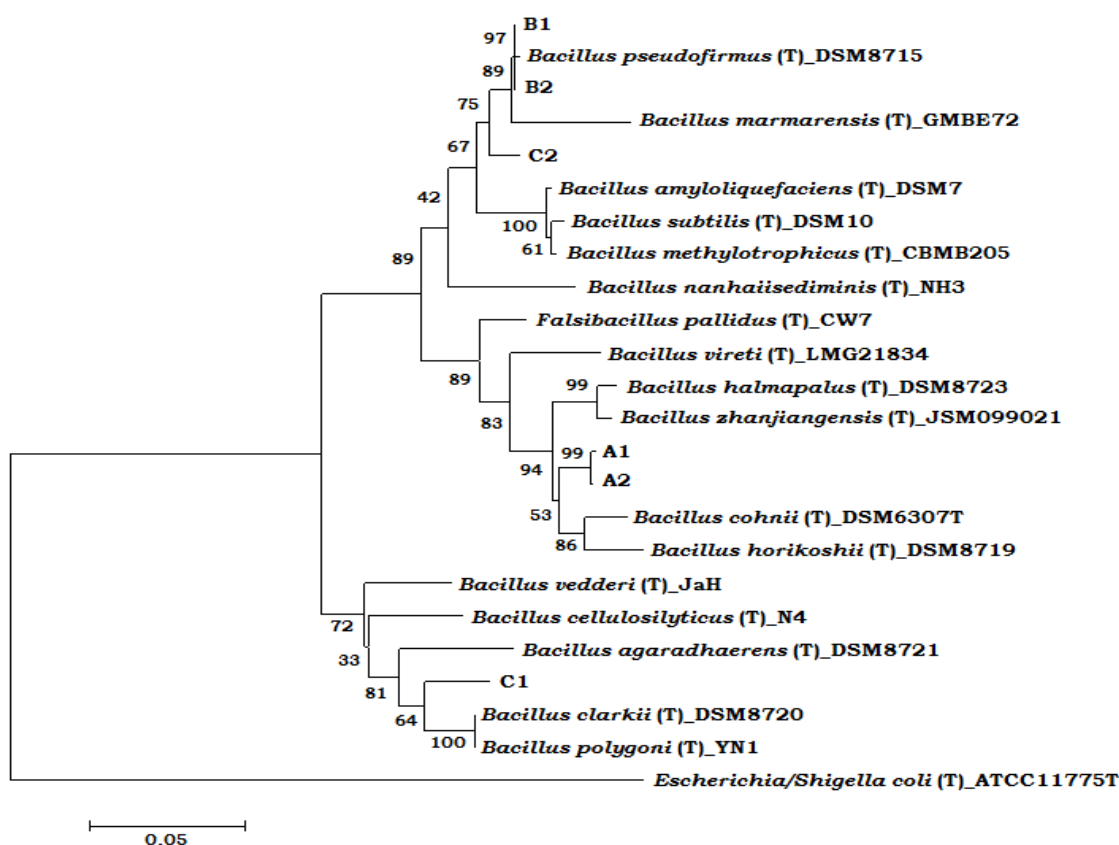


Figura 2: Árvore filogenética após sequenciamento parcial total do gene 16S do RNA ribossomal utilizando primers 27f, 338f/1401r, mostrando a relação entre as bactérias isoladas do resíduo de bauxita e as mais similares registradas no banco de dados GenBank.

Destas três espécies, duas delas (*B. pseudofirmus* e *B. cohnii*) já foram descritas como produtoras de ácidos orgânicos, indicando potencial para atuação no processo de neutralização do resíduo de bauxita. Por outro lado a escassez de registros sobre o *B. polygoni* torna também de grande interesse o estudo da cepa C1 para confirmação de sua identidade. Análises bioquímicas deverão ser feitas com as cepas isoladas para sua melhor caracterização. O estudo encontra-se em fase de correlação com as características físico-químicas das amostras como composição determinada por fluorescência de raio X e alcalinidade, por titulação potenciométrica.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, conclui-se que:

Microscopicamente, as cepas isoladas A1, A2, C1 e C2 são morfologicamente semelhantes, com formas de bastonetes muito finos, de tamanhos médios de 2 a 4 µm. As cepas B1 e B2, por sua vez, apresentaram formas bacilares curtas, mas de maior diâmetro que as demais cepas.

O sequenciamento quase completo do gene 16S rRNA das cepas isoladas indicaram uma alta similaridade destas com três espécies de bactérias Gram-positivas, pertencentes ao filo *Firmicutes* e distribuídas em duas famílias. Onde, as cepas A1 e A2 apresentaram alta similaridade à espécie *Bacillus cohnii* pertencente a família *Bacillaceae*, B1 e B2 à *Bacillus pseudofirmus*, da mesma família, e C1 à *Bacillus polygoni* / *Bacillus clarkii*, que recentemente foram reclassificadas na família *Sporolactobacillaceae*.

A identificação de microrganismos em local tão extremo como os resíduos de bauxita, incentiva a continuidade das pesquisas para a compreensão e aplicação da hipótese motivadora de utilização do processo de biorremediação na gestão de RB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABAL. O alumínio. Associação Brasileira do Alumínio. Disponível em: <<http://www.abal.org.br/aluminio/introducao.asp>>. Acesso em: 19/09/2014. 2014.
2. AGNEW, M. D.; KOVAL, S. F.; JARRELL, K. F. Isolation and characterization of novel alkaliphiles from bauxite-processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. Nov., a new obligate alkaliphile. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 18, p. 221-230. 1995.
3. GRANT, W. D.; MWATHA, W. E.; JONES, B. E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 75, p. 255-269. 1990.
4. HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, p. 735-750. 1999.
5. KRISHNA, P.; BABU, A. G.; REDDY, M. S. Bacterial diversity of extremely alkaline bauxite residue site of alumina industrial plant using culturable bacteria and residue 16S rRNA gene clones. *Extremophiles*, vol. 18, p. 665-676. 2014.
6. KRULWICH, T. A.; GUFFANTI, A. A. Alkalophilic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, vol. 43, p. 435-463. 1989.
7. KUMAR, U.; BANDYOPADHYAY, M. Sorption of cadmium from aqueous solution using pretreated rice husk. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 104-109. 2006.
8. NGUYEN, Q. D.; BOGER, D. V. Application of rheology to solving tailings disposal problems. *International journal of mineral processing*, n° 54, p. 217-233. 1998.
9. RIBEIRO, D. V.; SILVA, A.; M. S.; LABRINCHA, J. A.; MORELLI, M. R. Estudo das reações álcali-sílica associadas ao uso da lama vermelha em argamassas colantes e de revestimento. *Cerâmica*, v. 58, p. 90-98. 2012.
10. SILVA FILHO, E. B.; ALVES, M. C. M.; DA MOTTA, M. Lama vermelha da indústria de beneficiamento de alumina: produção, características, disposição e aplicações alternativas. *Revista Matéria*, v. 12, n° 2, p. 322-338. 2007.
11. TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropheroGram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computacional Biology - IcoBiCoBi, Ribeirão Preto. Disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>>. 2003.
12. WILLIAMS, F. S.; HAMDY, M. K. Induction of biological activity in bauxite residue. In: ANDERSEN, J. E. (ed.). *Light Metals*. 1982.