



**DETECÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM EFLUENTE E  
SEDIMENTO DE MINA DE URÂNIO**

**Sheila Kênia de Almeida**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais;

**ORIENTADORA: Dra. JEANETH DOS SANTOS BENEDETTO**

**CO-ORIENTADORA: Dra. HELIANA DE AZEVEDO GOMES**

Belo Horizonte

2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Comissão Nacional de Energia Nuclear  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e  
Materiais**

**DETECÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM EFLUENTE E  
SEDIMENTO DE MINA DE URÂNIO**

**Sheila Kênia de Almeida**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais e Metalogênese

Orientadora: Dra. Jeaneth dos Santos Benedetto

Co-orientadora: Dra. Heliana de Azevedo Gomes

Belo Horizonte

2005



**MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DAS  
RADIÇÕES, MINERAIS E MATERIAIS**

A presente dissertação de mestrado, intitulada “*Deteção de bactérias redutoras de sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio*”, de autoria de SHEILA KÊNIA DE ALMEIDA, foi defendida e aprovada em 17 de agosto de 2005 pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2005

Profª. Drª Jeaneth dos Santos Benedetto  
CDTN - Orientadora

Profª. Drª. Heliana de Azevedo Gomes  
CNEN – Co-orientadora

Prof. Dr. Válder Roberto Linardi  
Universidade Presidente Antônio Carlos

Profª. Drª. Ana Claudia Queiroz Ladeira  
CDTN

À minha família,  
Maria José, Francisco, Rodrigo, Rafael e Júlia,  
meu apoio, meu consolo, meu rumo, minha motivação.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Jeaneth dos Santos Benedetto, orientadora dessa dissertação, pela paciência e motivação.

À Professora Dra. Heliana de Azevedo Gomes, co-orientadora deste trabalho, pelo estímulo e ensinamentos.

Ao CDTN/CNEN, pela bolsa, e pela utilização das instalações.

Ao COLAB/CNEN/Poços de Caldas, pelas instalações.

À FAPEMIG, pela aprovação do projeto “Jovem Doutor” que possibilitou a montagem da bancada de anaeróbios.

À INB, por permitir a realização do trabalho experimental e por ajudar nos gastos com hospedagem.

Às professoras Dra. Rosana Filomena Vazoller e Dra. Vivian Helena Pellizari por permitir e orientar a realização de um estágio no laboratório de Microbiologia Ambiental na USP.

À Dra. Cristina Rossi Nakayama e Ana Carolina Araújo, pelos socorros providenciais.

À Maria Aparecida Cardoso Chaves e Maria Rego Monteiro Gomes, pelo apoio, pela acolhida amiga e segura nas horas de incertezas.

Ao técnico Antônio Edicleto Gomes Soares, pela montagem do sistema de gases.

Ao técnico Éder Anderson S. de Oliveira, pelo auxílio na confecção de gráficos e esquemas.

Aos técnicos Armando Bruschi, Cláudio Roque e Osvaldo Teles da Costa, pelo auxílio nas coletas e trabalho experimental, e pela agradável rotina de trabalho no laboratório.

A todos os familiares e amigos, pela convivência e incentivo.

## RESUMO

Um dos graves problemas ambientais oriundos da indústria de mineração é a drenagem ácida de mina que ocorre quando a pirita e outros minerais sulfetados são oxidados devido à presença de oxigênio e água, produzindo ácido sulfúrico que solubiliza metais presentes no solo/rocha. Em uma planta das Indústrias Nucleares do Brasil – INB, na Unidade de Tratamento de Minérios (UTM) este problema tem se pronunciado de forma preocupante levando a dissolução de espécies radioativas e metálicas presentes. O tratamento da água ácida usando bactérias redutoras de sulfato, proporciona decréscimo da acidez que é decorrente da redução do sulfato a sulfito e precipitação dos metais como sulfetos.

Nesse contexto, o presente estudo foi realizado visando a caracterizar sazonalmente e espacialmente populações de bactérias redutoras de sulfato (BRS) nos efluentes líquidos e amostras de sedimento da cava da mina (CM) e nos bota-foras 4 e 8 (BF4 e BF8) coletadas na UTM. Tais informações poderão permitir posteriormente, estudar mecanismos de biomanipulação a fim de remediar situações impactantes. Menores valores de pH, abaixo de 3,5, foram medidos no período de março a abril em amostras de água da cava da mina e a maior população de BRS ( $2,8 \text{ NMP} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foi observada em fevereiro em amostras do BF8. Os valores encontrados para matéria orgânica na água foram menores do que aqueles encontrados no sedimento. A concentração de oxigênio dissolvido na água variou de 0,65 g/L a 13,3 g/L. As amostras de sedimento apresentaram maiores valores de BRS (10,2 NMP/mL), quando comparadas com amostras de água (0,63 NMP/mL). Tais resultados eram esperados uma vez que, nas amostras de água coletadas próximas ao sedimento foram observadas menores concentrações de oxigênio dissolvido (7,10g/L) e maiores concentrações de matéria orgânica disponível (17,0 mg/L) quando os resultados foram comparados com aqueles obtidos para amostras de água coletadas na superfície (0,004mg/L).

Os resultados mostram, portanto, que o efluente ácido gerado apresenta altos teores de metais estáveis e radioativos, sulfato, baixo pH e presença de bactérias redutoras de sulfato.



## ABSTRACT

One of the most serious environmental problems created by the mining industry is acid mine drainage. In one plant of Nuclear Industries of Brazil - INB, this problem is a matter of concern. The presence of iron sulfites, such as pyrite, generates water with acidity above the levels allowed by the legislation and therefore, inappropriate for releasing straight into the environment. The industry maintain a high cost treatment in acid water from mines and waste disposal which consists in neutralizing and precipitating heavy metals. The treatment of acid water using SRB (sulfate-reducing bacteria) has been used in other countries with quite good technical results as well as economical advantages and thus, the object of this research. The use Sulfate Reducing Bacteria takes to a decreasing of the acidity by reducing sulfate to sulfite and precipitating the stable metals as sulfides.

A seasonal study was carried out on the sulfate-reducing bacteria present in the liquid effluent discharged from two wastes disposal of the uranium mine, in phase of decommission, in Caldas/MG. This study shows the presence of SRB in the analyzed environmental, as well as some factors that are related with the amount of SRB presents, such as: dissolved oxygen, pH and organic matter. SRB was presented in water samples with high concentrations of heavy metals and low pH values, as well as in samples with high oxygen levels. The sediment samples were the preferential place for SRB occurrence and site BF8 presented the highest values of SRB.

## Lista de figuras

	<b>Página</b>
Figura 1 – Planalto de Poços de Caldas.....	15
Figura 2 – Fotos da cava da mina.....	16
Figura 3 – Ponto BF8.....	17
Figura 4 – Ponto BF4.....	17
Figura 5 – Detalhes Geográficos do Planalto de Poços de Caldas e Localização do UTM –CIPC.....	18
Figura 6 – Arranjo Físico do Complexo Mínero-Industrial do Planalto de Poços de Caldas.....	30
Figura 7 – Número de bactérias e BRS observadas nos três pontos amostrados.....	37
Figura 8 – Valores de pH e contagem de BRS nas amostras coletadas.....	38
Figura 9 – Presença de BRS relacionada ao oxigênio dissolvido, em amostras da cava da mina. ....	39
Figura 10 – Valores de BRS em amostras de sedimento.....	40
Figura 11 – Matéria orgânica e presença de BRS nas amostras de sedimento.....	40

## **Lista de tabelas**

	<b>Página</b>
Tabela 1 – Composição do meio de cultura Postgate B.....	31
Tabela 2 - Caracterização radiológica das amostras dos pontos CM, BF8 e BF4.....	34
Tabela 3 - Análises químicas das amostras dos pontos CM, BF8 e BF4.....	35
Tabela 4 – Sólido em suspensão e dureza da água ácida dos três pontos coletados..	36

## **Lista de abreviaturas e siglas**

AO – Acridine Orange

BF4 – Bota-fora 4

BF8 – Bota-fora 8

BRS – Bactéria redutora de sulfato

CM – Cava da mina

CONAMA – Conselho nacional do meio ambiente

DAM – Drenagem ácida de mina

NMP – Número mais provável

UTM – Unidade de tratamento de minérios

# SUMÁRIO

## Página

Dedicatória	
Agradecimentos	
Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de abreviaturas e siglas	
Sumário	
1. Introdução.....	12
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1. Caracterização ambiental.....	14
2.2. Drenagem Ácida.....	19
2.2.1 Bioremediação.....	21
2.3. Bactérias sulfato redutoras .....	23
2.3.1. Classificação e características gerais .....	23
2.3.2. Aspectos Metabólicos.....	26
2.3.3. Produção de H <sub>2</sub> S.....	28
3. Objetivos.....	29
4. Materiais e métodos.....	29
4.1. Amostras.....	30
4.2. Análises microbiológicas.....	31
4.2.1. Bactérias redutoras de sulfato.....	31
4.2.2. Contagem total de bactérias.....	31
4.3. Análise físico-químicas.....	32
4.3.1. Temperatura da Água, pH e Oxigênio Dissolvido na Água.....	32

4.3.2. Material em Suspensão e Matéria Orgânica.....	32
4.4. Análises Químicas e Radioquímicas.....	33
4.5. Índice de estado trófico.....	33
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1. Caracterização radiológica e química .....	34
5.2. Análises microbiológicas.....	36
6. Conclusões.....	41
7. Contribuições Técnicas.....	42
8. Trabalhos Futuros.....	44
9. Bibliografia.....	45
10. Anexos.....	51

## 1) INTRODUÇÃO

A instalação de um empreendimento mineral proporciona à comunidade localizada em sua área de influência o aumento da oferta de emprego e renda, da disponibilidade de bens e serviços, da arrecadação de impostos e a melhoria da qualidade de vida. Em contrapartida pode também significar alterações indesejáveis na paisagem e nas condições ambientais.

A superação da contradição representada pelos benefícios e custos ambientais associados à instalação de um empreendimento mineral é um dos desafios mais importantes a serem solucionados no início do século XXI. A incorporação dos princípios do desenvolvimento sustentável ao projeto, instalação, operação e descomissionamento destes empreendimentos certamente faz parte da solução. Dentre estes princípios, devem ser privilegiados métodos de produção mais limpa, de minimização do consumo de materiais e energia e geração de efluentes, além da maximização de benefícios sociais.

A mineração, de um modo geral, tem sido fonte de severo impacto ambiental, dentre os quais, a Drenagem Ácida de Mina (DAM), que é resultado da oxidação natural de minerais sulfetados quando expostos à ação combinada de água e oxigênio, podendo ser acelerada na presença de alguns microrganismos. Efluentes de DAM são geralmente caracterizados pela elevada acidez e por conter metais e sulfatos. Quando não controlada, a drenagem ácida pode fluir até os corpos d'água adjacentes causando mudanças substanciais no ecossistema aquático, constituindo-se em uma fonte difusa de poluição. A DAM é considerada um dos problemas ambientais mais graves associados à extração mineral, estando geralmente relacionada com as atividades de mineração de carvão, lignita e de sulfetos polimetálicos ou de metais e minerais radioativos que tenham sulfetos associados.

Considerando a importância ambiental da DAM, atualmente deve-se buscar estratégias de prevenção, para que esta não venha a ocorrer, e remediação, quando o problema já está pronunciado. As alternativas mais comuns para o tratamento dos efluentes ácidos característicos de uma DAM envolvem a neutralização da acidez e conseqüente precipitação e imobilização das espécies dissolvidas.

Nesses sistemas, os agentes neutralizantes mais largamente utilizados são o calcário ( $\text{CaCO}_3$ ), a cal virgem ( $\text{CaO}$ ) ou a hidratada ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e a soda cáustica (hidróxido de sódio –  $\text{NaOH}$ ) às vezes de forma combinada. A principal desvantagem do método reside no fato de que a lama resultante da precipitação tem alto teor de metais e, em caso de redissolução, os metais anteriormente imobilizados podem ser transportados contaminando o meio ambiente.

Existem tratamentos passivos bióticos que podem ser realizados em áreas inundadas classificadas em aeróbias e anaeróbias. As áreas inundadas aeróbias são caracterizadas por grandes superfícies e pequena lâmina d'água onde atuam predominantemente bactérias aeróbias. A pequena profundidade favorece a oxidação e os metais podem ser precipitados na forma de hidróxidos, quando o pH do efluente a ser tratado é fracamente ácido. As áreas inundadas anaeróbias são caracterizadas por grandes superfícies com substrato orgânico recoberto com uma lâmina d'água de espessura superior à das áreas aeróbias. O substrato redutor favorece os processos químicos e microbiológicos que geram alcalinidade e elevam o pH, ao mesmo tempo que consomem oxigênio e reduzem a quantidade de sulfato. Nesse processo tem forte atuação de bactérias redutoras de sulfato.



## 2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *2.1) Caracterização ambiental*

Até por volta da segunda metade do século passado, as atividades de mineração eram realizadas sem a devida preocupação com a preservação do meio ambiente e da saúde humana. Os rejeitos e estéreis eram descartados ou abandonados sem que fossem considerados os possíveis efeitos impactantes, uma vez que não havia uma legislação específica, e conseqüentemente uma fiscalização eficaz (NASCIMENTO, 1998).

Atualmente busca-se minimizar os impactos oriundos das atividades de mineração de forma a promover o desenvolvimento sustentável. Pesquisas, desenvolvimento de novos processos e aplicação de tecnologias mais modernas estão sendo realizadas com a finalidade de reduzir ou tratar os rejeitos produzidos nas atividades atuais, bem como naquelas já finalizadas. Juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias, observa-se um maior cumprimento da legislação por parte daqueles que exploram o ambiente, diminuindo possíveis danos irreversíveis.

Segundo Nascimento (1998) a alta concentração de ácido sulfúrico no solo torna-se uma barreira para o crescimento de vegetais, responsáveis pela cobertura do solo, propiciando um processo de erosão deste e possível acidificação do lençol freático. Um outro problema igualmente impactante é a lixiviação sulfúrica de metais pesados presentes nos minerais da região, contaminando os mananciais da superfície.

A Unidade de Tratamento de Minérios (UTM) foi o primeiro empreendimento de lavra e tratamento do minério de urânio a operar no Brasil. Atualmente, o complexo pertence às Indústrias Nucleares do Brasil S.A. (INB). É constituído de mina a céu aberto e suas áreas de bota-foras, bacia de rejeitos e instalações de tratamento físico e químico de minério, utilizadas no passado para extração de urânio por processo hidrometalúrgico, além das instalações de utilidades administrativas (CIPRIANI, 2002).

A UTM está localizada no Planalto de Poços de Caldas, em um local denominado Campo do Cercado. A altitude da região varia entre 1300 e 1600m e o clima é tropical de altitude, com duas estações bem marcadas. Uma quente e úmida, entre os meses de outubro a março e a

outra, entre os meses de abril a setembro, caracterizada pela estiagem e temperaturas mais baixas. O índice pluviométrico médio é de 1700 mm/ano. A vegetação natural da região é basicamente formada por campos de altitude constituídos de gramíneas rústicas e por vegetação arbórea e arbustiva disseminada em pequenas manchas ao longo das vertentes (CIPRIANI, 2002). Na área de influência da instalação há duas bacias hidrográficas: a bacia do ribeirão das Antas e a bacia do rio Verde. A UTM está localizada no divisor de águas das duas bacias.

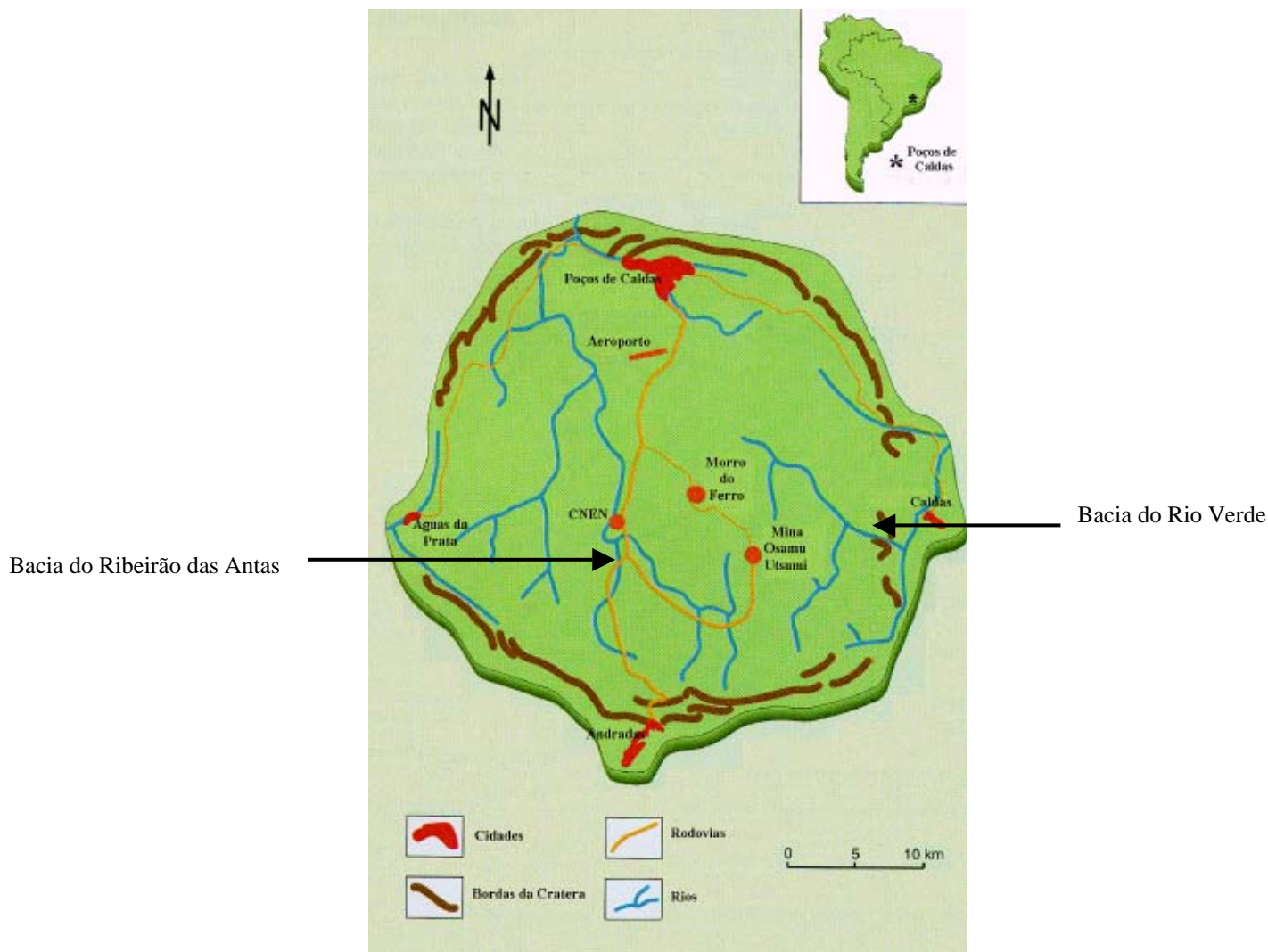


Figura 1.: Planalto de Poços de Caldas; Fonte: Cipriani, 2002.

O local de coleta de amostras, denominado de Unidade de Tratamento de Minérios, consiste de uma mina de urânio a céu aberto que deu origem à cava da mina Osamu Utsumi (ponto

CM – Figura 2) e uma planta química, localizadas no município de Caldas (no planalto de Poços de Caldas), no estado de Minas Gerais, ocupando área em torno de 15 km<sup>2</sup> (SOUZA, 1995).



Figura 2 - Fotos da cava da mina

Do material retirado da cava da mina devido à mineração, parte foi destinada ao processamento físico e químico. O restante permanece estocado principalmente no bota-fora 4 (BF4) e bota-fora 8 (BF8). As pilhas de minério estéril que constituem o BF4 e o BF8 foram estabelecidas, respectivamente, em cima da vertente do Córrego da Consulta e do Córrego Soberbo (Amaral *et al.*, 1988 e Fernandes *et al.*, 1995), desviando-se o curso desses córregos por canais. Nesses bota-foras existe drenagem de água ácida (pontos BF4 e BF8).



Figura 3- Ponto BF8



Figura 4- Ponto BF4

Na UTM/INB o minério de urânio foi processado até 1995 gerando uma grande quantidade de estéril, com teor de urânio abaixo de 200 ppm. Esse estéril foi depositado em extensas áreas em torno da região minerada, denominadas de “bota-foras”. Segundo Nascimento (1998) a UTM/INB havia processado 2.111.920 toneladas de minério, base seca, que resultou na geração de 44.560.000 m<sup>3</sup> de estéril de mineração.

Na figura 5 são mostrados os detalhes geográficos do Planalto de Poços de Caldas e Localização da UTM.



e rádio) e elementos estáveis (manganês, zinco, fluoreto, ferro, etc.), acima dos valores permitidos pela legislação (Resolução CONAMA, 2005), imprópria para o lançamento direto no ambiente. Quando a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) constatou o problema, exigiu a construção de bacias de captação das águas da mina e dos bota-foras, o tratamento destas águas para neutralizar a acidez e precipitar os radionuclídeos e metais pesados. Atualmente o lançamento da água no meio ambiente se dá após a decantação dos sólidos em suspensão. Análises das águas ácidas tratadas mostraram que, qualquer interrupção do tratamento atual provoca imediato aumento da concentração de poluentes lançados para o meio ambiente aquático.

A UTM está localizada numa região de tradição mineira e tem, devido ao tipo de mineralização (óxidos de urânio contendo sulfetos metálicos) e ao método de lavra e tratamento usado, um cenário ambiental bastante complexo, que inclui: mina com drenagem ácida e a conseqüente dissolução das espécies radioativas e metálicas, dificultando a decisão sobre o que fazer com as águas e a cava após o fechamento; bota-foras colocados em talvegues, que também apresentam drenagem ácida e dissolução de espécies radioativas e metálicas; uso de ácido sulfúrico para a dissolução de urânio, o que gerou rejeitos sólidos e líquidos que foram neutralizados e o rejeito sólido produzido foi deposto em bacia de rejeitos; uso de solventes orgânicos na etapa de concentração; instalações e equipamentos que devem ser descontaminados caso forem utilizadas para outros fins; e, finalmente, a necessidade de monitoração do local ao longo do tempo (CIPRIANI, 2002).

## ***2.2) Drenagem Ácida***

Um dos problemas ambientais graves originados da atuação da indústria de mineração é a drenagem ácida de mina. As principais fontes de drenagens ácidas são as minas a céu aberto ou subterrâneas, bacia de rejeitos, pilhas do estéril e de estocagem do minério que contenham sulfetos associados. Nestas fontes são distinguidas duas zonas envolvidas na geração de ácido e metais dissolvidos. A parte mais próxima da superfície, que está em contato com o oxigênio atmosférico, é conhecida como zona oxidante; abaixo está a zona redutora onde reações químicas ocorrem na ausência de oxigênio. A zona redutora é influenciada pelas interações biogeoquímicas e produtos que percolam da zona oxigenada. (NASCIMENTO, 1998)

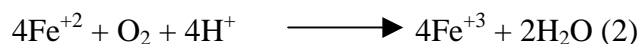
Em muitos países existem minas já desativadas ou temporariamente fechadas, onde a drenagem ácida procedente de rejeito e estéril apresenta características de acidez bastante pronunciada. No Brasil, na região carbonífera ao sul do país e na Unidade de Tratamento de Minérios – Indústrias Nucleares do Brasil UTM/INB, o problema da drenagem ácida de mina tem se destacado (QUINELATO *et al.*, 2002).

Em Santa Catarina, os resíduos produzidos na mineração do carvão e acumulados desde os anos 60 (cerca de 200 milhões de toneladas), contém altos teores de enxofre, principalmente pirita. A água ácida gerada polui cerca de dois terços dos cursos de água da região. (NASCIMENTO, 1998).

A drenagem ácida de mina acontece quando a pirita ( $\text{Fe}_2\text{S}$ ) e outros minerais sulfetados são oxidados espontaneamente, devido a presença de oxigênio e água, produzindo ácido sulfúrico que dissolve metais presentes no solo/rocha. (NORDWICK *et al.*, 2003). Minerais como a pirita ( $\text{FeS}_2$  – o mais abundante de todos os minerais sulfetados) são quimicamente e biologicamente estáveis em situações onde os teores de água e oxigênio são mínimos. A primeira etapa do processo de oxidação é dado pela reação abaixo :

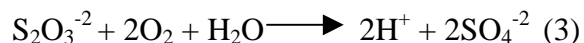


A oxidação do mineral sulfetado pode ocorrer de forma abiótica, mas a velocidade da reação pode ser muito aumentada na presença de certos procariotos litotróficos. Esses microrganismos aceleram a oxidação do mineral pela geração do íon férrico, dado pela reação abaixo:



A formação do tiosulfato (reação 1) é abiótica e pode ocorrer em ambientes anaeróbios, mas é favorecida no ambientes aeróbios. No entanto a reação 2 requer oxigênio fundamentalmente biológico, isto é, produzido por seres vivos, neste caso microrganismos e  $\text{pH} < 4$  (JOHNSON & HALLBERG, 2003).

Algumas espécies dos grupos *Eubacteria* e *Archaea* podem oxidar o tiosulfato (produto da oxidação da pirita), assim como outros compostos inorgânicos de enxofre e enxofre elementar, produzindo ácido sulfúrico.



Então, essa acidez resulta na hidrólise do ferro:



Águas drenadas de minas são portanto, ácidas, e frequentemente contém elevadas concentrações de metais pesados dissolvidos. Esses metais originam dos sulfetos e outros minerais associados e são mantidos em solução devido à grande solubilidade do licor ácido (JOHNSON & HALLBERG, 2003).

O tratamento convencional utilizado para elevação do pH é a adição de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{CaO}$ , onde estes reagem com o sulfato presente na água ácida formando  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , que precipita. Esse processo é caro e produz rejeitos e hidróxidos metálicos. No sul da Austrália, cal é utilizada no tratamento das águas ácidas em uma mina descomissionada de Pirita em Brukunga, localizada aproximadamente a 50 km de Adelaide. O custo deste tratamento estava estimado em \$250000,00/ano em 1988 (ELLIOT *et al.*, 1998). Na UTM, o volume médio tratado é cerca de  $1.971.065\text{m}^3/\text{ano}$  (2002-2004), sendo consumidos cerca de 2710 t /ano de cal, resultando num custo médio total de R\$ 1.117.681,00/ano (dados registrados nos boletins internos da INB).

### 2.2.1) Bioremediação

Uma alternativa possível para o tratamento químico destes efluentes é a bioremediação usando BRS, apresentando a vantagem desses microrganismos crescerem em ambiente de mina. De fato, algumas BRS têm sido isoladas do fundo de lagoas de rejeitos de mineração. Do mesmo modo têm sido provado que ecossistemas aquáticos contaminados por águas ácidas têm sido capazes de recuperar naturalmente a situação inicial graças a presença de espécies com a capacidade para regenerar o meio (GARCIA *et al.*, 2001).

Processos biológicos utilizando bactérias redutoras de sulfato (BRS) têm sido descritos como tratamentos eficientes e economicamente viáveis (HERRERA *et al.*, 1997; CORK *et al.*, 1978; ECCLES H., 1999), sendo de interesse industrial, tanto em processos de descontaminação ambiental como na produção de enxofre ou compostos de enxofre de alto valor comercial.



Segundo os estudos, em escala piloto, realizados na Austrália por Jong & Parry (2003) o tratamento de água ácida em um bioreator de coluna anaeróbia contendo bactérias sulfato redutoras é bastante eficaz, alterando o pH de  $\cong 4,0$  para cerca de 7,2, com remoção de mais de 80% do sulfato, além de remover mais de 97,5% de Cu, Zn e Ni, e mais de 82% de Fe. Além disso esse processo apresentou menores custos se comparado ao anteriormente usado: neutralização por adição de uma substância alcalina.

Uma outra proposta de tratamento das águas ácidas utilizando bactérias sulfato redutoras é o uso de áreas alagadas (“wetland”). Uma planta em operação desde 1993 em uma mina de estanho, em Cornwall, UK, consiste em três sistemas separados que compreendem cinco câmaras aeróbicas, uma célula anaeróbica e uma rocha associada a algas. Nas células aeróbicas ocorre a precipitação de alguns metais, no caso do experimento, o Ferro. Na célula anaeróbica é feita a correção do pH devido a presença das bactérias sulfato redutoras, e inicia-se a precipitação do Mn, que termina na terceira célula. Essa última, contém alga associada a um tipo de rocha e sua função é filtrar, retendo metais pesados (HALLBERG & JOHNSON, 2001).

Outro tipo de bioreator utilizado para o tratamento de águas ácidas consiste de um processo, onde a água ácida é submetida à um pré-tratamento com adição de uma rocha calcária, pois, segundo os autores, esse pré-tratamento induz uma variação no pH que passa de  $\sim 3,0$  para próximo da neutralidade, cerca de 6,0, aumentando a eficiência das bactérias sulfato redutoras. Além disso verificou-se que se a água da alimentação do terceiro bioreator fosse fria ou gelada, não havia alteração na população, nem na atividade das bactérias sulfato redutoras. (NORDWICK *et al.*, 2003)

Elliot *et al.*, 1998 realizaram testes para o tratamento de águas ácidas utilizando um bioreator de coluna de fluxo contínuo. Nesse estudo, o bioreator foi preparado com a adição de meio de cultivo Postgate B (POSTGATE, 1979), sem a adição de sulfato de ferro para impedir a precipitação de sulfeto de ferro. O pH do efluente era reduzido progressivamente e eram medidos o pH final e a concentração de sulfeto de hidrogênio produzido. Após um período de adaptação do consórcio de BRS presente no bioreator, verificou-se que o pH do efluente estava maior (4,5-6,1; 4,0-6,24; 3,5-5,63; 3,25-5,82), bem como uma produção de

sulfeto de hidrogênio decorrente da redução do sulfato dissolvido. Outros autores também realizaram estudos com bioreatores de coluna obtendo resultados satisfatórios de redução de sulfato e aumento de pH (TSUKAMOTO *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2000; CHRISTENSEN *et al.*, 1996)

### **2.3) Bactérias sulfato redutoras**

#### 2.3.1) Classificação e características gerais

O nome “bactéria redutora de sulfato” é convencionalmente reservado para microrganismos que conduzem a *redução dissimilatória do sulfato*. Nesse processo o íon sulfato atua como um agente oxidante para a dissimilação da matéria orgânica. O sulfato é utilizado como aceptor final de elétrons e o sulfeto de hidrogênio formado é excretado (GOTTSCHALK, 1979).

O enxofre pode existir em diversos estados de oxidação. Em ambientes aeróbios o sulfato é termodinamicamente estável e em ambientes reduzidos o sulfeto é mais estável. No entanto a redução de sulfato a sulfeto não ocorre espontaneamente nas condições físicas da atmosfera, e requer uma mediação catalítica por atividade biológica. A redução biológica do sulfato pode ser:

- Redução assimilatória – O enxofre é necessário para a biossíntese de componentes citoplasmáticos, sendo incorporado pelos organismos, compõe as estruturas químicas de aminoácidos, ácidos nucleicos e em alguns co-fatores, tais como biotina e ácido pantotênico (POSTGATE, 1979). Ele está presente no citoplasma como ânion  $\text{HS}^-$ , em que o enxofre está no seu estado mais reduzido, correspondendo ao sulfeto (em condições de anaerobiose).
- Redução dissimilatória – Sob condições anaeróbias, as BRS podem utilizar sulfato como aceptor final de elétrons no sistema de transporte de elétrons. Essas bactérias são geralmente organotróficas e oxidam compostos orgânicos de baixo peso molecular e simultaneamente reduzem sulfato a sulfeto (NEDWELL, 1982).

Bactérias redutoras de sulfato são um grupo diverso de procariotas que podem ser divididas em quatro subgrupos formados na análise das seqüências de 16S rRNA: BRS mesofílicas Gram-negativas; BRS Gram-positivas formadoras de esporos; BRS bactérias termofílicas ; e BRS archaeas termofílicas. Todos esses grupos se caracterizam por usar o sulfato como aceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica (CASTRO *et al.*, 2000).

As bactérias redutoras de sulfato contribuem para uma variedade de funções essenciais em muitos ambientes anaeróbios. Em adição a essa importância óbvia para o ciclo do enxofre, BRS são importantes reguladores de uma variedade de processos em “wetlands”, inclusive no aproveitamento da matéria orgânica, biodegradação de poluentes aromáticos clorados em solos anaeróbios e sedimentos e na metilação do mercúrio (CASTRO *et al.*, 2000).

Segundo Cortés (2005) os processos biológicos têm por principal característica a realização de reações químicas complexas, que normalmente ocorreriam à temperatura e pressão ambientais, em contraste com os processos químicos que precisam de energia, pressão e catalisadores para realizar a reação. Eles utilizam enzimas que são capazes de diminuir a energia de ativação da reação, gerando um produto com uma eficiência de 100% sem geração de resíduos.

Todavia as BRS requerem certos ambientes específicos: um ambiente anaeróbio com um potencial redox abaixo de -100mV e um pH acima de 5.5. Ambos os fatores podem limitar o tratamento da DAM. Em contraste com esse fato, em alguns casos, foi observada atividade biológica em "wetlands" e sedimentos de lagos, com presença de BRS em pH por volta de 3. Outro aspecto questionável é se essas bactérias podem crescer na presença de altas concentrações de metais e além disso qual é tóxico para elas.

As BRS são anaeróbios estritos, têm crescimento relativamente lento comparado aos demais organismos presentes no solo e na água, mas podem sobreviver em ambientes terrestres e aquáticos. As BRS compõe-se de espécies mesofílicas que crescem melhor em temperatura por volta de 30°C, mas tolerando até 42°C, e espécies termofílicas capazes de crescer em temperaturas entre 50°C e 70°C. Alguns acreditavam que as espécies que toleram altas temperaturas eram variedades adaptadas de alguns organismos mesofílicos. (POSTGATE, 1979).

Campbell *et al.*, 1956 mostraram conclusivamente que os tipos mesofílicos isolados e avaliados com diferentes coleções, eram espécies completamente diferentes. Hoje as interconversões são consideradas equivocadas.

Dois gêneros foram conhecidos por muito tempo (*Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*), mas recentemente novos gêneros foram identificados (*Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus* etc.). Fora a capacidade para reduzir sulfato, esses outros gêneros parecem ser biologicamente muito diferentes dos dois primeiros, exceto o gênero *Desulfomonas* que é muito semelhante a *Desulfovibrio*. O Gênero *Desulfovibrio* é mais conhecido porque seus membros são relativamente fáceis de isolar e purificar; são usualmente mesofílicos e podem ser halofílicos, não formam esporos e são gram-negativos. O gênero *Desulfotomaculum* apresenta indivíduos mesofílicos ou termofílicos, mas ocorrências naturais de espécies halofílicas são raras. Todos os membros formam esporos. (POSTGATE, 1979). Pfennig *et al.* (1981) sugeriu que todas as BRS envolvidas no processo dissimilatório fossem classificadas em um único grupo ecofisiológico.

Morfologicamente a maioria das espécies de *Desulfovibrio* são curvadas ou sigmóides, mas desvios da regra existem. São propensos ao pleomorfismo em culturas velhas ou em ambiente insatisfatoriamente favorável: eles tendem a formar variedades espiraladas. A morfologia, na verdade não é um bom critério para identificação de BRS, porque de início os trabalhos podem ter obtido uma idéia exagerada do pleomorfismo como resultado de estudos com culturas impuras. E mesmo culturas puras, podem apresentar inúmeras formas devido ao pleomorfismo acarretado pelo ambiente desfavorável. (POSTGATE, 1979).

Para comparações morfológicas é aconselhável a padronização das condições de crescimento. A morfologia flagelar é um bom critério taxonômico. O flagelo de *Desulfotomaculum* é usualmente peritricoso e aparece originado lateralmente. No entanto o flagelo é facilmente perdido durante a manipulação e semelhante a formas monotricosas podem ser observadas. A formação de esporos provavelmente é uma das principais distinções entre *Desulfotomaculum* e as outras BRS, ainda que a esporulação por *Desulfotomaculum* não seja um evento previsível (POSTGATE, 1979).

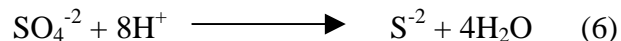
As BRS são microrganismos quimiolitotróficos anaeróbios estritos, que podem ser divididos em quatro grupos: bactérias gram-negativas mesofílicas, bactérias gram-positivas formadoras de esporos, bactérias termofílicas, e arqueabactérias. Elas se caracterizam por “respirar” sulfato e utilizar hidrogênio como fonte de energia, gerando rapidamente H<sub>2</sub>S (BANDZIONG *et al.*, 1978; KREKELER *et al.*, 1995; CIPIONKA *et al.*, 1998). A espécie típica de BRS, representada por *Desulfovibrio desulfuricans*, podendo reduzir sulfato autotroficamente (ausência de fonte de carbono orgânico) com hidrogênio e heterotroficamente usando lactato como doador de elétrons (CHANG *et al.*, 2000; NAGPAL *et al.*, 2000)

O grupo das hidrogênio-lactato compreende principalmente espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* que utilizam ácidos láctico, pirúvico, succínico, fumárico e málico, em adição ao etanol, formato e glicerol. Alguns organismos com este metabolismo padrão podem utilizar hidrogênio como doador de elétrons na presença de CO<sub>2</sub>, acetato ou outra fonte carbônica. Esta habilidade tem sido utilizada em reatores em escala laboratorial para produção de gás, o qual contém uma substancial proporção de hidrogênio, como um substrato para BRS para remover sulfato industrial. BRS deste padrão metabólico apresentam crescimento relativamente rápido (DU PREEZ *et al.*, 1992; HANSEN, 1993).

Espécies de *Desulfobacter* são capazes de oxidar o acetato a CO<sub>2</sub>. Embora algumas espécies podem utilizar lactato ou etanol, a gama de substâncias é geralmente muito limitada e este grupo não é capaz de utilizar H<sub>2</sub> como doador de elétron. O crescimento é lento (POSTGATE, 1979).

### 2.3.2) Aspectos Metabólicos

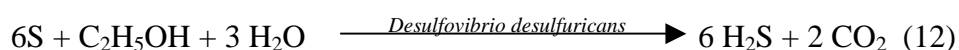
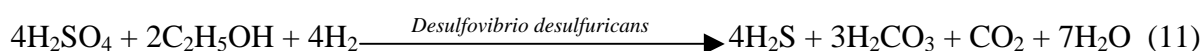
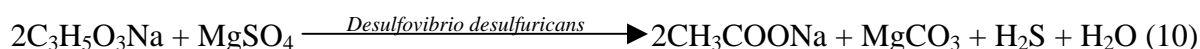
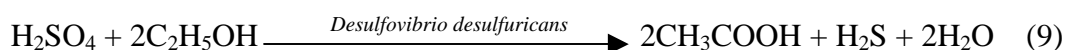
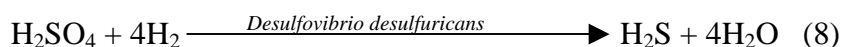
BRS utilizam os produtos finais de outras fermentações, tais como lactato, malato e etanol como doadores de H<sup>+</sup>: esses compostos são oxidados a acetato e CO<sub>2</sub>. A energia gerada é empregada na redução do sulfato a sulfeto. O sulfeto pode reagir com metais dissolvidos formando sulfeto metálico que precipita.





BRS obtêm o carbono e a energia necessários para o crescimento de várias rotas metabólicas. O crescimento quimiorganotrófico pode ser realizado através de compostos de carbono simples, tais como lactato. Alternativamente, as fontes de carbono e energia podem estar separadas, e os compostos de carbono orgânico que não são assimilados para crescimento, tais como formato e isobutanol, podem servir como doadores de elétrons para geração de energia enquanto outros compostos de carbono são assimilados para crescimento. Este modelo de crescimento tem sido chamado de “mixotrófico” (POSTGATE, 1979). Hidrogênio pode ser utilizado como um doador de elétron e essa situação extrema de crescimento pode ser chamada de “quimiolitotrofia”, também chamado de crescimento autotrófico (PFENNIG *et al.*, 1981).

O processo utiliza sulfato ou enxofre como receptor de elétrons, hidrogênio (ou etanol, lactato) como fonte de energia e CO<sub>2</sub> (ou etanol, lactato) como fonte de carbono, gerando como produto o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), H<sub>2</sub>O e biomassa, de acordo com as reações descritas abaixo:



Estas reações ocorrem em pH 7,0 e 30°C em anaerobiose.

No meio ambiente natural, as bactérias redutoras de sulfato concorrem com as bactérias metanogênicas por substratos comuns que são hidrogênio, formiato e acetato. Esta característica justifica a utilização de culturas mistas na redução de sulfato e produção de H<sub>2</sub>S em biorreatores (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994), desde que as condições favoráveis às

BRS sejam estabelecidas. Em sistemas reais, a proporção entre sulfato e carbono é a que origina a prevalência das metanogênicas ou as sulfetogênicas (exclusão biocompetitiva).

### 2.3.3) Produção de H<sub>2</sub>S

O H<sub>2</sub>S, produto do metabolismo das BRS, pode reagir com os metais pesados presentes no efluente, formando sulfetos insolúveis. A produção de sulfeto metálico se dá sem a utilização de outro insumo no processo. Independentemente da origem (biológica ou não) do íon sulfeto, a sua utilização para precipitar os metais pesados, se comparada à precipitação com leite de cal, apresenta as seguintes vantagens:

- A solubilidade dos sulfetos é muito menor do que a dos correspondentes hidróxidos;
- Os sulfetos podem ser precipitados seletivamente;
- Existe a possibilidade de recuperação dos metais de interesse comercial a partir dos sulfetos metálicos;
- Apresenta uma alta reatividade sob uma ampla faixa de pH (FOUCHER *et al.*, 2001; GLOMBITZA, 2001).

A solubilidade dos sulfetos metálicos diminui à medida que se aumenta o pH, sendo possível uma precipitação seletiva. Em comparação, os hidróxidos são insolúveis em pH mais elevados do que aqueles observados para os sulfetos (CORTÉS, 2005).

As bactérias redutoras de sulfato apresentam características bioquímicas particulares. Segundo as vias metabólicas, para a geração de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) a principal fonte de energia (doador de elétrons) é o hidrogênio. Vias alternativas, utilizando compostos orgânicos, usam a oxidação destes e os elétrons para produzir hidrogênio via hidrogenases presentes no citoplasma (hidrogenase -Fe). O metanol, por exemplo, é transformado em CO<sub>2</sub> liberando prótons e elétrons que são utilizados na geração de hidrogênio no citoplasma. O hidrogênio sai do citoplasma para o espaço periplasmático e interage com a hidrogenase presente na membrana plasmática (hidrogenase Ni-Fe) gerando novamente elétrons e prótons. Os elétrons são transferidos pelo citocromo c<sub>3</sub> a diferentes enzimas de oxirredução

(adenosina fosfossulfato redutase, desulfovirdina, tritionato redutase, tiosulfato redutase) permitindo a redução do sulfato até sulfeto ou de enxofre até sulfeto, que sai da célula como sulfeto de hidrogênio. Os prótons formados geram um gradiente eletroquímico permitindo gerar ATP via ATPase. No caso do enxofre como substrato e etanol (como fonte de energia) ele é transformado até chegar a piruvato que entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Os elétrons são transferidos para moléculas redutoras que finalmente os transferem ao sulfito via ferredoxina, gerando H<sub>2</sub>S (CHOI *et al.*, 1994).

Como fonte de carbono muitas BRS fixam CO<sub>2</sub> utilizando uma via alternativa (rota do monóxido de carbono desidrogenase).

A eficiência do processo vai depender de vários fatores, dentre eles a transferência gás-líquido para o caso do hidrogênio, da disponibilidade da fonte de elétrons como orgânicos e sua transformação até hidrogênio e a eficiência das diferentes rotas metabólicas.

Processos de redução de metais podem ser úteis quando acoplados a redução de sulfato, sendo este último um aceptor final de elétrons, produzindo sulfeto. Eles dissimilam carbono via mecanismos respiratórios. A gama de fontes de carbono utilizadas pelas BRS como um todo são muito variadas e inclui álcoois, ácidos orgânicos e hidrocarbonetos. No entanto, espécies individuais são capazes de metabolizar uma quantidade limitada desses substratos e as preferências têm sido utilizadas para dividir as BRS em grupos diferentes com importantes aspectos de crescimento (CORTÉS, 2005).

### **3) OBJETIVOS**

Avaliação sazonal e espacial (fizemos superfície, fundo e sedimento) da presença de Bactérias Redutoras de Sulfato(BRS) e caracterização química do efluente líquido oriundo da cava da mina e pilha de estéreis de mina de urânio em fase de descomissionamento.

### **4) MATERIAIS E MÉTODOS**

Este trabalho seguiu um planejamento de coleta de amostras, no período de fevereiro a dezembro de 2004, de conforme procedimentos detalhados abaixo. Foi feita uma



atualização e treinamento nos procedimentos analíticos para utilização no desenvolvimento do trabalho experimental do projeto global.

#### 4.1) Amostras

Amostras de água e sedimento foram coletadas nos efluentes líquidos da cava da mina e dos bota-foras 4 e 8. Estas amostras foram coletadas em diferentes níveis de profundidade e periodicamente para realização de um estudo sazonal, durante o período de fevereiro a dezembro de 2004. Para cada amostra coletada foram realizadas determinações microbiológicas e físico-químicas. As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro esterilizados, escuros, cheios até a borda e fechados imediatamente. As amostras de sedimento da cava da mina foram coletadas com coletor de sedimento tipo core. Nos pontos BF4 e BF8 a coleta de sedimento foi realizada com coletor tipo draga e em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e conduzidos ao laboratório para as análises. Os inóculos eram feitos no dia da coleta, e quando isto não era possível as amostras eram armazenadas em geladeira até o dia seguinte, de forma à garantir sua preservação.

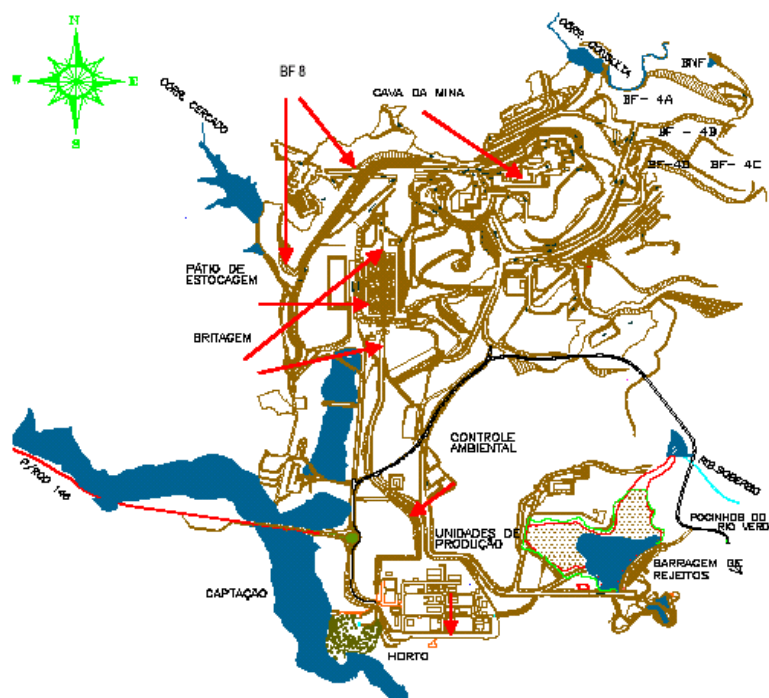


Figura 6.: Arranjo Físico do Complexo Mínero-Industrial do Planalto de Poços de Caldas.  
Fonte: Cipriani, 2002.

## 4.2) Análises microbiológicas

### 4.2.1) Bactérias redutoras de sulfato

A determinação da ocorrência de bactérias redutoras de sulfato em amostras de água e de sedimento foi realizada usando-se o meio de cultivo Postgate B pelo método dos tubos múltiplos (série de cinco tubos). O número mais provável por grama (NMP.g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup>) de bactérias redutoras de sulfato foi determinado por meio de tabela de número mais provável, apropriada às diluições inoculadas (Postgate, 1979).

TABELA 1 – Composição do meio de cultura Postgate B

Composição do meio B (Postgate, 1979)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
CaSO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 g
Lactato de sódio	3,5 g
Extrato de levedura	1,0 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Ácido Tioglicólico	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL
Dissolva os reagentes na ordem descrita, ajuste o pH entre 7,0 e 7,5. Este meio sempre contém um precipitado.	

### 4.2.2) Contagem total de bactérias

Alíquotas de cada amostra de água previamente fixadas com formaldeído (concentração final de 2 %) foram coradas com solução aquosa de corante laranja de acridina na concentração de 1,0 g/L. Após 5 minutos de contato da amostra com a solução corante, a amostra foi filtrada em membrana de policarbonato (Millipore, coradas com Sudam Black), com poro de 0,22 µm. (Anexo II). A membrana foi em seguida colocada sobre lâmina fina e analisada sob microscópio de epi-fluorescência (Microscópio Zeiss-Axioplan 2, filtro UV

450 - 490, FT 510, LP 520, lâmpada de mercúrio HBO 50 W e objetiva neofluor 100 X /1,30). Foram contados 50 campos microscópicos, de modo que a área de cada campo foi de 625 mm<sup>2</sup>.

Fórmula para o cálculo do número de bactérias/mL de amostra:

$$N = \frac{g \cdot A \cdot D}{a \cdot V} \quad (13)$$

Onde:

N = n° de bactérias /mL;

g = média do n° de bactérias/50campos;

A = área de filtração;

D = fator de diluição;

a = área do campo;

V = volume filtrado.

### ***4.3) Análise físico-químicas***

#### ***4.3.1) Temperatura da Água, pH e Oxigênio Dissolvido na Água***

A temperatura da água e as determinações de pH foram feitas no campo com o auxílio de um Eletrodo de pH Combinado WTW - 320. As determinações de oxigênio dissolvido na água foram realizadas por titulometria, segundo Eaton, (1995).

#### ***4.3.2) Material em Suspensão e Matéria Orgânica***

O material em suspensão (total, orgânico e inorgânico) foi determinado usando-se filtros Millipore (microfibra de vidro) com 47 mm de diâmetro previamente secos (110 °C/ 1 h.) e pesados. Filtrou-se 1000 ml da amostra em Conjunto Millipore; retirou-se o filtro com a amostra secando-a a 110 °C por 2 horas. Pesou-se novamente, transferindo-se a amostra para um cadinho de porcelana previamente tarado, colocando-o em mufla a 150 °C por 30 minutos. Em seguida a temperatura foi elevada em 50 °C de hora em hora até alcançar 450 °C, permanecendo nesta temperatura por 2 horas.

A matéria orgânica no sedimento foi determinada através da perda por ignição. Amostras de sedimento de peso e volume conhecidos foram secas a 110 °C até peso constante. Em seguida pesadas e recolocadas em mufla a 450 °C por 5 horas. Os resultados obtidos para as amostras de água e de sedimento foram expressos em porcentagem de matéria orgânica.

#### ***4.4) Análises Químicas e Radioquímicas***

As análises de dureza (cálcio e magnésio), manganês e zinco foram realizados por espectrometria de absorção atômica por plasma acoplado indutivamente. O fosfato foi analisado através de espectrofotometria vil, com molibdato. O sulfato foi analisado por espectrofotometria com cloreto de bário e o fluoreto por potenciometria com eletrodo seletivo (Nascimento *et al.*, 1988). O urânio e o tório foram analisados por espectrofotometria com arsenazo III segundo Fukuma *et al.*, 2001.

O método utilizado para determinação de Ra-226, Ra-228 e Pb-210 foi a coprecipitação com sulfato e cromato respectivamente, seguida da contagem alfa e beta dos seus filhos, ou seja: Rn-222 no caso do Ra-226, Ac-228 para o Ra-228 e Bi-210 no caso do Pb-210, após equilíbrio radiativo, em contador de ultra- baixo background. Para o Po-210, foi usado o método deposição direta em meio redutor em plaquetas de prata e a determinação realizada em espectrômetro alfa usando detetor de barreira de superfície.

#### ***4.5) Índice de estado trófico***

A clorofila “a” foi determinada conforme recomendada por Marker *et al.*, 1980, usando etanol 90% quente como solvente para extração. As concentrações de clorofila foram calculadas pelas equações de Lorenzen, 1967.

O índice de estado trófico foi calculado pela metodologia de Carlson, 1977, baseada no parâmetro clorofila “a”, tal equação está mostrada abaixo:

$$\text{TSI (Chl)} = 10(6 - 2,04 - 0,68 \text{ LnChl}) / \text{Ln}2 \quad (14)$$

Onde: TSI = Trophic state index (Índice de Estado Trófico), Chl = clorofila

## 5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relevância apresentada neste trabalho concentra em grande parte na implementação de metodologias mais confiáveis para quantificação das bactérias sulfato redutoras, objeto desta linha de pesquisa, nos laboratórios da CNEN de Poços de Caldas, uma vez que no Brasil, poucos grupos de pesquisa na área de microbiologia ambiental dispõem destas metodologias de caracterização e desenvolvimento de processos com microrganismos anaeróbicos. A complementação de técnicas e instalações do Laboratório de Radioecologia da COLAB/CNEN - Poços de Caldas com suporte dos pesquisadores da USP e recursos da FAPEMIG, significou um avanço importante para esta linha de trabalho no âmbito da CNEN.

Os valores médios de temperatura observados nos pontos CM (superfície), CM (12,5 m de profundidade), BF8 e BF4, foram, respectivamente: 22 0C, 19 0C, 22 0C e 21 0C.

### 5.1) Caracterização radiológica e química

Na tabela 2 é apresentada a caracterização radiológica das amostras de água e sedimento coletadas nos pontos CM (cava da mina), BF8 e BF4. Os elementos analisados foram: Urânio, Tório, Rádio, Chumbo e Polônio.

Tabela 2. Caracterização radiológica das amostras dos pontos CM, BF8 e BF4

Pontos	U (mg.L <sup>-1</sup> )	Th (mg.L <sup>-1</sup> )	Ra-226 (Bq.L <sup>-1</sup> )	Ra-228 (Bq.L <sup>-1</sup> )	Pb-210 (Bq.L <sup>-1</sup> )	Po-210 (Bq.L <sup>-1</sup> )
<b>Água</b>						
CM	5,84	0,22	1,09	0,02	0,28	0,049
BF8	12,08	0,19	0,57	0,60	1,1	0,16
BF4	9,25	0,25	0,53	0,36	1,2	0,20
Limite	0,02*	-	1,0**	0,1***	0,1***	0,1***
<b>Sedimento</b>						
Pontos	U (%)	Th (%)	Ra-226 (Bq.Kg <sup>-1</sup> )	Ra-228 (Bq.Kg <sup>-1</sup> )	Pb-210 (Bq.Kg <sup>-1</sup> )	Po-210 (Bq.Kg <sup>-1</sup> )
CM	0,396	0,02	-	-	-	-
BF8	0,02	0,01	830±60	430±50	820±120	-
BF4	0,03	0,03	430±40	620±60	580±80	-

\* Limite estabelecido pela Resolução CONAMA, 2005 para águas doces classe 3; \*\* Limite adotado pela INB; \*\*\* Limite estabelecido pela CNEN.

Como pode ser observado os valores apresentados na tabela 2 para água referente ao Urânio, ao Rádio 228, ao Chumbo e ao Polônio estão acima dos permitidos pela legislação. Em alguns casos, como por exemplo o efluente gerado no ponto BF8, a concentração de urânio é 600 vezes maior que o aceito pela legislação ambiental. De acordo com Nascimento, 1998 o rigor das normas ambientais com respeito ao urânio no ambiente se deve mais às conseqüências de sua toxicidade química do que a radiológica. O urânio precipita proteínas e reduz a atividade de algumas enzimas em órgãos como os rins, onde as concentrações de íons urânio livre ocorre por ingestão. Isso acarreta um mal funcionamento do órgão, e em casos extremos, uremia letal.

De acordo com Ronqui *et al.*, 2004 a bacia das Antas, que recebe os efluentes tratados da UTM, apresenta qualidade de água classe III. De acordo com Resolução CONAMA, 2005 foi verificado que os efluentes estocados na cava da mina, BF8 e BF4 apresentam valores de metais (zinco e manganês) que excedem os limites máximos recomendados para efluente, como mostrado na tabela 3. O tratamento desse efluente utilizando bactérias redutoras de sulfato que promovem a redução do íon sulfato a sulfeto, poderá levar a diminuição da concentração dos metais através da precipitação dos sulfetos metálicos e, conseqüentemente, o decréscimo da concentração de sulfato.

Tabela 3. Análises químicas das amostras dos pontos CM, BF8 e BF4.

Pontos	F <sup>-1</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	Mn	Zn	(SO <sub>4</sub> ) <sup>-2</sup>
<b>Água</b>					
CM	70,95	4,60	97,66	16,83	1385,50
BF8	116,81	< 0,03	137,61	22,59	1548,75
BF4	121,44	< 0,03	107,38	17,95	1247,14
Limite permitido	10,0	-	1,0	5,0	-
<b>Sedimento</b>					
CM	4,16	0,137+0,006	4,94+0,03	0,935+0,001	12,10
BF8	0,06	0,217+0,006	0,24	0,06	2,91
BF4	0,04	0,254+0,006	1,14	0,04	0,43

Concentrações das espécies na água - mg.L-1 e (%) no sedimento

Garcia *et al.*, 2001 verificaram que a água ácida da uma mina pirítica da Espanha mostrou valores de sulfato entre 1800 e 2000 ppm e concentração de zinco entre 30 e 50 ppm. Esses níveis são mais altos que os encontrados nesse trabalho (Tabela 3).

Na tabela 4 são apresentados os valores referentes à sólido em suspensão e dureza da água ácida coletada nos três pontos analisados.

TABELA 4 – Sólido em suspensão e dureza da água ácida dos três pontos coletados

	Sólido em suspensão (g/L)			Dureza (mg/L)		
	CM	BF8	BF4	CM	BF8	BF4
FEV	0,006	0,006	0,004	1035,77	377,00	283,00
MAR	0,006	0,007	0,009	1155,50	473,00	309,00
ABR	0,006	0,005	0,007	1066,67	491,40	308,50
AGO	0,006	0,005	0,005	1118,50	547,00	283,00
SET	0,006	0,005	0,006	1267,50	517,00	237,00
OUT	0,006	0,006	0,004	1144,50	496,00	230,00
NOV	0,006	0,005	0,005	1193,00	586,00	318,00
DEZ	0,006	0,006	0,006	1211,00	545,00	267,00

### 5.2) Análises microbiológicas

Em relação a ocorrência de bactéria nas amostras de água, o ponto BF8 apresentou a maior capacidade para crescimento bacteriano, sendo o maior valor de contagem total de bactéria ( $13,3 \cdot 10^5$  bactéria.mL<sup>-1</sup>) observado em fevereiro neste ponto. Os valores médios encontrados são: ponto BF8 ( $1,1 \cdot 10^6$  bactéria.mL<sup>-1</sup>), ponto CM ( $3,5 \cdot 10^5$  bactéria.mL<sup>-1</sup>) e ponto BF4 ( $3,4 \cdot 10^5$  bactéria.mL<sup>-1</sup>). Frömmichen *et al.*, 2004 realizou estudos de microcosmos simulando um pequeno lago com água ácida de mina (pH=2,6). A contagem total de bactérias obtida na coluna d'água por esses autores variaram entre  $10^5$  a  $10^6$  bactéria.mL<sup>-1</sup>, estando de acordo com os valores obtidos neste trabalho – Figura 7.

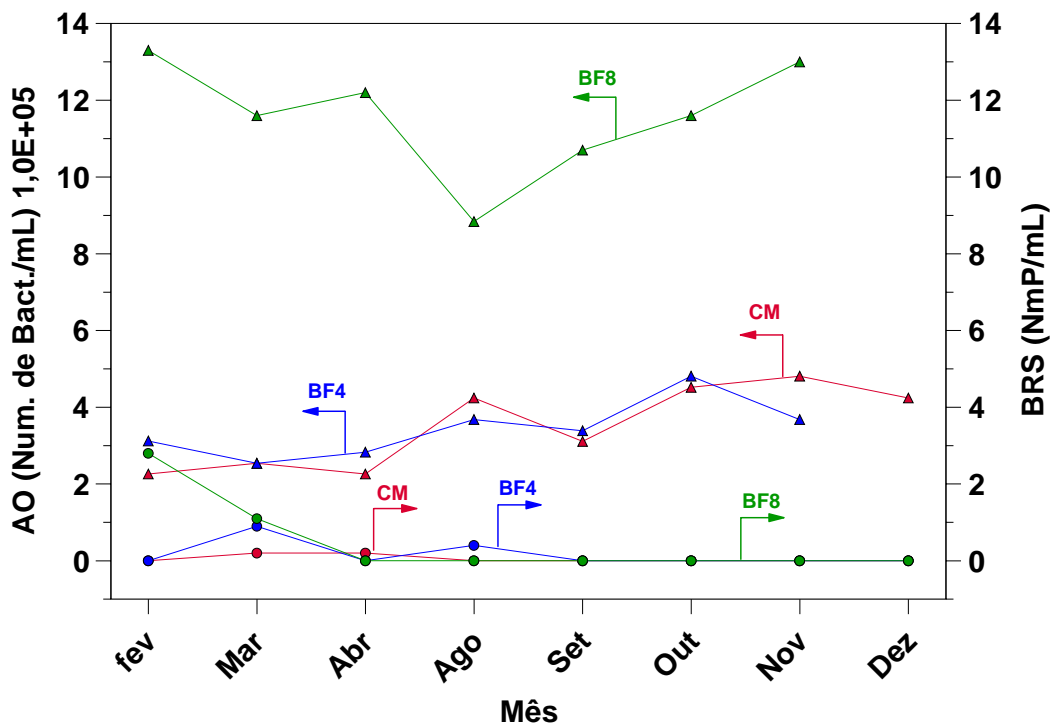


Figura 7 – Número de bactérias e BRS observadas em amostras de água nos três pontos amostrados. AO: Acridine orange (Laranja de acridina); BRS: Bactérias redutoras de sulfato; BF4: Bota-fora 4; BF8: Bota-fora 8; CM: Cava da mina.

De acordo com os índices de estado trófico calculados conforme Carlson, 1977, os três pontos amostrados podem ser considerados eutróficos (Índices tróficos BF8 =57,7, BF4=58,4 and CM=53,8). O valor médio de bactérias no ponto BF8 ( $1,1 \cdot 10^6$  bacteria.mL<sup>-1</sup>) foi similar ao encontrado por Ferrari, 2002 em lago oligotrófico,  $1,2 \cdot 10^6$  bactéria.mL<sup>-1</sup>. No entanto no pontos BF4 e CM o número de bactérias/mL foi menor que as medidas de Ferrari. Estes resultados podem estar associados com as altas concentrações de metais na água ácida e aos baixos valores de pH (cerca de 3,8), que podem estar interferindo no crescimento bacteriano.

O maior valor de BRS ( $2,8$  MPN.mL<sup>-1</sup>) foi observado também em Fevereiro no ponto BF8 (Figura 7). Os valores médios de BRS observados nas amostras de água analisadas no presente estudo foram baixos: BF8=  $1,95$  MPN.mL<sup>-1</sup>, BF4=  $0,65$  MPN.mL<sup>-1</sup> e CM =  $0,2$  MPN.mL<sup>-1</sup>, e são similares aos resultados obtidos em outros estudos realizados com amostras de água ácida de mina (Frömmichen *et al.*, 2004, Garcia *et al.*, 2001). Alguns



trabalhos têm mostrado que as altas concentrações de metais pesados e o baixo pH ( 3.0 - 3.5) são fatores limitantes que influenciam o crescimento de BRS em águas ácidas de mina (Garcia *et al.*, 2001).O período estudado mostrou baixos níveis de BRS, conforme mostrado anteriormente.

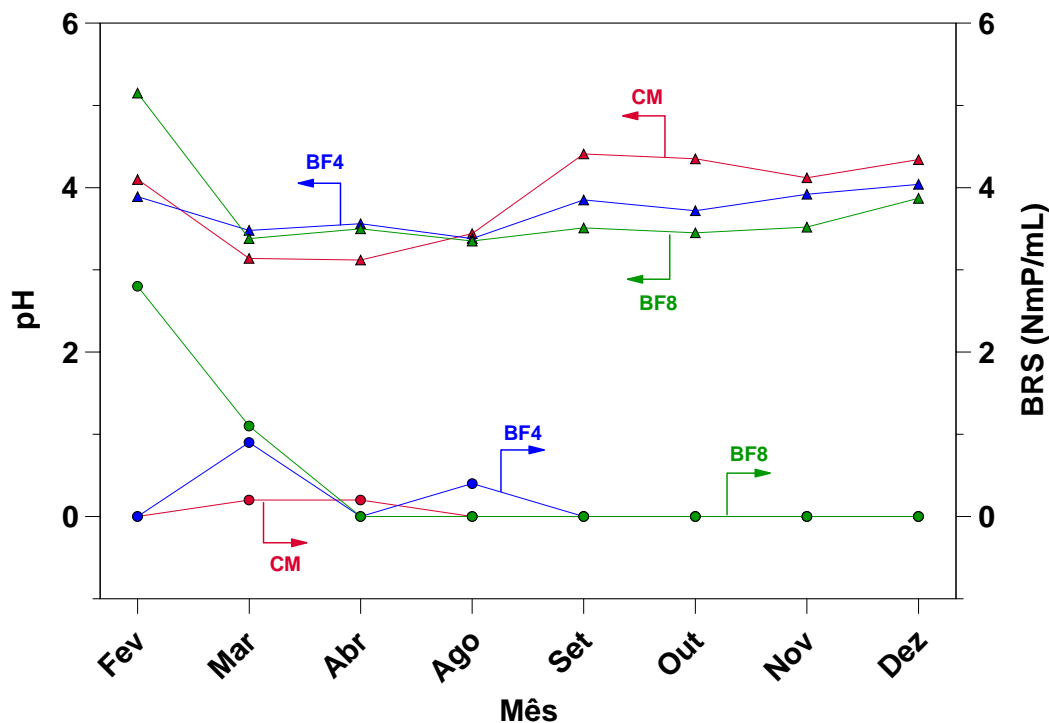


Figura 8 – Valores de pH e contagem de BRS nas amostras de água coletadas. BRS: Bactérias redutoras de sulfato; BF4: Bota-fora 4; BF8: Bota-fora 8; CM: Cava da mina.

Os valores de pH medidos nas amostras de água para os três pontos estudados apresentaram baixos valores, durante todo o período de análise. O menor valor de pH, abaixo de 3,5, foi medido entre os meses de março e abril no ponto CM. O maior valor de BRS foi detectado em Fevereiro no ponto BF8,  $2,8 \text{ NMP.mL}^{-1}$ , como pode ser observado na Figura 8, quando o pH da água também apresentou maiores valores, cerca de 5.2. Estudos com reatores anaeróbicos para remoção de metais e sulfatos da água ácida de mina têm mostrado alto crescimento bacteriano, cerca de  $4.0 \cdot 10^7$  to  $8.0 \cdot 10^8$  bacteria.mL<sup>-1</sup> em meio ácido, devido ao acréscimo de matéria orgânica nesses sistemas, Elliot *et al.*,1998; Jong & Parry, 2003.

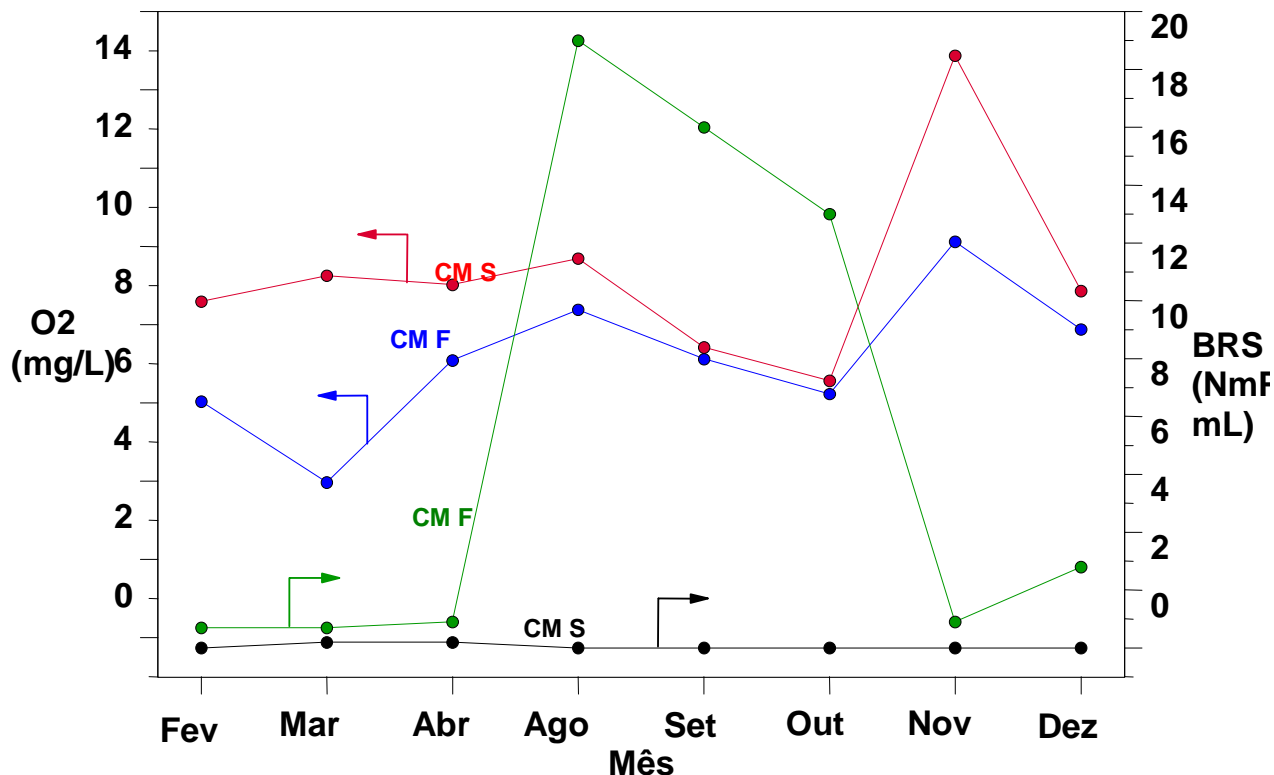


Figura 9 – Presença de BRS relacionada ao oxigênio dissolvido, em amostras de água da cava da mina.  
S: amostra de superfície; F: amostra do fundo

De acordo com os resultados esperados, Figura 9 mostra que os maiores valores de BRS foram detectados no período entre fevereiro e Agosto em amostras de água coletadas a 12,5m de profundidade na Cava da mina, onde foi detectado também a mais baixa concentração de oxigênio dissolvido ao longo de todo período estudado. Os valores de oxigênio dissolvido nas amostras de sedimento no lago de mina (UTM) variaram de 4,0 a 10,1 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e foram similares aos valores obtidos por Meier *et al.*, (2004) usando amostras da interface sedimento/água de água ácida da Lusatia (Alemanha).

As Figuras 10 e 11 mostram os valores de BRS bem como a maior ocorrência destas nas amostras de sedimento nos três pontos amostrados em comparação com as amostras de água. Este resultado era esperado uma vez que as concentrações de oxigênio dissolvido são menores no sedimento e este apresenta uma maior quantidade de matéria orgânica. Estes resultados estão de acordo com diferentes estudos realizados com águas ácidas de mina, Frömmichen *et al.*, 2004; Méier *et al.*, 2004, García *et al.*, 2001, Benner *et al.*, 2000.

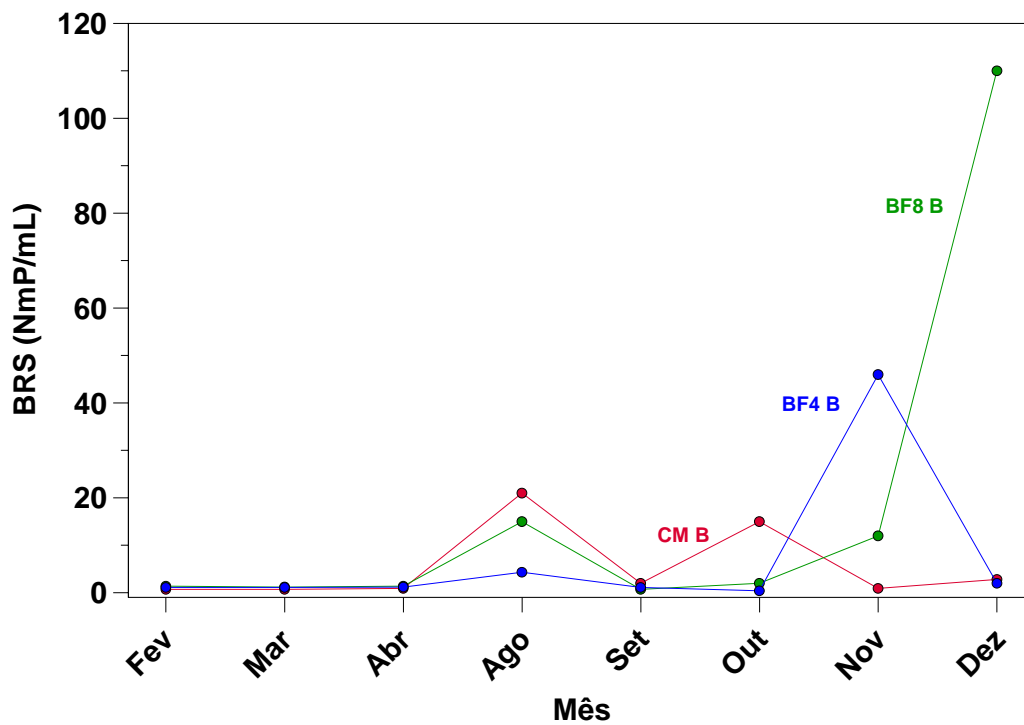


Figura 10 – Valores de BRS em amostras de sedimento.

BRS: Bactérias redutoras de sulfato; BF4: Bota-fora 4; BF8: Bota-fora 8; CM: Cava da mina.

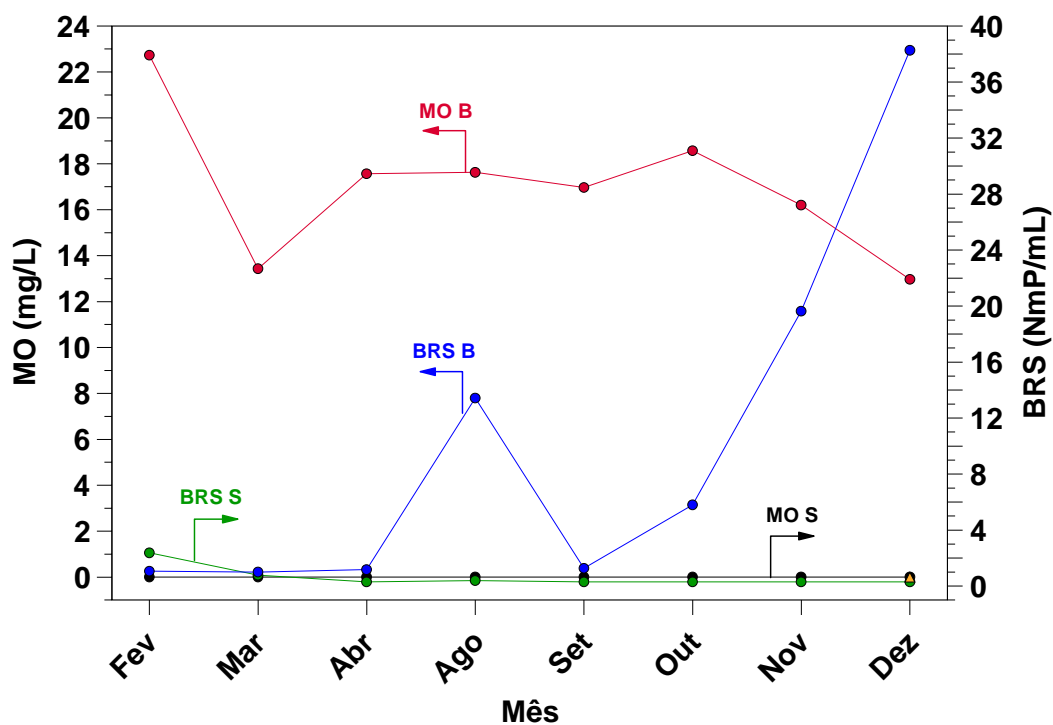


Figura 11 – Matéria orgânica e presença de BRS nas amostras de água e sedimento.

BRS: Bactérias redutoras de sulfato; MO: Matéria orgânica. S: Superfície; B: sedimento.

## **6) CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nos trabalhos experimentais mostram que o efluente ácido gerado apresenta altos teores de metais estáveis e radioativos, sulfato e baixo pH. As BRS estão presentes nos três pontos analisados, principalmente no sedimento do BF8, fato bastante interessante considerando as características ácidas desses efluentes.

Este trabalho é subsídio para trabalhos futuros, uma vez que ainda não havia sido realizada uma caracterização microbiológica destes efluentes.

## **7) CONTRIBUIÇÕES TÉCNICAS**

Trabalhos tecnológicos com aplicação técnica de bioremediação utilizando bactérias sulfato redutoras são relativamente novos se compararmos com as técnicas convencionais. No Brasil trabalhos práticos nessa área são extremamente limitados, quase que direcionados para instalações piloto. Neste aspecto o conhecimento produzido representa uma inovação tecnológica de grande importância, desde que poderá levar a implantação de novas tecnologias até então não disponíveis a nível nacional. O desenvolvimento desta pesquisa de mestrado resultou em outros aspectos relevantes para o projeto global onde ela está inserida que merecem ser destacados, dentre eles, citam – se:

### ***Estágio no laboratório de Microbiologia Ambiental da USP:***

O Estágio foi realizado durante um período de trinta dias sob orientação das professoras Dra. Vivian Helena Pellizari e Dra. Rosana Filomena Vazoller. Este estágio possibilitou o aprendizado de técnicas de microbiologia aplicada a organismos anaeróbios e algumas técnicas de biologia molecular, tal como FISH (Fluorescent *in situ* hibridization). Para isso foram feitos estudos intensos de revisão bibliográfica e trabalhos experimentais utilizando toda a infra estrutura laboratorial da USP. Foi feito um relatório de estágio, com descrição das diversas metodologias aplicadas no setor. (Anexo A).

### ***Projeto de pesquisa aprovado pela FAPEMIG***

Considerando a alta relevância do tema, a FAPEMIG aprovou a proposta submetida no início dos trabalhos o que possibilitou a liberação dos recursos utilizados na realização deste projeto de pesquisa. Além disso, o trabalho proporcionou uma interação técnica altamente qualificada entre as equipes do CDTN, COLAB (Laboratório de Poços de Caldas) e Laboratório USP, sendo os dois últimos reconhecidos por sua atuação na área de microbiologia aplicada. (Anexo B)

### ***Montagem do sistema laboratorial para ensaios com microrganismos***

Os conhecimentos adquiridos na USP foram fundamentais para instalação da bancada para trabalho com anaeróbios no Laboratório de de Microbiologia Poços de Caldas e para a implantação da técnica de FISH, fundamental para contagem das bactérias sulfato redutoras. Este laboratório é muito bem equipado, e a implementação de mais esta técnica irá favorecer ainda mais as pesquisas com as bactérias sulfato redutoras.

### ***Publicação de trabalhos***

Alguns resultados dessa pesquisa já foram apresentados em Congresso internacional: “Biohydro International Conference”, em Cape Town, maio/2005 e uma “technical note” relativa à esta apresentação será publicada na revista Minerals Engineering. além destes, foi apresentado em congresso internacional: “International Nuclear Atlantic Conference” (INAC 2005), agosto 2005. (Anexos C e D).

## 8) TRABALHOS FUTUROS

A meta final almejada consiste da definição de um processo de bioremediação alternativo ao processo convencional atualmente aplicado ao tratamento do efluente líquido gerado na mina em fase de descomissionamento de urânio, em Poços de Caldas. Nesta primeira fase da pesquisa identificaram-se as bactérias sulfato redutoras passíveis de serem isoladas do próprio local para desenvolvimento do processo de bioremediação. Para continuidade do trabalho, sugerem-se algumas linhas de desenvolvimento, fundamentais para se atingir o objetivo final deste grande projeto, quais sejam:

- Adaptação das BRS a valores de pH menores.

As BRS apresentam bom crescimento em pH 7, no entanto essa pesquisa comprovou a ocorrência existência da mesma em valores de pH ácido. Sendo assim, para uma futura utilização dessas bactérias na remediação da DAM, deve-se inicialmente preparar linhagens resistentes à pH mais baixos, o mais próximo possível daqueles encontrados no local pesquisado.

- Testes de redução

Realizar testes de bancada verificando a eficiência no processo de redução, em diversos valores de pH, principalmente naqueles semelhantes ao ambiente de DAM.

- Montagem do Bioreator em escala de bancada

Construção de um bioreator em escala laboratorial, para realização de testes de redução em um reator de fluxo contínuo.

- Implementação das técnicas moleculares (FISH).

Realização de experimentos utilizando as técnicas moleculares, que foram objeto de treinamento no laboratório de Microbiologia da USP e que devem ser repassados aos técnicos da CNEN, para controle dos processos a serem desenvolvidos.

## 8) BIBLIOGRAFIA

- AMARAL, E.C.S. Modificação da exposição à radiação natural devido a atividades agrícolas e industriais numa área de radioatividade natural elevada no Brasil, UFRJ, Rio de Janeiro, 130p. (Tese de Doutorado). 1992.
- AMARAL, E.C.S., Azevedo, H.P.L. & Mendonça, A.H. Pre-operational survey at the uranium mine and mill site, Poços de Caldas, M.G., Brasil. *Science Total Environment*, 42: 257-66, 1985.
- AMARAL, E.C.S., Godoy, J.M., Rochedo, F.R.R., Vasconcelos, L.M.H. & Pires do Rio, M.A. The environmental impact of the uranium industry: is the waste rock a significant contributor? *Radiation Protection Dosimetry*, 22(3): 165-71, 1988.
- BANDZIONG, W., THAUER, R.K. and ZEIKUS, J.G. Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. *Arch. Microbiol.* 116: 41-49, 1978.
- CAMPBELL, L.L., FRANK, H.A., HALL, E.R. Studies on thermophilic sulfate reducing bacteria. In: Identification of *Sporovibrio desulfuricans* as *Clostridium nigrificans*, *J. Bact.*, 73, 516-521, 1956.
- CARLSON, R.E. 1977. A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 22: 361-380.
- CASTRO, H.F., WILLIAMS, N.H., OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology Ecology*, 31: 1-9, 2000.
- CHANG, I.S., SHIN, P.K., KIM, B.H. Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. *Water Research*, 34(4): 1269-1277, 2000.



- CHOI, S.C., CHASE, T., BARTHA, R., Metabolic Pathways Leading to Mercury Methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS, *Applied and Environmental Microbiology*, 4072-4077, 1994.
- CHRISTENSEN, B.; LAAKE, M.; LIEN, T. Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Research*, 30(7), pp. 1617-1624, 1996.
- CIPIONKA, H. SMOCK, A.M., BOTTCHEER, M.E. A combined pathway of sulfur compound disproportionations in *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEMS microbiology letters*, 166, 181-186, 1998.
- CIPRIANI, M. Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio. Tese de doutorado. Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2002.
- CORK, D.J., CUSANOVISH, M.A. Sulfate decomposition: A microbial Process Metallurgical Application of Bacteria Leaching and related Microbial Phenomena. In: L.E. Mun, A.E. Arma, J.A. Brierly, Ed. New York: Academic Press, 1978.
- CORTÉS, O.E.J. Avaliação técnica da utilização de H<sub>2</sub>S no tratamento de efluentes líquidos ácidos contendo metais pesados. Dissertação de mestrado. Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, 2005.
- DU PREEZ, L.A., ODENDAAL, J.P., MAREE, J.P., PONSONBY, M. Biological removal of sulfate from industrial effluents using producer gas as energy source. *Environmental Technology*, 13, 875-882, 1992.
- EATON, A.D., CLESCERI, L.S., GREENBERG, A. E. (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19<sup>th</sup> ed. United Book Press, Inc., Baltimore. 4 - 98 p.
- ECCLES, H. Treatment of metal-contaminated waste: why select a biological process?, *Tibtech*, 17, 462-465, 1999.

- EDWARDS, K.J., Gihring, T.M. & Banfield, J.F. Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Applied Environmental Microbiology*, 65(8): 3627-3632, 1999.
- ELLIOT, P.; RAGUSA, S.; CATCHESIDE, D. Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in a upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research*; 32(12):3724-30, 1998.
- FERNANDES, H.M., Veiga, L.H.S., Franklin, M.R., Prado, U.C.S. & Taddei, J.F. Environmental impact assessment of uranium mining and milling facilities: a study case at the Poços de Caldas uranium mining and milling site, Brazil. *Journal Geochemical Exploration*, 52: 161-73, 1995.
- FOUCHER, S., BATTAGLIA-BROUNET, F., IGNATIADIS, I., MORIN, D. Treatment by sulphate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery, *Chemical Engineering Science*, 56, 1639-1645, 2001.
- FRÖMMICHEN, R., WENDT-POTTHOFF, K., FRIESE, K., FISCHER, R. 2004. Microcosm studies for neutralization of hypolimnic acid mine pit lake water (pH 2,6). *Environ. Sci. Technol.*, 38: 1877-1887.
- FUKUMA, H. T., DE NADAI FERNANDES, E. A., NASCIMENTO, M. P., QUINELATO, A. L.: Separation and spectrophotometric determination of thorium contained in uranium concentrates. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 2001.
- GARCIA, C; MORENO, D.A.; BALLESTER, A.; BLÀZQUEZ, M.L.; GONZÁLEZ, F. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, v. 14, no 9, pp. 997-1008, 2001.
- GLOMBITZA, F. Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction, *Waste Management*, 197-203, 2001.
- GOTTSCHALK, G. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag New York Inc. New York, USA, 1979.

- GRIFFITHS, A.J.F. et al. *Introdução à genética*. 6<sup>a</sup> edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro/RJ, 1996.
- HALLBERG, K.B. & JOHNSON, D.B. Novel acidophiles isolated from a constructed wetland receiving acid mine drainage. In *Proceedings of Biohydrometallurgy: Fundamentals, Tecnology and Sustaintable Development, Part A*, Ed. Ciminelli, V.S.T. e Garcia, O. Ouro Preto/MG, 2001.
- HANSEN, T.A. Carbon metabolism in sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom & R. Singleton (Eds), *The sulfate-reducing Bacteria: Conteporary Perspectives* (pp. 20-41). New York: Springer-Verlag, 1993.
- HERRERA, L., HERNÁNDEZ, J., BRAVO, L., ROMO, L., VERA, L. Biological Process for Sulfate and Metals Abatement from Mine Effluents. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 12, 101-107, 1997.
- JOHNSON, D.B & HALLBERG, K.B. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 154: 466-473, 2003.
- JONG, T. & PARRY, D.L. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*;37(14):3379-89, 2003.
- KNAPP, R.A. The biogeochemistry of acid generation in sulphide tailings and waste rock. In: **Acid mine drainage seminar**, Environment Canada Proceedings, p. 47-65, 1987.
- KREKELER, D., CIPIONKA, H. The preferred electron acceptor od *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. *FEMS microbiology ecology*, 17, 271-278, 1995.
- LORENZEN, C.J. *Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations*. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346, 1967.
- MARKER, A.F.H.; NUSCH, E.A.; RAI, H. & RIEMANN, B. *The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations*. *Arch. Hvdrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14: 91-106p, 1980.

- NAGPAL S., CHUICHULCHERM, S., LIVINGSTON, A., PEEVA, L. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.*, 5, 533-543, 2000.
- NASCIMENTO, M.R.L. Remoção e recuperação de urânio de águas ácidas de mina por resina de troca iônica. Dissertação de mestrado. Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 1998.
- NASCIMENTO, M. R. L., FUKUMA, H. T., HORTELLANI, M. A.: Projeto Itataia – Controle de processo na produção de ácidos fosfórico e urânio. in: Manual de Métodos e Análises Químicas, 143p, INB, Poços de Caldas/MG, 1988.
- NEDWELL, D.B. The cycling of sulfur in marine and freshwater sediments. In: Nedwell, D.B. & Brown, C.M. (Eds), *Sediment Microbiology* (pp.73-106). Great Britain: Academic Press, 1982.
- NORDWICK, S. et al. Development of SRB treatment systems for acid mine drainage. In Proceedings of Hydrometallurgy 2003 – Fifth International Conference in Honor of Professor Ian Ritchie – V.2: Electrometallurgy and Environmental Hydrometallurgy, Edited by Young, A.M. et al. Vancouver, Canadá, 2003.
- OKABE, S., NIELSEN, P., CHARACKLIS, W. Factor affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration, *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 725-734, 1992.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H., VISSER, A., HULSHOFF, L.W., STAM, A.J.M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 119-136, 1994.
- PFENNIG, N., BIEBL, H. The dissimilatory sulphur-reducing bacteria. *The prokaryotes Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Eds. Shapton, D.A. & Gould, G.W., Belows, A. & Achelegel, H.G., Vol 1, pp. 941-947, Berlin: Springer-Verlag, 1981.
- POSTGATE, J.R. *The sulphate-reducing bacteria*. 2<sup>a</sup> edição Cambridge University Press, New York, 1979.

- QUINELATO, A.L. et al. Removal of radionuclides and heavy metals from acid mine waters by retention on adsorbing materials. **Progress Report**. IAEA Research Contract N°: 11569/Regular Budget Fund, Poços de Caldas/MG, 2002.
- Resolução CONAMA, n° 357, de 17 de março de 2005.
- SAND, W., Rohde, K., Sobotke, B. & Zenneck, C. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Applied Environmental Microbiology*, 58(1): 85-92, 1992.
- SCHIPPERS, A., Hallmann, R., Wentzien, S. & Sand, W. Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Applied Environmental Microbiology*, 61(8): 2930-35, 1995.
- SCHIPPERS, A., Hallmann, R., Wentzien, S. & Sand, W. Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Applied Environmental Microbiology*, 61(8): 2930-35, 1995.
- SCHIPPERS, A., Von-Rège, H. & Sand, W. Impact of microbial and sulfur chemistry on safeguarding sulfidic mine waste. *Minerals Engineering*, 9(10): 1069-1079, 1996.
- SOUZA, P.V. Drenagens ácidas do estéril piritoso da mina de urânio de Poços de Caldas: interpretação e implicações ambientais, USP, São Paulo, 141p. (Dissertação de mestrado). 1995.
- TSUKAMOTO, T. K., KILLION, H.A., MILLER, G.C. Column experiments for microbial treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-ph and matrix investigations. *Water research*, 38: 1405-1418, 2004.
- WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate- and- sulfur-reducing bacteria. In. A.B. Zehnder (Ed.), *Biology of Anaerobic Micro-organisms* (pp. 469-585). New York: John Wiley, 1988.

ANEXO A – RELATÓRIO DO ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA  
AMBIENTAL DA USP.

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA  
AMBIENTAL DA USP

**SHEILA KENIA DE ALMEIDA**  
**ORIENTAÇÃO: Dra. ROSANA VAZOLLER**  
JUL/AGO 2004

## 1) INTRODUÇÃO

**O PRESENTE RELATÓRIO APRESENTA AS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL DO ICB/USP, NO PERÍODO DE 22/07/2004 ATÉ 20/08/2004, SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA DRA ROSANA FILOMENA VAZOLLER.**

Este estágio visava o aprendizado e treinamento de técnicas específicas para o desenvolvimento do trabalho na área de microbiologia e biologia molecular.

## 2) MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1) Reuniões técnicas

No período de realização do estágio foram realizadas algumas reuniões técnicas, onde era discutido os resultados obtidos e, a partir deles direcionar os próximos passos a serem realizados.

#### Reunião do dia 22/07/2004

**DISCUSSÃO COM ROSANA, ANA, SANDRA E SHEILA SOBRE AS CONDIÇÕES IDEAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TRABALHOS COM ORGANISMOS ANAERÓBIOS.**

- \* Baixo potencial de oxi-redução;
  - Maior disponibilidade de elétrons;
  - -100 mV
  - resazurina – Indicador (pH e potencial de oxi-redução)
    - azul – oxidada
    - incolor – reduzida
    - rosa – ponto de viragem
    - melhor indicador – NÃO É TÓXICO
  - Gases melhores
    - White Martins
    - Agar
    - Oxigênio do Brasil (não recomendado)
  - Eliminar O<sub>2</sub> (Método químico)
    - Sulfeto de sódio
    - L – cisteína
    - Tiosulfato (aumenta potencial oxi-redução)
    - Ditionito de sódio

Na reunião com a Rosana ficou decidido que enquanto as amostras de Poços não chegassem, realizaríamos os testes e o processo de treinamento com uma amostra coletada no Rio Madeira em Rondônia.

Após a discussão iniciou-se a elaboração dos protocolos que deveriam ser utilizados no procedimento experimental.

#### Reunião do dia 03/08/2004

Reunião de resultados onde estavam presentes: Rosana, Sandra, Michelle, Cristina e Sheila.

Nessa reunião ficou decidido que eu iria acompanhar a Cristina na realização do FISH. As amostras seriam as da Cristina, as do Amazonas e Poços de Caldas.

#### Reunião do dia 06/08/2004

Reunião com Rosana, Ana e Sheila.

Nessa reunião foi discutido a possibilidade de troca de meio para realização dos testes de potencial de redutoras de sulfato. Ao final da reunião prosseguimos com o protocolo de FISH.

### 2.2) Instalações

Antes de iniciar o trabalho experimental, todo o laboratório foi mostrado, onde puderam ser identificadas as bancadas, o armário de reagentes, o armário de vidraria, geladeiras, freezers, alguns



equipamentos, estufas e principalmente todo o sistema de distribuição simultânea de gases, utilizado para o trabalho com microorganismos anaeróbios.

O sistema de distribuição simultânea de gases consiste numa série de cilindros com gases específicos ( $N_2$ ,  $N_2/CO_2$  e  $H_2/CO_2$ ), uma coluna redutora (que tem função de retirar algum  $O_2$  que ainda esteja presente nos gases), tubulações para 4 saídas desses gases e uma bomba de vácuo, utilizada para troca de atmosferas nos frascos com soluções anaeróbias.

A coluna redutora apresenta um cilindro preenchido com limalha de níquel. Este quando aquecido captura os traços de oxigênio presentes nos gases utilizados. Esta coluna fica saturada com o constante uso e deve ser recondicionada, processo realizado pela passagem de  $H_2$  pela coluna por cerca de oito horas.



Figura 1 – Bancada para trabalho com organismos anaeróbios



Figura 2 – Detalhe da saída de gases



Figura 3 – Detalhe da válvula de gases



Figuras 4 e 5 – Detalhe da ligação dos cilindros

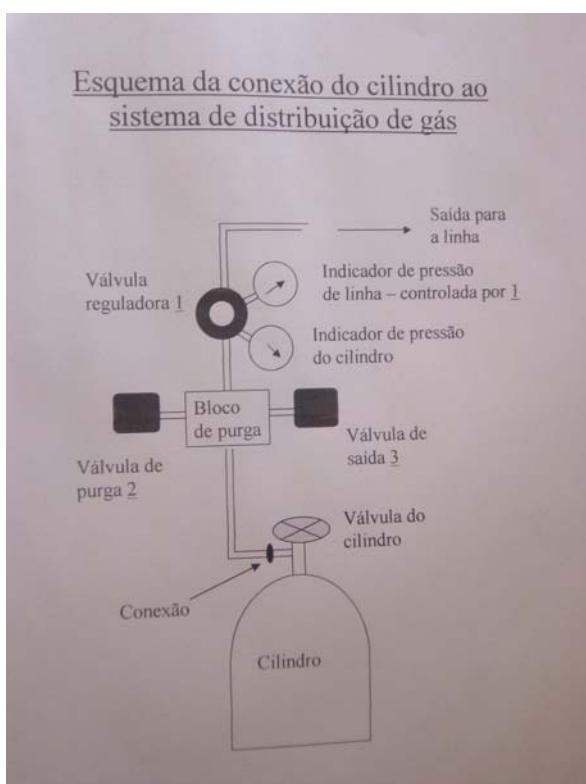


Figura 6 – Esquema da conexão do cilindro ao sistema de distribuição de gás.

### 2.3) MÉTODOS ANALÍTICOS

#### PROCOLOS

##### 1. Preparo de Meio e Soluções Estoque

<b>Tabela 1: Solução Anaeróbia de Diluição (Giaj-Levra, 1991)</b>	
<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
Solução de resazurina 0,1% m/v	2,0 mL
KHCO <sub>3</sub>	3,98 g
Tris hidroximetilaminometano	6,6 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL
<b>Modo de Preparo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- ferver, por 5 minutos, 1200 mL de água Milli-Q em um erlenmeyer de 2000 mL;</li> <li>- transferir 500 mL da água para uma proveta e fluxionar a água dos dois recipientes com N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70:30) por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</li> <li>- Dissolver os reagentes no volume de água da proveta, segundo a ordem descrita acima.</li> <li>- Ajustar o pH para 7 com KOH 3N ou HCl.</li> <li>- Completar o volume até 1000 ml com a água que estava sob fluxo no erlenmeyer.</li> <li>- Fluxionar a solução pronta com N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70:30) por 30 minutos.</li> <li>- Distribuir a solução em alíquotas de 8,9 mL em frascos de antibiótico, sob fluxo de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.</li> <li>- <b>FECHAR OS FRASCOS COM TAMPAS DE BORRACHA SOB FLUXO DO GÁS, IMPEDINDO A ENTRADA DE OXIGÊNIO; LACRAR.</b></li> <li>- Autoclavar por 20 minutos a 121°C e 15 psi.</li> <li>- Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Pode ser estocado por cerca de 6 meses.</li> </ul> <p>OBS: Antes de utilizar a solução anaeróbia de diluição, para que o volume atinja 9 mL, adicionar 0,1 mL de cisteína-HCl</p>	

<b>Tabela 2: Composição do Meio Basal (Zinder et al.)</b>	
<u>Reagente</u>	<u>Quantidade</u>
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Solução de resazurina 0,1% m/v	1,0 mL
Solução traço de metais Zinder	10,0 mL
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL
<b>Modo de Preparo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- ferver, por 5 minutos, 1200 mL de água Milli-Q em um erlenmeyer de 2000 mL;</li> <li>- transferir 500 mL da água para uma proveta e fluxionar a água dos dois recipientes com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</li> <li>- Dissolver os reagentes no volume de água da proveta, segundo a ordem descrita acima, inclusive para as soluções de resazurina e traço de metais;</li> <li>- completar o volume até 1000 ml com a água que estava sob fluxo no erlenmeyer.</li> <li>- Fluxionar o meio pronto com N<sub>2</sub> puro por mais 15 minutos.</li> <li>- Distribuir o meio para os frascos de cultivo no volume desejado, sempre sob fluxo de N<sub>2</sub>.</li> <li>- <b>FECHAR OS FRASCOS COM TAMPAS DE BORRACHA SOB FLUXO DO GÁS, IMPEDINDO A ENTRADA DE OXIGÊNIO; LACRAR.</b></li> <li>- Autoclavar por 20 minutos a 121°C e 15 psi.</li> <li>- Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Pode ser estocado por cerca de 6 meses.</li> <li>- Antes de adicionar as soluções desejadas e inocular os meio de cultivo, deve-se proceder a troca da atmosfera do frasco para a mistura gasosa N<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 70:30% (v/v).</li> </ul>	

<b>Tabela 3: Solução indicadora de resazurina 0,1% (m/v)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Resazurina	0,1 g
Água Milli-Q	100 mL
<b>Modo de preparo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dissolver o reagente no volume de água indicado;</li> <li>- transferir para um frasco âmbar;</li> <li>- armazenar em geladeira.</li> </ul>	

<b>Tabela 4: Solução traço de metais</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
Ácido nitrilotriacético (NTA)	4,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,556 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,086 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O*	0,17 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,21 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,19 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O*	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL
<p><b>- Modo de preparo</b></p> <p><b>- Ferver 1200 ml de água por 5 minutos.</b></p> <p><b>- Pesar os reagentes. Aqueles marcados com “*” não podem ser pesados em papel alumínio. O NTA deve ser pesado em recipiente de vidro.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transferir 200 mL da água para uma proveta e fluxionar a água dos dois recipientes com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</li> <li>- Dissolver o NTA nos 200 mL de água da proveta.</li> <li>- Para a solução elaborada por Vazoller, dissolver os demais sais na ordem apresentada na tabela. Na solução elaborada por Zinder, seguir a ordem numérica que aparece entre parênteses, ao lado das quantidades.</li> <li>- Acertar para pH 7.</li> <li>- Completar o volume para 1000 mL com a água mantida sob fluxo.</li> <li>- Esterilizar a solução por filtração em membrana.</li> <li>- Fluxionar a solução estéril com N<sub>2</sub> puro por 20 minutos.</li> <li>- Distribuir a solução sob fluxo de N<sub>2</sub> puro para frascos estéreis.</li> <li>- Fechar o frasco com batoques estéreis e lacra-los, impedindo a entrada de oxigênio.</li> <li>- Envolver o frasco em papel alumínio e armazenar em geladeira por até um ano.</li> </ul> <p>OBS: Alguns dos sais utilizados nessas soluções podem demorar a se dissolver, mesmo com o uso de NTA, que é um agente quelante. Para facilitar a dissolução, é recomendado adicionar um sal apenas depois que o reagente anterior estiver totalmente dissolvido.</p>	

<b>Tabela 5: Solução de Vitaminas</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Biotina (vitamina H)*	0,002 g
Ácido fólico (B9)	0,002 g
Tiamina.HCl (B1)*	0,005 g
Riboflavina (B2)*	0,005 g
Ácido Nicotínico (Niacina)	0,005 g
Pantetonato de Cálcio (B5)	0,005 g
Piridoxina.HCl (B6)	0,01 g
Cianocobalamina (B12)*	0,0001 g
Ácido Lipóico	0,005 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL
<b>Ácido 4-aminobenzóico</b>	
<u>Modo de preparo</u>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Ferver 1200 ml de água por 5 minutos.</b></li> <li>- <b>Pesar os reagentes. Aqueles marcados com “*” são armazenados em geladeira.</b></li> <li>- Transferir 200 mL da água para uma proveta e fluxionar a água dos dois recipientes com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</li> <li>- Dissolver os reagentes na ordem descrita acima.</li> <li>- Completar o volume para 1000 mL com a água mantida sob fluxo de N<sub>2</sub>.</li> <li>- Esterilizar a solução por filtração em membrana.</li> <li>- Fluxionar a solução estéril com N<sub>2</sub> puro por 20 minutos.</li> <li>- Distribuir a solução sob fluxo de N<sub>2</sub> puro em frascos estéreis.</li> <li>- Fechar o frasco com batoques estéreis e lacra-los, impedindo a entrada de oxigênio.</li> <li>- Envolver o frasco em papel alumínio e armazenar em geladeira por até um ano.</li> </ul>	

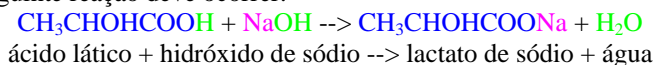
<b>Tabela 6: Solução de bicarbonato de sódio 10% m/v</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
NaHCO <sub>3</sub>	10 g
Água Milli-Q	q.s.p. 100 mL
<u>Modo de preparo</u>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Ferver 200 ml de água por 5 minutos.</b></li> <li>- <b>Pesar o reagente em um béquer.</b></li> <li>- <b>Fluxionar a água com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</b></li> <li>- Transferir 40 mL da água para o béquer a fim de dissolver o sal. Inserir fluxo de N<sub>2</sub> puro na solução.</li> <li>- Caso a dissolução esteja difícil, pode-se aquecer um pouco a mistura, mas sem deixar ferver, pois o bicarbonato de sódio precipitaria.</li> <li>- Transferir a solução para uma proveta mantida sob fluxo de N<sub>2</sub> e acertar o volume para 100 mL com o restante da água mantida sob fluxo.</li> <li>- Esterilizar a solução por filtração em membrana, pois o bicarbonato precipita caso a solução seja fervida.</li> <li>- Fluxionar a solução estéril com N<sub>2</sub> puro por 20 minutos.</li> <li>- Mantendo a solução filtrada sob fluxo, distribuí-la em frascos estéreis.</li> <li>- Envolver o frasco em papel alumínio e armazenar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por até 6 meses.</li> </ul>	

<b>Tabela 7: Solução redutora de cisteína 0,2 M</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Cisteína.HCl (PM = 175,63)	3,51 g
Água Milli-Q	q.s.p. 100 mL
<u>Modo de preparo</u>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ferver 200 ml de água por 5 minutos.</li> <li>- Pesar o reagente em um copinho plástico.</li> <li>- Transferir 40 mL da água para uma proveta.</li> <li>- Fluxionar a água da proveta e o restante com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</li> <li>- Dissolver o reagente no volume de água da proveta.</li> <li>- Completar o volume para 100 mL com a água mantida sob fluxo.</li> <li>- Fluxionar a solução com N<sub>2</sub> puro por 20 minutos.</li> <li>- Distribuir a solução.</li> <li>- Autoclavar os frascos a 121°C por 20 minutos.</li> <li>- Envolver os frascos em papel alumínio e armazenar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por até 6 meses.</li> </ul>	
<p>OBS: Essa solução é fraca como agente redutor, e pode levar até cerca de 20 minutos para que o meio se torne incolor. Esse processo é acelerado quando essa solução é adicionada a meios mantidos em banho-maria com temperatura entre 40 e 50°C. A vantagem de seu uso é que, por ser composta por um aminoácido, não há níveis tóxicos dessa solução.</p> <p>Caso depois de 20 minutos o meio não se torne incolor, pode ser adicionada uma nova alíquota da solução, e então observar-se o mesmo intervalo de tempo.</p>	

<b>Tabela 8: Preparo de soluções por neutralização de ácidos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparar uma solução do ácido desejado em uma concentração duas vezes maior que aquela da solução final: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ferver o volume de água Milli-Q desejado por pelo menos 5 minutos depois de iniciada a fervura.</li> <li>- Fluxionar a água fervida com N<sub>2</sub> puro por pelo menos 15 minutos ou até a água esfriar a 40°C.</li> <li>- Diluir um volume de ácido nessa água a fim de obter uma solução com concentração dobrada em relação àquela da solução de sal.</li> </ul> </li> <li>- Preparar uma solução de uma base cuja concentração seja a mesma daquela solução de ácido: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ferver o volume de água Milli-Q desejado por pelo menos 5 minutos depois de iniciada a fervura.</li> <li>- Fluxionar a água fervida com N<sub>2</sub> puro por pelo menos 15 minutos ou até a água esfriar a 40°C.</li> <li>- Pesar e diluir a base na água fervida a fim de se obter a concentração desejada.</li> </ul> </li> <li>- As duas soluções devem ser mantidas sob fluxo de N<sub>2</sub> durante todo processo.</li> <li>- Misturar, sob fluxo de N<sub>2</sub>, volumes idênticos das duas soluções.</li> <li>- Ajustar o pH dessa mistura para 7 utilizando uma solução da base 1M.</li> <li>- Fluxionar a solução resultante com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos.</li> <li>- Distribuir a solução e fechar os frascos.</li> <li>- Esterilizar em autoclave por 20 minutos a 121°C.</li> </ul>

#### Exemplo: Solução de lactato de sódio 2M

Uma solução de lactato de sódio deve ser preparada empregando a neutralização do ácido láctico por hidróxido de sódio. A seguinte reação deve ocorrer:



Como exemplo, vamos preparar 500 mL de uma solução 2 M de lactato de sódio. Como mencionado na tabela acima, precisaremos preparar uma solução de cada reagente para depois misturá-las.

É importante lembrar que será necessário preparar as soluções do ácido e da base numa concentração duas vezes maior do que a concentração desejada para o sal. Isso ocorre porque iremos juntar as duas soluções, e portanto o volume final será o dobro do volume em que as soluções foram preparadas. Em nosso exemplo queremos uma solução de sal cuja concentração final é 2M e para tanto precisaremos que as soluções do ácido e da base estejam a uma concentração de 4 M.

Inicialmente precisaremos saber as características físico-químicas dos reagentes para calcular corretamente as concentrações:

Ácido láctico empregado:

pureza: 88%  
 peso molecular : 90,05 g/L  
 densidade: 1,21 kg/L = g/mL

Hidróxido de sódio empregado:

pureza: 100%  
 peso molecular: 40 g/L

Com os dados referentes ao ácido láctico é possível calcular a massa necessária do ácido para produzir uma solução com a molaridade desejada. Considere que iremos preparar 200 mL de uma solução 4 M.

1M ----> 90,05 g ----> 1000 mL

4M ----> x ----> 1000 mL

4M ----> 360,2 g ----> 1000 mL

4M ----> y ----> 200 mL

4M ----> 72,04 g ----> 200 mL

∴ Precisarei de 72,04 g de ácido láctico para ter 200 mL de uma solução 4M de ácido láctico. No entanto, o ácido utilizado tem uma pureza de 88%, o que significa que se pegarmos 72,04 g desse reagente, apenas 88% dessa massa será o ácido, o restante sendo impurezas. Portanto é preciso calcular, através de uma regra de três inversa, a massa que preciso desse reagente para ter um equivalente e 72,04 g de ácido 100% puro:

72,04 g ----> 100%

x ----> 88%

x ----> 81,86 g

∴ Em 81,86 g do reagente utilizado, terei 72,04 g de ácido láctico puro. Mas ainda é preciso um terceiro cálculo, já que o ácido é um reagente líquido e sua densidade é diferente de 1. É necessário saber qual o volume líquido que corresponde a esses 81,86 g.

1 mL ----> 1,21 g

x ----> 81,86 g

x ----> 67,65 mL

Finalmente sabemos que para o preparo de 200 mL de uma solução 4M de ácido láctico devemos diluir 67,65 mL do ácido em um volume de água Milli-Q suficiente para completar 200 mL.

Para o preparo dessa solução deve-se transferir 67,65 mL do ácido para uma proveta e completar o volume até 200 mL com água Milli-Q fervida e fluxionada como indicado na tabela. A solução deve ser mantida sob fluxo de N<sub>2</sub> até que possa ser neutralizada.

Para essa neutralização precisaremos de 200 mL de uma solução também 4 M de NaOH. Sabendo os dados referentes a esse reagente utilizado, podemos calcular o peso necessário para se chegar a essa molaridade:

1M ----> 40 g ----> 1000 mL

4M ----> x ----> 1000 mL

4M ----> 160 g ----> 1000 mL

4M ----> y ----> 200 mL

4M ----> 32 g ----> 200 mL

∴ Diluindo 32 g desse reagente em quantidade de água suficiente para completar 200 mL, obtém-se uma solução 4M.

Para o preparo deve-se pesar a quantidade de NaOH desejada em um béquer e transferir para um erlenmeyer em que o volume final de 200 mL esteja marcado. Deve-se então completar o volume até 200 mL utilizando a água Milli-Q fervida e fluxionada.

A solução pode ser agitada para dissolução mais rápida do NaOH, mas deve-se manter o fluxo de nitrogênio no erlenmeyer.

Finalmente, para o preparo da solução de lactato de sódio, deve-se verter a solução de ácido sobre a solução de base, mantendo-as sob fluxo de N<sub>2</sub>.

Para garantir que todo o ácido esteja neutralizado, deve-se acertar o pH da solução para 7 empregando uma solução de NaOH 1M., previamente preparada.

A solução deve então ser fluxionada com N<sub>2</sub> por 10 minutos e então distribuída em frascos de antibiótico. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Armazenar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

<b>Tabela 9: Solução de sulfato de sódio 2,96M</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	42,01 g
Água Milli-Q	q.s.p. 100 mL
<i>Modo de preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ferver 200 ml de água por 5 minutos.</li> <li>- Pesar o reagente em um béquer.</li> <li>- Transferir 40 mL da água para uma proveta e fluxionar a água dos dois recipientes com N<sub>2</sub> puro por 15 minutos ou até esfriar a 40°C.</li> <li>- Dissolver o reagente pesado na água contida na proveta.</li> <li>- Completar o volume da solução até 100 mL, utilizando a água restante.</li> <li>- Mantendo a solução sob fluxo, distribuí-la em frascos de antibiótico.</li> <li>- Esterilizar os frascos por autoclavagem por 20 minutos a 120°C.</li> <li>- Armazenar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.</li> </ul>	

<b>Tabela 10: Soluções Acrescidas ao Meio</b>	
<b>Soluções</b>	<b>Volumes</b>
Bicarbonato de sódio 10%	0,1 mL
Solução de Vitaminas	0,1 mL
Lactato de sódio 2M	0,1 mL
Sulfato de sódio	0,1 mL
Cisteína	0,1 mL
Inóculo	1,0 mL
Volume de meio	8,5 mL
Volume final	10 mL

### **2. Homogeneização da amostra**

- Pesar 6 g de pérolas de vidro médias e reservar.
- Abrir o frasco contendo a amostra e inserir fluxo de N<sub>2</sub>.
- Com uma pipeta invertida, transferir 1 g da amostra para um tubo de ensaio com tampa.
- Transferir as pérolas para o frasco com a amostra.
- Fechar e lacrar o frasco sob fluxo de N<sub>2</sub>.
- Agitar o frasco manualmente por 30 minutos.

### **3. Diluição da amostra**

- Separar 5 frascos contendo solução anaeróbia de diluição.
- Adicionar 0,1 mL da solução estoque de cisteína.HCl cada um. Deixar em banho-maria (40°C) até se tornarem incolor.
- Etiquetar cada frasco com a solução acima, representando as diluições que serão feitas (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> etc).
- Transferir 1 mL da amostra homogeneizada para o frasco de diluição 10<sup>-1</sup>.
- Homogeneizar o frasco manualmente e transferir 1 mL desse para o frasco de diluição 10<sup>-2</sup>. Proceder dessa forma até a última diluição desejada (nesse caso, 10<sup>-6</sup>).

### **4. Inoculação**

- Separar 25 frascos contendo o meio de cultivo basal.
- Trocar a atmosfera desses frascos para a mistura gasosa N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70:30); submetendo os frascos a 30s de vácuo e 30s de fluxo do gás, por 3 vezes, alternadamente.
- Despressurizar os frascos.



- Manter os frascos em banho-maria (40°C) durante as adições.
- Adicionar os volumes de solução estoque indicados, na ordem apresentada na tabela 10.
- Após adição da cisteína.HCl aguardar até os frascos se tornarem incolor.
- Inocular 5 réplicas de cada diluição.
- Incubar a 30°C, sem agitação.

#### 5. Avaliação do crescimento

- Após 15 e 30 dias, avaliar o crescimento de células empregando a solução de subacetato de chumbo preparada conforme descrito na tabela 11.

<b>Tabela 11: Solução de subacetato de chumbo (Morita, 1972 modificado)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Subacetato de chumbo	2,0 g
Ácido acético	
Água Milli-Q	q.s.p. 18 mL
<i>Modo de preparo</i>	
- Dissolver o subacetato ou acetato de chumbo na água. - Caso haja turvação branca, adicionar ácido acético até atingir transparência completa. OBS: Foi recomendada a utilização de acetato de chumbo; no entanto, Sakamoto (1996) empregou subacetato de chumbo.	

#### *Aplicação do teste com acetato de chumbo*

- Embeber fita de papel filtro na solução de acetato de chumbo.
- Dispô-las em uma placa de Petri e secar em estufa.
- Pingar uma gota do meio de cultivo sobre o papel filtro seco, considerando como positivos aquelas que apresentarem coloração marrom.
- Aplicar o teste estatístico do NMP.

26/07/2004

### PREPARO DE SOLUÇÕES

- ★ Lactato de sódio 2,0 M;
- ★ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,48 M \*
- ★ Cisteína – HCl 0,2 M

\* O protocolo recomenda a solução 2,96 M, mas não conseguiu a diluição. Por isso o volume do solvente foi duplicado.

- ★ Meio Zinder (distribuído em frascos de antibiótico, 8,4ml em cada);
- ★ Solução anaeróbia de diluição (distribuída em frascos de antibiótico, 8,9ml em cada);

As soluções foram preparadas conforme descrito no protocolo montado. Os frascos de antibiótico citados possuem capacidade máxima para 30,0ml. O volume de meio Zinder adicionado é acrescido de outras soluções que compõem o meio e do inóculo, totalizando 10,0ml.

O meio Zinder e a solução aneróbia de diluição foram autoclavada por 20 min a uma pressão se 120 psi.

28/07/2004

Os frascos com o meio Zinder e a solução anaeróbia de diluição, preparados anteriormente, foram armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Antes de adicionarmos as soluções ao meio Zinder (segundo a ordem da tabela 10 do protocolo), fizemos uma troca de atmosfera para N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, alternando vácuo e gás, por 3 minutos, a intervalos de 30

segundos para cada. Após a troca de atmosfera, os frascos contendo meio de cultura foram mantidos em banho-maria a 45°C, e voltaram a esse banho logo após a adição de cisteína.

Nos frascos da solução de diluição foi adicionado 0,1ml de cisteína e os mesmos foram mantidos em banho-maria.

Após um certo tempo alguns frascos contendo meio Zinder que estavam no banho-maria ficaram reduzidos, no entanto, os frascos contendo solução anaeróbia de diluição e os outros de meio Zinder não se reduziram. (Primeiro problema de redução. Não sabemos se foi devido a pré redução da solução que não foi boa ou se o problema se deu com a cisteína que aparentemente demora mais tempo a reduzir).

Para promover a redução do meio Zinder, naqueles frascos que ainda estavam rosa retiramos uma alíquota de 0,1ml dos frascos contendo esse meio e adicionamos mais 0,1ml de cisteína. Após essa adição os frascos voltaram ao banho-maria. (Esses frascos foram marcados).

Na solução anaeróbia de diluição retiramos uma alíquota de 0,2ml dos frascos e adicionamos 0,2ml de cisteína, e retornamos ao banho-maria. Não houve quase nenhuma alteração na cor da solução.

À parte testamos reduzir um frasco da solução anaeróbia de diluição com cis-Na<sub>2</sub>S (fizemos para testar se a solução ficava incolor mesmo). Sua cor passou de azul para rosa.

Como a redução não foi obtida em todos os frascos de meio Zinder e nos frascos de diluição, todos, inclusive os de Zinder já reduzidos, foram armazenados em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

29/07/2004

Os frascos com solução de diluição ainda não tinham sofrido alteração na cor. Além disso, alguns frascos com meio Zinder sofreram oxidação, fato que pode ter ocorrido devido à qualidade dos batoques.

Não havia sido realizada a troca de atmosfera nesses frascos, pois os mesmos já foram preparados com gás N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, no entanto, como a redução não foi totalmente alcançada, foi realizada a troca de atmosfera para N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, durante 5 minutos, alternando vácuo e fluxo de gás por 30 segundos cada, nos frascos com solução anaeróbia de diluição. Os frascos foram então mantidos em banho-maria a 50°C, e a solução passou de azul escuro para azul claro e então ficaram incolores, não passando pela tonalidade rosa.

Antes de iniciarmos a inoculação, preparamos um vidro de antibiótico, onde pesamos 6,0 gramas de pérolas de vidro, fechamos, lacramos e autoclavamos por 20 minutos a 120 psi. Para preparar o inóculo, adicionou-se 15 gramas de sedimento para 6 gramas de pérolas, pois a adição recomendada de sedimento (1 grama) não seria suficiente para retirar 1 ml do mesmo após a agitação.

O inóculo havia sido agitado no dia anterior por 30 minutos com pérolas de vidro, mas como a inoculação não foi realizada, este ficou armazenado em geladeira. Antes de inocular, a amostra foi novamente agitada por 30 minutos.

A primeira e segunda diluição, bem como os frascos de cultivo 10<sup>-2</sup> 1 a 4 foram inoculados utilizando agulha rosa (mais espessa). As demais diluições e inoculações foram feitas com agulha preta para minimizar os danos ao batoque e porque não se observou a presença de grandes grumos de células. Os frascos de cultivo da diluição 10<sup>-2</sup> ficaram oxidados após a inoculação. Para tentar reverter isso, os frascos foram colocados em banho-maria a 40°C. Os frascos 10<sup>-2</sup> 2, 4 e 5 apresentaram menor oxidação após o banho-maria sendo que o frasco 4 reduziu.

Após a inoculação os frascos foram incubados em estufa escura a 37°C. Decorridos os primeiros 15 dias será feito uma contagem NMP por turbidez e após 21 dias por acetato de chumbo.

## FISH

Mesmo eu não tendo realizado todo esse procedimento, pois o laboratório de microbiologia ambiental já conta com uma infraestrutura preparada para realização do FISH, estou anexando os protocolos para quem vai montar um experimento pela primeira vez no laboratório

Tratamento das lâminas novas

1. Mergulhar as lâminas em álcool etílico e enxaguar com água destilada. (A Cris falou que não adianta muito apenas mergulhar, mas que devo esfregar de leve com papel toalha ou papel higiênico);
2. Preparar em um tubo Falcon 50 mL de solução 0,1% de gelatina – MARCA: DIFCO - em água destilada (aquecer a água a aproximadamente 60°C, para dissolver a gelatina) e acrescentar alguns cristais de sulfato de cromo e potássio (concentração recomendada: 0,01%). A adição do sulfato de cromo e potássio deve ser feita na hora do uso.
3. Mergulhar as lâminas lavadas e secas na solução de gelatina e colocar para secar em pé.

## SOLUÇÕES ESTOQUE

1. Tris.HCl 1M pH 7,2 (PM 157,64)  
2 – amino – 2 – (hidroximetil) – 1, 3 – propanodiol – hidrocloreto  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$  PM 156,57 MARCA: BOEHRINGER
  - Dissolver 15,76g de Tris HCl em 80,0 mL de água;
  - Ajustar o pH para 7,2 com NaOH (4M) e completar o volume com água destilada;
  - Dividir o volume e autoclavar;
  - OPÇÃO: 12,1g Tris base, 80,0mL de água, 7,0mL HCl conc., checar pH e completar para 100,0mL.
  
2. EDTA 0,5M (PM 372,24) MARCA: FISCHER (adicionar direto)
  - Colocar 18,61g de EDTA em 80,0mL de água destilada e agitar vigorosamente em agitador magnético;
  - Ajustar o pH para 8,0 com pastilhas de NaOH (Maniatis – 2,0g; lab – cerca de 2,6g)
  - Dividir em alíquotas e autoclavar
  - OBS.: O EDTA só solubiliza quando o pH é ajustado para 8;
  
3. SDS 20% (Dodecil sulfato de sódio –  $CH_3(CH_2)_{11}SO_4Na$  – PM: 288,38 MARCA: USB
  - Dissolver 10,0g em 40,0mL de água destilada;
  - Aquecer a 68°C para dissolver;
  - Ajustar o pH para 7,2 adicionando algumas gotas de HCl concentrado;
  - Completar o volume para 50,0mL;
  - OBS.: Usar máscara ao pesar o SDS e limpar bem a área de trabalho após a pesagem. Não é necessário autoclavar o SDS nessa concentração;
  
4. NaCl 5M (PM 58,44)
  - Dissolver 116,88g de NaCl em 400,0mL de água destilada
  - Colocar em frasco Duran de 500,0mL e autoclavar

## TAMPÕES PARA HIBRIDIZAÇÃO E LAVAGEM

Para a preparação dos tampões de lavagem e hibridização, seguir as fórmulas abaixo:

Reagentes	Tampão de Hibridização			Tampão de lavagem	
NaCl	47,34g	52,60g	26,30g	--	--
Tris.HCl 1M	18,0mL	20,0mL	10,0mL	18,0mL	20,0mL
SDS 20%	0,45mL	0,5mL	5,0 mL (1%)	0,45mL	0,5mL
EDTA 0,25M	36,0mL	40,0mL	20,0mL	36,0mL	40,0mL
NaCl 2,5M	--	--	--	Variável <sup>(2)</sup>	Variável <sup>(2)</sup>
Formamida	Variável <sup>(1)</sup>	Variável <sup>(1)</sup>	Variável <sup>(1)</sup>	--	--
Água destilada	q. s. p. 900mL	q. s. p. 1000mL	q. s. p. 500mL	q. s. p. 900mL	q. s. p. 1000mL

(1)– A quantidade varia para cada sonda – consultar a tabela do protocolo do Eawag (Juliana);

(2)- Proporcional à quantidade de formamida - MARCA: PLUS ONE ( $HCONH_2$ ) adicionada ao tampão de hibridização – consultar tabela do protocolo Eawag;

OBS.: tanto a formamida quanto o NaCl aumentam a especificidade da sonda. Assim, as quantidades adicionadas de cada um são inversamente proporcionais

## Tampão fosfato salino PBS

⇒ Dissolver – na ordem em que são citados – os seguintes reagentes a fim de se obter a concentração final indicada.

Reagentes	Concentração Final
NaCl	130 mM
$Na_2HPO_4$	7 mM
$NaH_2PO_4$	3 mM

⇒ Acertar o pH para 7,2

**SOLUÇÃO DE DAPI (100,0 NG/ML)**

- Dissolver 1,0mg de DAPI em 10,0mL de água destilada;
- Colocar alíquotas de aproximadamente 1,0mL em eppendorfs cobertos com papel alumínio;
- Guardar em geladeira até o momento do uso.
- OBS.: o DAPI é um composto mutagênico e deve ser manuseado com cuidado.

**PORCENTAGEM DE FORMAMIDA UTILIZADA PARA HIBRIDIZAÇÃO**

% formamida no tampão de hibridização <sup>(*)</sup>	Lavando a 35°C (HRP – labeled probes)		Lavando a 48°C (DIG, fluorescent probes)	
	[NaCl] in mM	μL of 5M NaCl	[NaCl] in mM	μL of 5M NaCl <sup>(**)</sup>
0	-	-	900	8900
5	-	-	636	6260
10	-	-	450	4400
15	-	-	318	3080
20	145	1350	225	2150
25	105	950	159	1490
30	74	640	112	1020
35	52	420	80	700
40	37	270	56	460
45	26	160	40	300
50	19	90	28	180
55	13	30	20	100
60	9	0	14	40
65	7	0	-	0
70	5	0	-	0

(\*tampão de hibridização: 20mM Tris/HCl, pH 8,0; 5,0 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 0,01% SDS.

(\*\*)em 50,0mL de TL

**PREPARO DE MATERIAL PARA FIXAR AMOSTRAS PARA FISH****TAMPÃO DE FIXAÇÃO**

- ★ Tubo falcon
- ★ Micropipeta
- ★ Banho-maria
- ★ Pipeta estéril
- ★ Pipeta Pasteur
- ★ Fita pH (pH 7,0)
- ★ Conjunto de filtração estéril



Figuras 7,8 e 9 – Conjunto de filtração

- ★ Água destilada estéril (60°C/50ml)
- ★ 2,0 g de paraformaldeído
- ★ 150 μL NaOH 1 N

- \* 5 ml PBS 10x
- \* HCl

#### Preparo

- \* Aquecer a 60°C, 40 ml de água destilada estéril em falcon (banho-maria)
- \* Pesar 2,0 gramas de paraformaldeído em falcon.
- \* Verter a água aquecida no falcon com paraformaldeído.
- \* Adicionar 150 µL de NaOH 1N e agitar manualmente.
- \* Após dissolver, adicionar 5 ml de PBS 10x.
- \* Adicionar uma gota de HCl e verificar se o pH é 7.
- \* Acertar o volume para 50ml com água destilada estéril, na marcação do falcon.
- \* Filtrar o tampão e guardar em geladeira.
- \* Válido por 2 dias.

04/08/2004

#### PREPARO DE FRASCOS E INOCULAÇÃO DA AMOSTRA DE CAVA DA MINA (SEDIMENTO)

- Inóculo: Frasco de antibiótico com 6,0g de pérolas, lacrado e autoclavado. Depois o frasco foi aberto sob fluxo de gás, adicionamos cerca de 9,0g de sedimento e lacramos novamente. Agitação manual deste frasco por 30 minutos.
- Meio e solução de diluição: Utilizamos aqueles que foram preparados no dia 26/07/2004 e que estavam armazenados no escuro.  
Trocamos a atmosfera do meio de cultura por 3,0 minutos, alterando vácuo e gás, por 30,0 segundos cada. A solução de diluição teve sua atmosfera trocada por 5,0 minutos, também alterando vácuo e gás, por 30,0 segundos cada.
- Alguns frascos de meio não se reduziram, mesmo em banho-maria 50°C. Procedeu-se então uma nova troca de atmosfera por 5,0 minutos, alterando vácuo e gás por 30,0 segundos cada.
- Nos frascos que mesmo depois de certo tempo permaneceram oxidados, foi retirada uma alíquota de 0,1mL e adicionado mais 0,1mL de cisteína.HCl.
- Obs.: Alguns frascos de meio ficaram rosa após a adição de cisteína, mas ficaram azuis após certo tempo de banho-maria.

05/08/2004

#### FIXAÇÃO

Além das amostras fixadas para a Cristina, foram fixadas as seguintes amostras:

- 1 – Diluição 10<sup>-2</sup> 1 do Rio Madeira
- 2 – Cultivo em Postgate D3
- 3 – Cultivo em Postgate 75
- 4 – Cultivo em Postgate Cava da Mina (CM)
- 5 – Sedimento da cava da mina (CM) homogeneizado com pérolas
- 6 – Sedimento da cava da mina (CM) não homogeneizado.

Para as amostras de sedimento da cava da mina, fez-se diluição 1:2 em PBS 1x. A amostra foi então homogeneizada manualmente e então procedeu a uma centrifugação a 300 rpm por 1 minuto. Esse procedimento foi realizado a fim de separar (peletar) o sedimento e não as células. O sobrenadante dessa centrifugação foi fixado.

- \* Retirar 1,5 ml de amostra de dispensar em eppendorfs (epps);
- \* Centrifugar por 3 minutos a 12500 rpm;
- \* Dispensar sobrenadante e ressuspender com 200 µL PBS 1x (agitador – pouca coisa para não destruir células);
- \* Adicionar 600 µL do tampão de fixação;
- \* Agitar vigorosamente e manter em gelo por duas horas;
- \* Centrifugar, dispensar, adicionar 800 µL PBS 1x, ressuspender e repetir isso mais duas vezes;

- \* Na última vez, após dispensar sobrenadante, adicionar 300  $\mu\text{L}$  PBS 1x, ressuspender e adicionar 300  $\mu\text{L}$  de etanol gelado e ressuspender de novo;
- \* Guardar em freezer ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até o momento do uso.

## DAPI

Observamos a amostra fresca do sedimento da cava da mina (CM), mas não conseguimos diferenciar células. Então decidimos preparar uma coloração DAPI para facilitar a observação. Antes da aplicação do DAPI a amostra foi diluída 1:2 e então uma segunda diluição de 1:10.

**PARA APLICAÇÃO DO DAPI, COLOCAMOS 3,0ML DE CADA AMOSTRA EM POCINHOS E DEIXAMOS SECAR EM ESTUFA. SOBRE A AMOSTRA SECA, APLICAMOS 9,0ML DE ÁGUA E 1,0ML DE DAPI. HOMOGENEIZAMOS UTILIZANDO A PIPETA E ESPALHAMOS COM A PONTEIRA. COLOCAMOS SOBRE OS POÇOS UMA LAMÍNULA E LEVAMOS AO MICROSCÓPIO.**



Figuras 10 e 11 – Lâminas para FISH

## HIBRIDIZAÇÃO

Fiz duas lâminas para análise do FISH.

Lâmina 1 – Bactéria – Sonda EUB 338

Identificação pocinhos/amostra

- 1 – Rio Madeira  $10^{-2}$  1 – Mad  $10^{-2}$  1 (3  $\mu\text{L}$ )
- 2 – Cava da Mina amostra natural – CM A. Nat (5  $\mu\text{L}$ )
- 3 – Cava da mina amostra agitada – CM Agit. (5  $\mu\text{L}$ )
- 4 – *E. coli* - controle positivo para bactéria (2  $\mu\text{L}$ )
- 6 – Cava da mina cultivada no Postgate B – CM (P) (3 $\mu\text{L}$ )
- 7 – D3 cultivada no Postgate B – D3 (P) (3 $\mu\text{L}$ )
- 8 – 75 cultivado no Postgate B – 75 (P) (3  $\mu\text{L}$ )
- 9 – Levedura – controle negativo para bactéria (1  $\mu\text{L}$ )

Lâmina 2 – BRS – Sonda SRB 385

Identificação pocinhos/amostra

- 1 – Rio Madeira  $10^{-2}$  1 – Mad  $10^{-2}$  1 (3  $\mu\text{L}$ )
- 2 – Cava da Mina amostra natural – CM A. Nat (5  $\mu\text{L}$ )
- 3 – Cava da mina amostra agitada – CM Agit. (5  $\mu\text{L}$ )
- 4 – *E. coli* - controle negativo para BRS (2  $\mu\text{L}$ )
- 6 – Cava da mina cultivada no Postgate B – CM (P) (3 $\mu\text{L}$ )
- 7 – D3 cultivada no Postgate B – D3 (P) (3 $\mu\text{L}$ )
- 8 – 75 cultivado no Postgate B – 75 (P) (3  $\mu\text{L}$ )
- 9 – *D. vulgaris* – controle positivo para BRS (2  $\mu\text{L}$ )

Como hibridizar:

- 1 – Colocar alíquotas de 1 ou 2  $\mu\text{L}$  nos pocinhos da lâmina, distribuindo por todo o pocinho com a ponteira. (os volumes adicionados estão descritos acima)
  - 2 – Colocar a lâmina em estufa a  $45^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos, para secar (a temperatura mais alta aumenta a quantidade de células que se aderem à lâmina).
  - 3 - Passar a lâmina por banhos de álcool 50%, 70% e 100%, em tubos de centrifuga de 50 mL (3 minutos por banho). Usar uma pinça para transferir a lâmina de um banho para outro.
  - 4 – Secar a lâmina ao ar livre.
  - 5 – Enquanto a lâmina seca, colocar um pedaço de papel filtro ou toalha em um tubo de centrifuga de 50 mL, revestido por fora com papel alumínio, embeber o filtro com 2 mL de tampão de hibridização (com concentração de formamida de acordo com a sonda a ser utilizada), tampar e deixar em estufa a  $45^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso (é importante deixar pelo menos uns 5 minutos para criar uma atmosfera úmida no interior do tubo).
- OBS.: esse procedimento é feito uma vez. A mesma câmara pode ser usada para várias hibridizações. Deve-se checar somente se o papel está bem embebido no tampão, para garantir que a atmosfera ficará devidamente saturada.
- 6 – Depois de seca a lâmina, colocar em cada pocinho 9  $\mu\text{L}$  de tampão de hibridização e 1  $\mu\text{L}$  de sonda (concentração de 25 a 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Após acrescentar a sonda, misturar os dois delicadamente, utilizando a aspiração da pipeta. Usando a ponteira em posição horizontal, espalhar bem a mistura de tampão e sonda pelo pocinho, sem arranhar a gelatina (lembrar de trocar as ponteiras entre pocinhos para não haver contaminação).
  - 7 – Colocar a lâmina no tubo embebido em tampão e deixar em estufa por 2 horas a  $45^{\circ}\text{C}$  para ocorrer a hibridização. CUIDADO PARA NÃO DEIXAR O TUBO ROLAR! Assim podemos evitar que as amostras escorram para fora dos pocinhos. – IMPORTANTE: as gotas não podem secar, por isso devem ser colocadas no tubo com o papel (“câmara úmida”).
  - 8 – Passado o tempo de hibridização, lavar delicadamente a lâmina com 800 $\mu\text{L}$  de solução de lavagem (usar micropipeta). Em seguida, mergulhar a lâmina em um tubo falcon contendo o mesmo tampão e manter em estufa a  $48^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos (geralmente utiliza-se 15 a 20 minutos para a lavagem. O mínimo que se deve deixar na solução é 10 minutos). (Realizar o procedimento com o mínimo de luz possível!)
  - 9 – Enxaguar a lâmina gentilmente com água destilada para retirar os sais e o SDS (não deixar cair água diretamente sobre os pocinhos e esperar secar à temperatura ambiente e no escuro).

10/08/2004

## TESTE PARA AVALIAR O POTENCIAL DE REDUTORAS DE SULFATO

### PREPARO DO MEIO

Optamos por utilizar o meio descrito por Widdel and Pfennig *in* HURST et al, 1997. No entanto, não adicionamos o sulfato de sódio e trabalhamos melhor a pré-redução mecânica da solução.

Meio (Widdel and Pfennig, 1997)

Meio WP	
Substância	Quantidade
$\text{KH}_2\text{SO}_4$	0,2 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,25 g
$\text{NaCl}$	1,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
$\text{KCl}$	0,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Resazurina (0,1%)	1,0 mL
Água destilada	q. s. p. 1000mL

**Modo de Preparo**

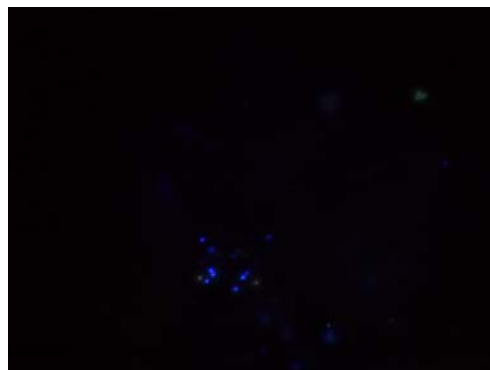
- em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 2000 mL, com volume previamente definido e marcado no frasco de 1000 mL, dispensar 1000 mL de água Mili-Q no frasco e introduzir um fluxo de N<sub>2</sub>.
- Aquecer o volume de água empregando-se uma placa de aquecimento magnética, permitir a fervura por 5 minutos; manter a água fervida sob fluxo de gás;
- Retirar da água fervida e resfriada a  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  cerca de 300 mL em volume; dispensar o volume em um frasco, também sob fluxo de N<sub>2</sub>.
- Dissolver nesse volume cada reagente; acrescentar a mistura no volume final da solução, mantida sob fluxo de gás; (ou então dissolver os reagentes diretamente no frasco com a marcação de 1000 mL);
- Completar o volume q. s. p. 1000 mL com água Mili-Q;
- Manter a solução sob fluxo de N<sub>2</sub> por 30 minutos;
- Distribuir o meio para os frascos de cultivo no volume desejado, sob fluxo de N<sub>2</sub>.
- Fechar os frascos com tampas de borracha de butila e lacre de alumínio;
- Autoclavar por 30 minutos a 121°C e 15 psi;
- Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz; a solução pode ser estocada até 6 meses.
- Antes de adicionar as soluções desejadas e inocular os meios de cultivo, deve-se proceder a troca da atmosfera do frasco para a mistura gasosa N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 70:30% (v/v);

**OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS**

1 – Lâmina só com DAPI

Amostra CM sedimento diluída 1:2

Poucas células: cocos bem pequenos, bacilos com esporo ou diplococos, bacilos curvos pequenos.



Figuras 12 e 13 – Coloração DAPI Amostra CM

Amostra CM sedimento diluída 1:2 e então 1:10.

Não há diferença no tipo nem na quantidade de células, quando comparada à amostra que foi diluída apenas 1:2.

2 – Lâmina FISH – Sonda EUB 338

Controle DAPI



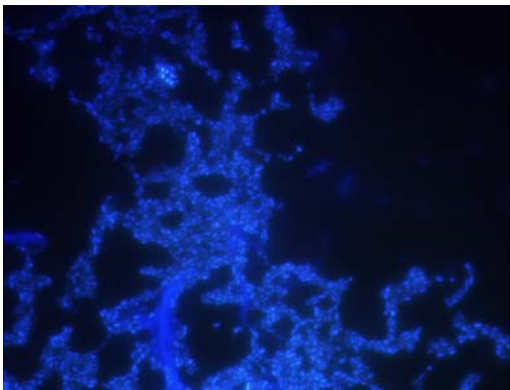


Figura14 Contr. positivo EUB338-*E. coli*-DAPI

Amostra 75 (P) –  
Amostra D3 (P) –

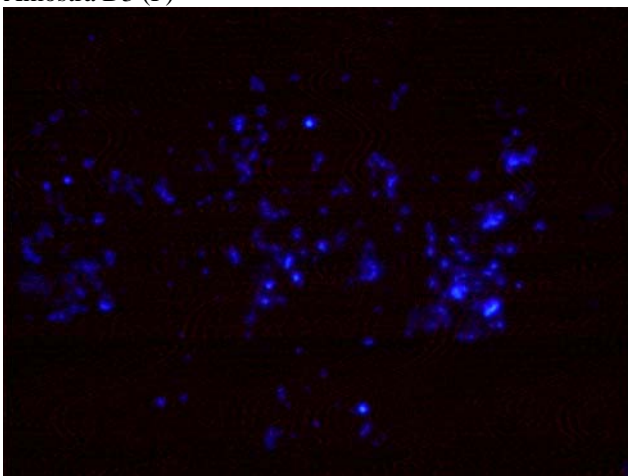


Figura 15 – Coloração DAPI ponto D3(P)

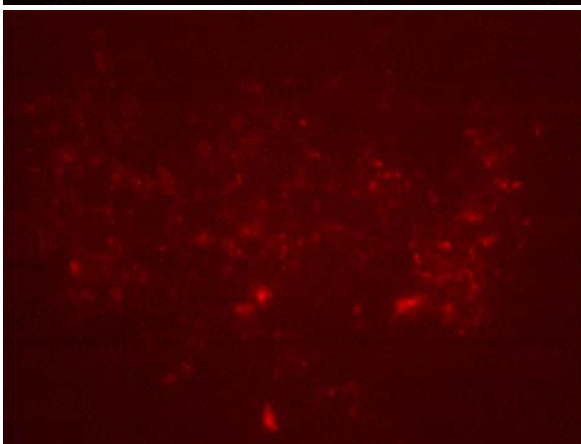


Figura 16–FISH(SondaEUB338)pontoD3(P)

Amostra CM (P) –

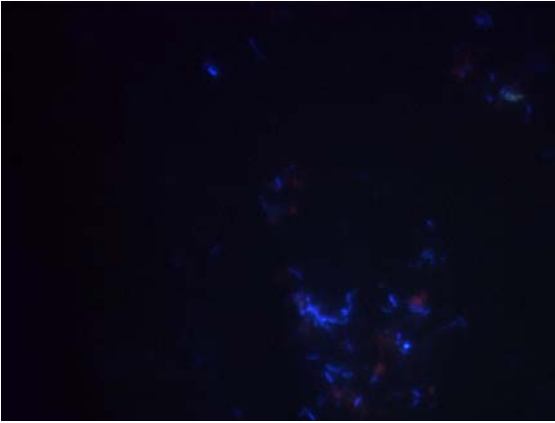


Figura 17 – DAPI CM(P)

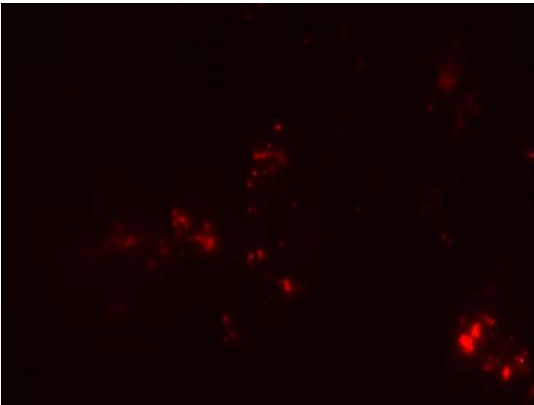


Figura 18 – FISH(Sonda EUB338) CM(P)

Amostra CM A.Nat

Cocos predominantemente, alguns bacilos. O sedimento impede a visualização de células hibridizadas.

Amostra CM Agit.

Cocos minúsculos, poucos bacilos. No DAPI o sedimento está corado de vermelho.

Amostra Rio Madeira  $10^{-2}$  1

Cocos minúsculos e alguns bacilos dando um sinalzinho “meia boca”, são bacilos pequenos, curvos.

3 – Lâmina FISH – Sonda SRB 385

Controle Positivo SRB 385

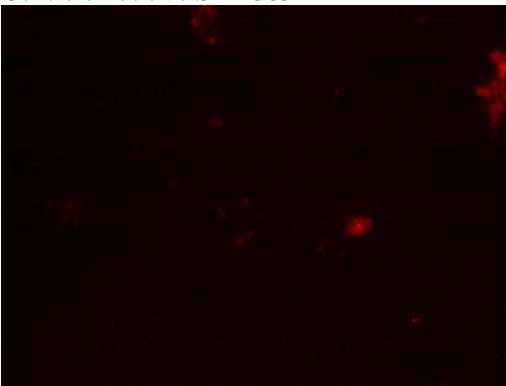


Figura 19 – Contr. Positivo Sonda SRB385 – FISH

Amostra CM (P)

Presença de grande número de células, bacilos curvos e sarcinas que não coram com DAPI (será autofluorescência?)



Figura 20 – DAPI CM(P)a

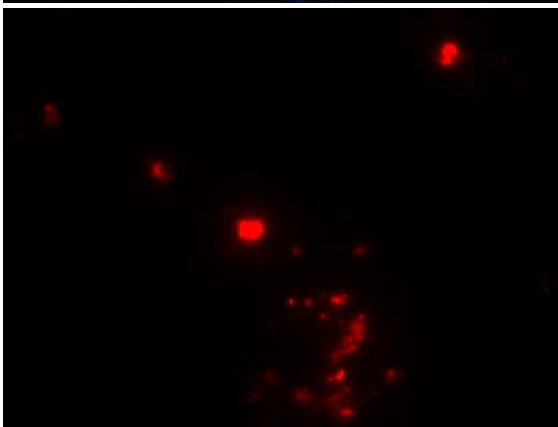


Figura 21 – FISH (Sonda SRB385) CM(P)a

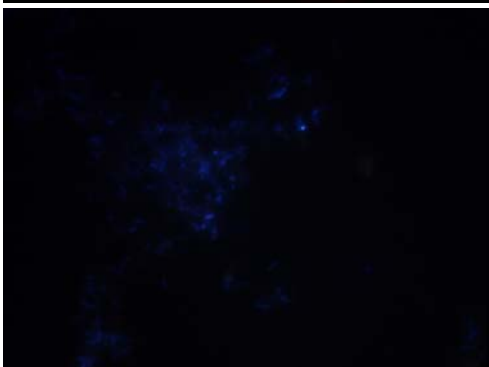


Figura 22 – DAPI CM(P)b

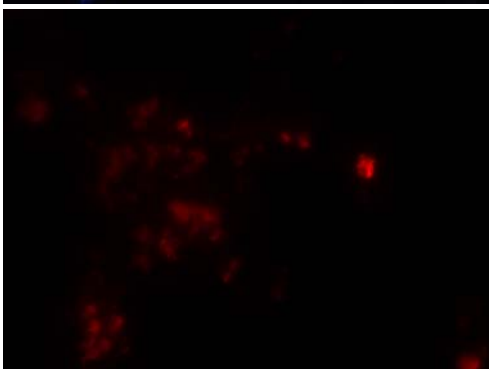


Figura 23 – FISH (Sonda SRB385) CM(P)b

Amostra D3 (P)

Não havia muitas células, apenas um bacilo deu sinal.

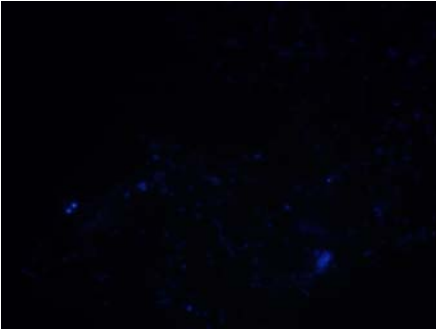


Figura 24 – DAPI D3(P)

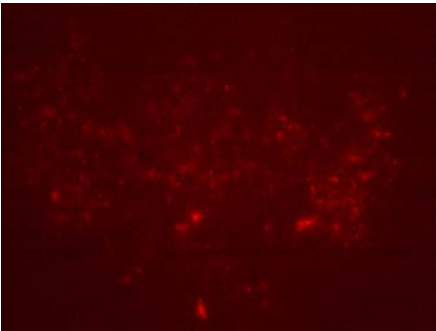


Figura 25 – FISH (Sonda SRB385) D3(P)

#### Amostra 75 (P)

Presença de uma quantidade razoável de células, predominantemente cocos, que não hibridizaram. Presença de bacilos finos, médios que hibridizaram, mas alguns não são visíveis com DAPI.

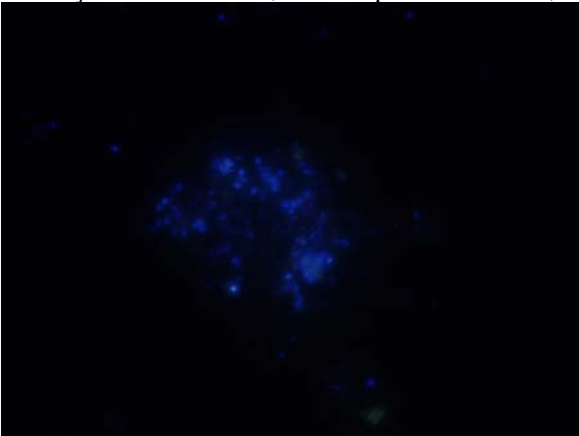


Figura 26 – DAPI 75(P)a

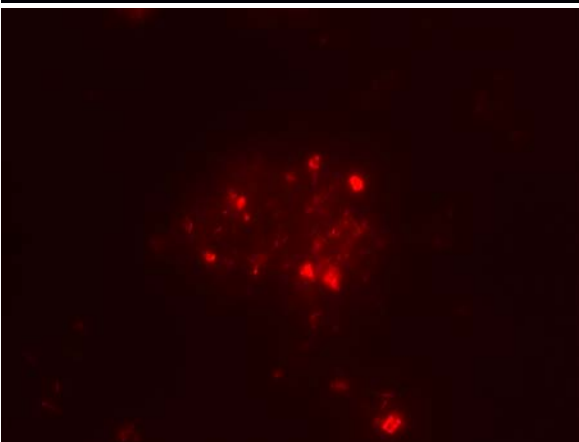


Figura 27 – FISH (SondaSRB385) 75(P)a

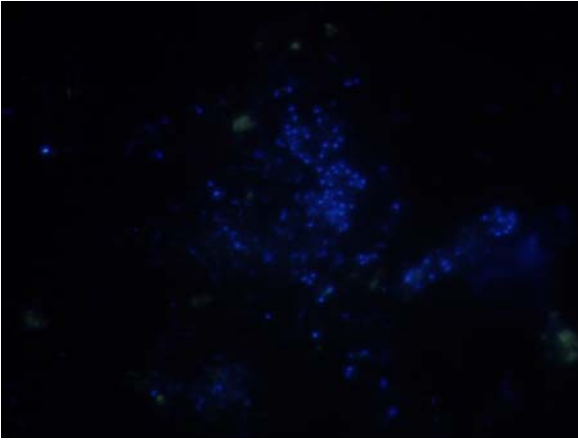


Figura 28 – DAPI 75(P)b

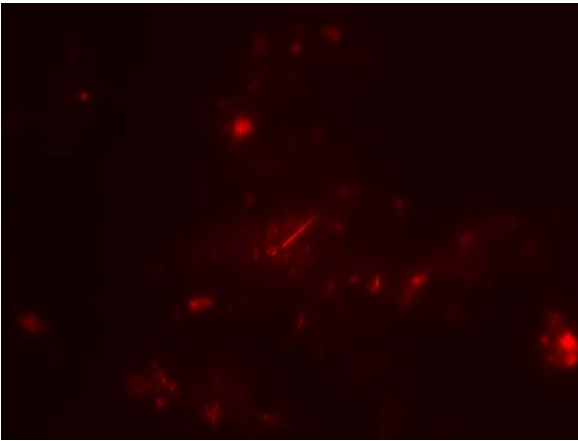


Figura 29 – FISH(SondaSRB385) 75(P)b

Amostra CM Agit.

Poucas células, cocos minúsculos e alguns cocos maiores. Também ocorre bacilos e alguns microorganismos são semelhantes a diplococos ou bacilos com esporos. O sedimento ficou vermelho, impossibilitando a visualização de células hibridizadas.

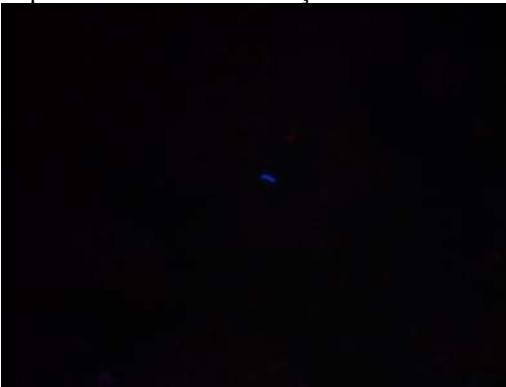


Figura 30 – DAPI CM Agit.

Amostra CM A. Nat.

Cocos predominantemente, alguns bacilos. O sedimento está vermelho, impossibilitando a visualização de células hibridizadas.



Figura 31 – DAPI CMANat.

Amostra Rio Madeira  $10^{-2}$  1

Presença se uma colônia de cocos bem nítida, no entanto nem todos coraram com a rodamina.

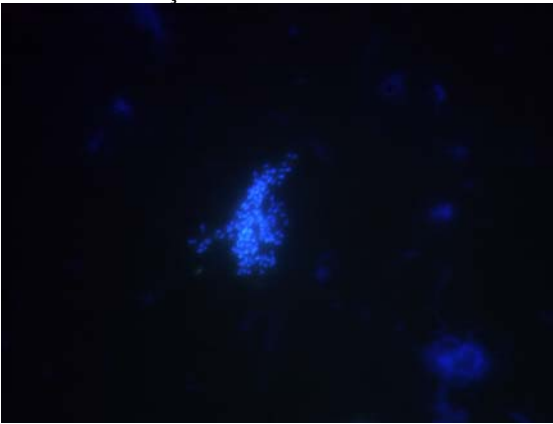


Figura 32 – DAPI Mad

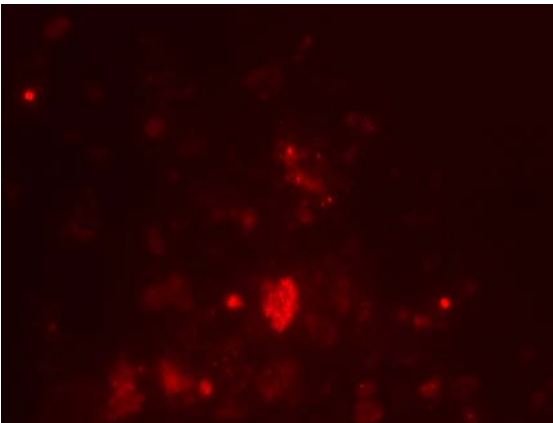


Figura 33 – FISH (SondaSRB385)Mad.

11/08/2004

#### INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O TESTE DE POTENCIAL DE BRS

Iniciamos trocando a atmosfera para  $N_2/CO_2$  por 3 minutos, alternando entre vácuo e gás, 30 segundos para cada.

Adicionamos as soluções complementares do meio. Após adicionar todas as soluções, inclusive a cisteína, percebemos que a solução traço de metais não havia sido adicionada, pois esta não estava descrito no protocolo do WP.

Para garantirmos anaerobiose da solução traço, tomamos uma alíquota da mesma que foi transferida asépticamente para um frasco que foi fluxionado com  $N_2$  por 30 minutos. O frasco foi então lacrado e transferiu-se para os meios 0,1 mL da mesma forma que foi feita a adição das outras soluções.

#### Oxidação

Após a adição da cisteína, os frascos foram mantidos em banho-maria por muito tempo e mesmo assim apenas 1/3 deles reduziu. A adição da solução traço ainda oxidou um pouco mais todos os frascos.

Retiramos 0,1 mL do meio e adicionamos o mesmo volume de cisteína. deixamos os frascos passarem a noite em banho-maria a 40-45°C. pela manhã estavam reduzidos. Só então procedeu-se a inoculação.

12/08/2004

#### Amostras de água e cultivos em Postgate B

Empregou-se seringa de 5,0 mL com agulhas pretas lavadas com  $N_2$ . Os frascos contendo as amostras foram homogeneizados manualmente e fluxionados com  $N_2$  quando abertos. O fluxo foi inserido com pipeta invertida estéril.

Nos frascos de cultivo em Postgate B, o fluxo de gás não foi inserido, mas mantido próximo à superfície através de uma agulha ligada a um acrodisc.



Figuras 34, 35 e 36 – Inoculação de amostras já cultivadas

#### Amostras de sedimento

##### Ponto 75

Como o sedimento era muito grosso, espesso, tivemos que abrir os frascos de cultura para inocular os mesmos. Os frascos foram abertos sob fluxo de  $N_2$ , em condições de assepsia.

Os frascos contendo as amostras foram agitados manualmente e inseriu-se fluxo de  $N_2$  através de pipeta invertida.

A transferência do inóculo foi feita usando pipeta invertida de 1 mL. Utilizou-se uma seringa para acertar o volume. A anaerobiose desse sedimento inoculado não foi mantida.

##### Ponto D3

Esse sedimento é menos espesso que o 75, mas foi necessário usar pipeta. Usamos pipeta invertida de 5,0 mL, que permitiu observar o volume inoculado. Nesse caso a anaerobiose foi mantida. Adicionamos 2,0 mL de inóculo em cada frasco.

A adição de algumas amostras oxidaram alguns meios.

13/08/2004

#### CONTAGEM – RIO MADEIRA

Hoje fizemos uma avaliação do crescimento das amostras de sedimento do Rio Madeira, que foi inoculado a 15 dias (29/08/2004). Também avaliamos o crescimento das amostras da cava da mina que foi inoculado a 9 dias (04/08/2004). Fizemos essa análise por turbidez. Dia 19/08/2004 faremos a avaliação do crescimento da amostra do Rio Madeira por turbidez e por reação com acetato de chumbo. Da cava da mina apenas por turbidez, novamente.

Os resultados serão apresentados nos quadros abaixo:

<b>NMP – Rio Madeira / 15 dias de incubação – Avaliação de turbidez</b>					
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	Incolor Pouco precipitado escuro Turvo +	Incolor Turvo, com nuvem +	Incolor C/ pouco precipitado -	Incolor Turvo +	Azul Pouco precipitado -
2	Incolor Precipitado preto fino Turvo +	Incolor Crescimento em flocos +	Incolor Crescimento em fiapos +	Azul-Cinza -	Incolor Turvo +
3	Incolor Precipitado preto fino Turvo +	Incolor Turvo com fiapos +	Incolor C/ pouco precipitado -	Incolor Crescimento branco +	Incolor Precipitado parecido com areia -
4	Incolor Precipitado preto em grumos grandes (parece biofilme) Turvo +	Incolor Turvo +	Incolor -	Incolor Precipitado ou crescimento em nuvem -	Roxo Pouquíssimo precipitado -
5	Incolor C/ pouco precipitado escuro. Turvo +	Incolor Turvo e c/ alguns fiapos +	Incolor C/ pouco precipitado em nuvem -	Incolor C/ pouco precipitado -	Azul C/ pouco precipitado -

<b>NMP – Cava da Mina / 9 dias de incubação – Avaliação de turbidez</b>					
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	Incolor Pouco precipitado -	Incolor Pouco precipitado ou crescimento -	Incolor C/ pouquíssimo precipitado -	Roxo -	Azul -
2	Azul-cinza -	Azul Pouquíssimo precipitado -	Rosa claro Pouquíssimo precipitado -	Azul bem claro -	Incolor -
3	Incolor Pouco precipitado C/ artrópode(?!) -	Azul-cinza Pouco precipitado ou crescimento -	Rosa -	Rosa -	Azul -
4	Incolor -	Azul-cinza -	Roxo -	Azul bem claro -	Azul -
5	Incolor C/ precipitado escuro parecido com areia. -	Azul bem claro -	Roxo -	Roxo -	Azul -



19/08/2004

## CONTAGEM BRS RIO MADEIRA – TURBIDEZ – 21 DIAS

	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	Turvo. Precipitado preto +	Turvo com pouco precipitado escuro +	Incolor -	Bem turvo +	Pouco precipitado +
2	Bem turvo e bem preto +	Turvo com precipitado. Crescimento branco em pequenos grumos +	Incolor +	Azulado -	Turvo +
3	Turvo. Precipitado preto +	Turvo com crescimento. Parece filme +	Incolor +	Turvo com grumos brancos +	Pouco precipitado +
4	Turvo. Precipitado preto em grumos +	Turvo com crescimento +	Incolor +	Turvo com nuvem +	Azulado -
5	Turvo. Precipitado marrom +	Turvo. Precipitado preto +	Precipitado nuvem e turvo +	Pouco precipitado +	Azulado. Pouco precipitado +

## Rio Madeira – Acetato de Chumbo – 21 dias

	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	-	+	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-

## Contagem Cava da Mina – turbidez – 15 dias

	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	Pouco precipitado +	Pouco precipitado +	Pouco precipitado +	Azul -	Azulado. Pouco precipitado +
2	Pouquíssimo precipitado -	Pouquíssimo precipitado -	Lilás -	Pouco precipitado +	Pouco precipitado +
3	Artrópode -	Pouquíssimo precipitado -	Azul -	Azul -	Lilás. Pouco precipitado +
4	Pouco precipitado +	Pouco precipitado +	Azul -	Pouco precipitado +	Lilás. Pouco precipitado. +
5	Precipitado semelhante a areia	Turvo +	Azul -	Azul -	Lilás. Pouco precipitado +

Teste potencial BRS – 7 dias – Acetato de chumbo

	1	2
Água CM(P)	+	+
Água CM	-	-
Água Cma	-	-
SED 75	+	+
SED 75a	+	+
Água 75(P)	+	+
Água 75	-	-
Água 75 a	-	-
SED D3	+	+
SED D3a	+	+
Água D3(P)	+	+
Água D3	-	-
Água D3a	-	-

20/08/2004

**TAMBÉM REALIZEI, JUNTAMENTE COM A ANA CAROLINA, UMA PEQUENA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, E SELECIONEI ALGUNS ALGUNS ARTIGOS QUE PRETENDO IMPRIMIR E LER EM BH. SEPARAMOS INICIALMENTE 10 ARTIGOS E DE UM DELES A ROSANA DETERMINOU ALGUNS QUE EU DEVO BUSCAR NO CDTN E NA BASE DE PERIÓDICOS.**

Os artigos separados são os seguintes:

- Tsukamoto, TK, Killion, HA, Miller, GC. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. WATER RES 38 (6): 1405-1418 MAR 2004
- Labrenz, M, Banfield, JF. Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system. MICROBIAL ECOL 47 (3): 205-217 APR 2004
- Tabak, HH, Scharp, R, Burckle, J, et al. Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. BIODEGRADATION 14 (6): 423-436 DEC 2003
- Tabak, HH, Govind, R. Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 2. Membrane bioreactor system for sulfate reduction. BIODEGRADATION 14 (6): 437-452 DEC 2003
- Garcia, C, Moreno, DA, Ballester, A, et al. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. MINER ENG 14 (9): 997-1008 SEP 2001
- Kolmert, A, Johnson, DB. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. J CHEM TECHNOL BIOT 76 (8): 836-843 AUG 2001
- Benner, SG, Gould, WD, Blowes, DW. Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. CHEM GEOL 169 (3-4): 435-448 SEP 1 2000
- Jalali, K, Baldwin, SG. The role of sulphate reducing bacteria in copper removal from aqueous sulphate solutions. WATER RES 34 (3): 797-806 FEB 2000

## ANEXO B – TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO

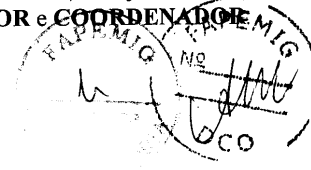
**FAPEMIG**Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado de Minas Gerais**TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO****IDENTIFICAÇÃO****MODALIDADE:** “PROGRAMA DE INFRA-ESTRUTURA PARA JOVENS PESQUISADORES”.**EDITAL N° 07/2003****PROCESSO N°:** EDT 1970/03**PROJETO:** “REVERSÃO DA ACIDEZ DA ÁGUA GERADA EM MINA DESCOMISSIONADA DE URÂNIO.”**PRAZO:** 12 MESES**PARTES****OUTORGANTE: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG** - com sede à Rua Raul Pompéia nº 101 - 11º. andar, na cidade de Belo Horizonte/MG., inscrita no CNPJ sob o nº. 21.949.888/0001-83, neste ato representada por seu Diretor de Planejamento, Gestão e Finanças, **PAULO KLEBER DUARTE PEREIRA**, credenciado pela portaria PR 005/2003, de 02 de Abril de 2003.**OUTORGADO: CNEN/CDTN-CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA NUCLEAR**, com sede à Rua Professor Mario Werneck, s/n Cidade Universitária - Belo Horizonte/MG, inscrita no CNPJ no. 00.402.552/0012-89, neste ato representada por seu Superintendente, **SÉRGIO ALMEIDA CUNHA FILGUEIRAS****INTERVENIENTE: SERVIÇO DE TECNOLOGIA MINERAL DO CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA NUCLEAR**, neste ato representado por seu Chefe de Departamento.**GESTOR: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA - FUNDEP**, com sede à Av. Antonio Carlos, 6627 4o. andar - Pampulha, Belo Horizonte/MG, inscrita no CNPJ nº 18.720.938/0001-41, neste ato representada por seu Diretor Executivo, **JOSÉ NAGIB COTRIM ÁRABE**.**COORDENADORA: ANA CLAUDIA QUEIROZ LADEIRA**, CPF: 468.447.246-91, residente e domiciliada à Rua California, 855/501 - B.Sion - Belo Horizonte/MG, mantendo vínculo com a Centro Nacional de Energia Nuclear - CNEN/CDTN

Este Termo será regido pelas cláusulas e condições seguintes:

A expressão “PARTÍCIPIES” será utilizada para referir-se, conjuntamente, à **OUTORGANTE, OUTORGADO, INTERVENIENTE, GESTOR e COORDENADOR**

4

B



ANEXO C - TECHNICAL NOTE QUE SERÁ PUBLICADA NA REVISTA MINERALS  
ENGINEERING

## MONITORING OF SULFATE-REDUCING BACTERIA IN ACID WATER FROM URANIUM MINES

Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN/CNEN, R. Prof. Mário Werneck s/n, Campus da UFMG, Pampulha, 30123-970 BH, MG. Brazil.  
J. S. Benedetto, [jsb@cdtn.br](mailto:jsb@cdtn.br), S. K. de Almeida [ska@cdtn.br](mailto:ska@cdtn.br), H. A. Gomes [hgomes@cnen.gov.br](mailto:hgomes@cnen.gov.br), R. F. Vazoller, [vazoller@uol.com.br](mailto:vazoller@uol.com.br), A. C. Q. Ladeira [acql@cdtn.br](mailto:acql@cdtn.br)

### INTRODUCTION

One of the most serious environmental problems created by the mining industry is acid mine drainage. In one plant of Nuclear Industries of Brazil - INB, this problem is a matter of concern. In that unit the uranium ore was processed until 1995 and generated a big amount of barren ore with  $U_3O_8$  lower than 200ppm. These barren ores were deposited in large neighboring areas from the mining region, in waste rock piles. The sulfite minerals present in these areas, including pyrite, generated high acidity water with radionuclides elements (uranium, thorium and radium) and stable elements (Manganese, zinc, fluorite, iron, etc). The level of these elements were above the environmental legislation content (Resolution CONAMA 2005). Actually the treatment involves chemical precipitation and any interruption leads to an increasing pollution on the aquatic system (Cipriani, 2002). The treatment of acid water using sulfate-reducing bacteria - SRB have been used in other countries with quite good technical as well as economical results. SRB are useful to abate Acid Mine Drainage - AMD due to two fundamental reasons. Firstly because of their capacity to reduce sulfate to sulfite. These sulfites react additionally with certain metals dissolved in the contaminated waters, such as copper, iron and zinc, forming insoluble precipitates. On the other hand, the system acidity is reduced by their own action of sulfate reductions and by the carbon metabolism of the bacteria. (Garcia et al., 2001). In this context the objective of this study consisted in seasonal diagnostic of the sulfate-reducing bacteria present in the aquifer system of the INB Industry Complex in Caldas. Brazil.

### METHODOLOGY

#### 1. Sampling

Water and sediment samples were collected in liquid effluents from the Pit mine (PM) and from the waste rocks 4 (WR4) and 8 (WR8) in different depth and periodically for the seasonal study between February and December 2004.

#### 2. Microbiological analysis

The determination of the occurrence of SRB in water samples and sediment was accomplished with cultivation medium - Postgate B using the method of the multiple tubes, series of five tubes (Postgate, 1979).

For the Total bacteria counting aqueous solution of coloring acridine orange was added to the water samples previously conditioned with formaldehyde, used to fix the microorganisms. After a 5 minute contact the sample was filtered in polycarbonate membrane placed on sheet dies and analyzed under epi-fluorescence microscope.

#### 3. Physical and chemical analyses

The water pH was measured during the sample collection. The determination of dissolved oxygen in water was carried out by titrimetry (Eaton, 1995). The material in suspension (organic and inorganic) was measured according to Teixeira et al, 1965.

The analyses of Manganese and Zinc were performed by spectrometry of atomic emission with coupled plasma. The phosphate and sulfate were analyzed by spectrophotometry and the fluoride by potentiometry with selective electrode.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the chemical analysis of the water and sediment samples collected in the sites PM, WR8 and WR4. Garcia et al, 2001 verified that the acid water from the Spanish pyrite showed sulfate values between 1800 a 2000 ppm and zinc grade between 30 e 50 ppm. These levels were higher than the experimental values found in this study.

Table 2 shows the pH and O<sub>2</sub> measures and biological analysis for samples collected from WR8. The highest value of total bacteria counting ( $13,3 \cdot 10^5$  bacteria.mL<sup>-1</sup>) was observed in February in this site.

Table 1. Chemical Analysis of samples from the points PM, WR8 and WR4.

Site	F <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Mn	Zn	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Water					
PM	70.95	4.60	97.66	16.83	1385.50
WR8	116.81	< 0,03	137.61	22.59	1548.75
WR4	121.44	< 0,03	107.38	17.95	1247.14
Sediment					
PM	4.16	0,137+0,006	4,94+0,03	0,935+0,001	12.10
WR8	0.06	0,217+0,006	0.24	0.06	2.91
WR4	0.04	0,254+0,006	1.14	0.04	0.43

Concentrations of the species in water - mg.L-1 and (%) in sediment

Frömmichen et al., 2004 carried out studies of microcosm simulating of small pond role mine with acid water (pH = 2,6). The bacteria total counting in the water column obtained by these authors changed from 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> bacteria mL<sup>-1</sup>, according to the medium values of total bacteria obtained in that work in the WR8 (  $1,1 \cdot 10^6$  bacteria mL<sup>-1</sup>), PM (  $3,5 \cdot 10^5$  bacteria mL<sup>-1</sup>) and WR4 (  $3,4 \cdot 10^5$  bacteria mL<sup>-1</sup>) points.

*Table 2 – Biological analyses, pH and O<sub>2</sub> measures in samples from WR8 site*

	WATER	SEDIMENT
--	-------	----------

Month	pH	SRB MPN/mL	Total bacteria Bact./mL	O <sub>2</sub> (mg/L)	Organic matter (mg/L)	SRB MPN/mL	Organic matter (mg/L)
Feb.	5,15	2,8	13,29x10 <sup>5</sup>	5,69	0,005	1,4	16,60
Mar.	3,38	1,1	11,58x10 <sup>5</sup>	1,58	0,006	1,2	15,90
April	3,50	0	12,16x10 <sup>5</sup>	0,65	0,004	1,4	19,30
Aug.	3,35	0	8,84x10 <sup>5</sup>	1,60	0,004	15	22,70
Sep.	3,51	0	10,74x10 <sup>5</sup>	1,62	0,004	0,7	14,90
Oct.	3,45	0	11,59x10 <sup>5</sup>	1,62	0,005	2	24,70
Nov.	3,52	0	13,00x10 <sup>5</sup>	13,34	0,004	12	20,50
Dec.	3,87	0	-	11,24	0,005	110	11,90

MPN/mL- most probable number/mL

The medium values of SBR in water samples were low as we can see in table 2. Some studies showed that high concentrations of heavy metals and low pH values ( 3.0 - 3.5) are limiting factors that influence the SRB increasing acid water from mine (Frömmichen et al. 2004, Garcia et al., 2001). The lowest pH value (bellow 3,5) was measured during the months of March and April and higher number of SRB (2,8 MPN. mL<sup>-1</sup>) was detected in February in WR8 site when the water pH was higher( 5,2). Anaerobic reactors studies for the metals and sulfites removing from mine acid water have shown high SRB increasing, from 4.0.10<sup>7</sup> to 8.0.10<sup>8</sup> bacteria mL<sup>-1</sup> on acid medium mainly due to organic matter enrichment in these systems ( Jong and Parry, 2003).

According to expected results, the highest values of SRB were detected in the period between February and August in water samples collected 12,5 m of depth in the PM, where it was also detected the lowest oxygen concentrations along the period. The dissolved oxygen values measured in bottom samples of the mine lake (UTM) changed from 4,0 to 10,1 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> and were according to the values obtained by Meier et al. (2004) using sediment/water interface samples of acid water from Lusatia (Germany).

The values of SRB as well as most of its occurrences in the sediment samples in the three sampling sites were higher if compared with water samples along the year. This was expected as lower concentrations of dissolved oxygen were found in the sediment and higher concentrations of available organic matter for the populations of SRB were found in the sediment samples. These results are on a par with different studies conducted with acid water from mine.

## Conclusion

The results obtained from the microbiological variables presented seasonal variation in the three points evaluated. The results showed that SRB was present in water samples presenting low pH values and high

concentrations of heavy metals, as well as in samples with high oxygen levels. The sediment was the preferential place for SRB occurrence and WR8 site presented the highest values of SRB detected in that experimental study.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to FAPEMIG ( Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for the financial support.

## REFERENCES

- Cipriani, M., Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio. *Doctor Thesis; Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP* Brazil,, 2002.
- Frömmichen, R., Wendt-Potthoff, K., Friese, K., Fischer, R. Microcosm studies for neutralization of hypolimnic acid mine pit lake water (pH 2,6). *Environ. Sci. Technol.*, 38, 2004; pp. 1877-1887.
- Garcia, C; Moreno, D.A.; Ballester, A.; Blázquez, M.L.; González, F.; Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulfate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, v. 14, No 9, 2001, pp. 997-1008.
- Jong, T. & Parry, D.L.; Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37(14), 2003, pp. 3379-3389.
- Meier, J. P.; Baben Zien, H. D.; Wendat Potthoff, K.; Microbial Cycling of Iron and Sulfur in Sediments of Acidic and pH Neutral Mining Lakes in Lusatia ( Brandenburg, Germany), *Biogeochemistry*, vol. 67; 2004; pp. 135-156;.
- Postgate, J.R.; The sulphate-reducing bacteria. 2<sup>a</sup> edition; Cambridge University Press, New York; 1979.
- Resolução CONAMA, n° 357, March 17, 2005.
- Teixeira, C; Tundisi, J.G.; Kutner, M.B.; Plankton studies in a mangrove II. The standing stock and some ecological factors. *Bolm. Institute. Of Oceanography* . São Paulo, Brazil. v.24, 1965; pp. 23-41.



ANEXO D – ARTIGO APRESENTADO NO “INTERNATIONAL NUCLEAR  
ATLANTIC CONFERENCE” (INAC 2005),

2005 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2005  
Santos, SP, Brazil, August 28 to September 2, 2005  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR - ABEN  
ISBN: 85-99141-01-5

## DIAGNÓSTICO DO EFLUENTE ÁCIDO GERADO NA MINA DE URÂNIO PARA SUBSIDIAR ESTUDOS DE REMEDIAÇÃO BIOLÓGICA

Sheila K. de Almeida<sup>1</sup>, Jeaneth S. Benedetto<sup>1</sup>, A.C.Q. Ladeira<sup>1</sup>, Rosana F. Vazoller<sup>2</sup> e  
Heliana A. Gomes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN)  
Campus da UFMG – Pampulha  
Cx. Postal 941 – 30123-970 – Belo Horizonte – MG  
ska@cdtn.br, jsb@cdtn.br, acql@cdtn.br

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas - USP  
vazoller@uol.com.br

<sup>3</sup>Laboratório Poços de Caldas (Colab/CNEN)  
hgomes@cnen.gov.br

### RESUMO

Um dos mais sérios problemas ambientais criados pela indústria de mineração é a drenagem ácida de mina. Em uma planta de urânio em fase de descomissionamento, de propriedade das Indústrias Nucleares do Brasil – INB, este problema é preocupante. A presença de sulfetos de ferro, tais como pirita, gera água com acidez acima dos níveis permitidos pela legislação e desta forma, impróprio para descarte no ambiente. A indústria mantém um alto custo com tratamento da água ácida da mina e dos botas-fora e este consiste em neutralização com cal e precipitação dos metais pesados.

O tratamento da água ácida usando bactérias redutoras de sulfato tem sido usado em outros países, obtendo bons resultados bem como vantagens econômicas, sendo portanto objeto dessa pesquisa.

Um estudo sazonal foi realizado com bactérias redutoras de sulfato presentes no efluente líquido e sedimentos das mina e de dois botas-fora de mina de urânio, em fase de descomissionamento, em Poços de Caldas. Este estudo mostra a presença de BRS no ambiente analisado, bem como alguns fatores relacionados com a presença de BRS, tais como: oxigênio dissolvido, pH e matéria orgânica.

### 1. INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes problemas que afetam as companhias de mineração no mundo é a drenagem ácida de mina (DAM). A DAM é caracterizada por elevada acidez, altas concentrações de metais (tais como Cu, Fe, Zn, Al, Pb, As, Cd, etc.) e altas concentrações de sulfato dissolvido. Tipicamente, o pH por volta de 3 e a concentração de sulfato é por volta de 3000 ppm [7]. Portanto, o tratamento dos efluentes de mina é dirigido à neutralização da água e remoção dos metais e sulfato dissolvidos.

A técnica tradicionalmente usada para o tratamento da água ácida de mina tem sido baseada em métodos químicos de neutralização e precipitação. Essas técnicas são bastante efetivas, mas apresentam algumas desvantagens, tais como a necessidade de construir uma planta de tratamento adicional, os altos custos dos reagentes utilizados e a geração de um volume de rejeitos que necessitam se relocados.

Uma alternativa possível para o tratamento destes efluentes é a bioremediação usando bactérias redutoras de sulfato (BRS), apresentando a vantagem de que esses microrganismos crescem em ambientes de mina. Na verdade BRS têm sido isoladas do fundo de lagos de mina [2].

Muitos países tem minas não ativas onde a DAM é um sério problema devido aos altos níveis de acidez. A região carvoeira do sul do Brasil é um exemplo disso. A indústria nuclear em Poços de Caldas, Brasil – “Indústrias Nucleares do Brasil” – INB tem sido objeto de estudos para viabilizar um tratamento de água ácida gerada da mina [10].

O objetivo deste estudo consiste num diagnóstico sazonal da presença de bactérias redutoras de sulfato em um sistema aquático do Complexo Industrial em Caldas, Brasil. Este estudo inclui a caracterização das amostras em diferentes pontos e profundidades.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Amostragem

As amostras de água e sedimento foram coletadas em três pontos da Unidade de Tratamento de Minérios: Cava da mina (Pit Mine – PM), Bota-fora 4 (Waste rock 4 – WR4) e, Bota-fora 8 (Waste rock 8 – WR8). As amostras de água foram coletadas e armazenadas em frascos de vidro, estéreis, cheios até a borda. O sedimento foi coletado e colocado em sacos plásticos, e fechados, exceto na cava da mina onde foi utilizado o coletor tipo core.

### 2.2. Análises microbiológicas

Foram feitas contagem total de bactérias e determinação da ocorrência de BRS nas amostras de água e sedimento.

Para contagem total de bactérias, amostras de água foram fixadas com formaldeído (2%) e coradas com laranja de acridina (acridine orange – 1,0 g/L). Após cinco minutos de contato, as amostras foram filtradas com membrana de policarbonato, enegrecidas com Sudam Black, com 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. A membrana foi analisada sob microscópio de epifluorescência, onde foram contados 50 campos, totalizando uma área de 625  $\text{mm}^2$ .

A determinação da ocorrência de BRS nas amostras de água e sedimento foi realizada através de cultivo em meio Postgate B, usando o método dos múltiplos tubos (série de cinco tubos). O número mais provável por grama ou volume ( $\text{NMP}\cdot\text{g}^{-1}$  ou  $\text{mL}^{-1}$ ) de BRS foi determinado usando a tabela de número mais provável adequada às diluições realizadas [9].

#### 2.4. Análises físico-químicas e radiológicas

Foram realizadas as medidas dos seguintes parâmetros: temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, material em suspensão e matéria orgânica.

Foram feitas também análises de manganês, zinco, fosfato, sulfato e dos radionuclídeos: urânio, tório, Ra-226, Ra-228 e Pb-210 e seus filhos.

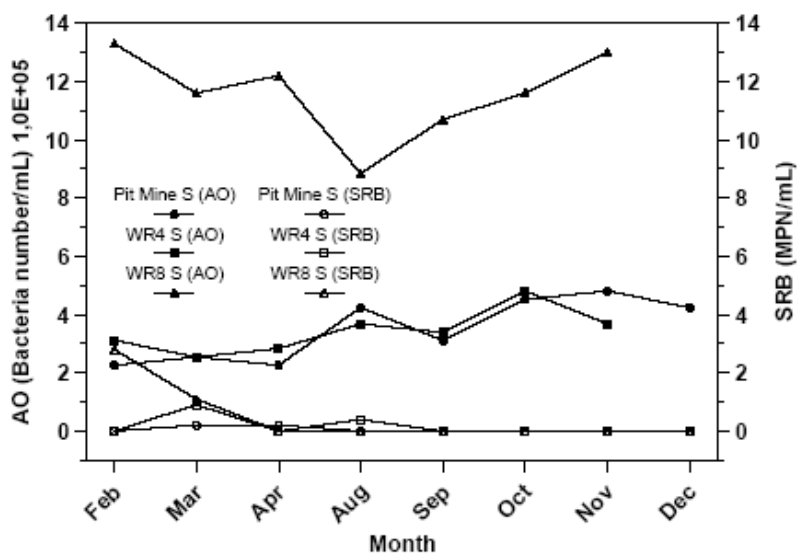
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a Tabela 1 verifica-se uma alta concentração de metais e sulfato dissolvidos em todas as amostras coletadas. Garcia et al, 2001 [4] verificaram que água ácida procedente de mina pirítica da Espanha apresentou valor de sulfato que variou de 1800 a 2000 ppm, enquanto o valor de zinco obtido esteve entre 30 e 50 ppm. Tais valores foram mais elevados do que os encontrados no presente estudo, conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1. Análises químicas das amostras dos pontos PM, WR8 and WR4**

Pontos	F <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Mn	Zn	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>Água</b>					
PM	70.95	4.60	97.66	16.83	1385.50
WR8	116.81	< 0,03	137.61	22.59	1548.75
WR4	121.44	< 0,03	107.38	17.95	1247.14
<b>Sedimento</b>					
PM	4.16	0,137+0,006	4,94+0,03	0,935+0,001	12.10
WR8	0.06	0,217+0,006	0.24	0.06	2.91
WR4	0.04	0,254+0,006	1.14	0.04	0.43

Foi observado a ocorrência de bactérias nas amostras de água, o Bota-fora 8 (WR8) apresentou uma grande capacidade para crescimento bacteriano durante o período estudado. O maior valor de contagem total de bactéria ( $13,3 \cdot 10^5$  bactéria.mL<sup>-1</sup>) foi observado em Fevereiro no ponto WR8. Frömmichen et al. (2004) [3] realizaram estudos de microcosmos simulando lagos de cava de mina contendo água ácida (pH = 2,6). Os resultados para contagem total de bactérias na coluna de água obtidos por esses autores, variaram de  $10^5$  a  $10^6$  bactéria. mL<sup>-1</sup>. Na Figura 1 estão apresentados os resultados obtidos das análises de contagem total de bactérias e das bactérias sulfato redutoras. Os valores médios obtidos no presente estudo concordam com os publicados por outros autores, estes foram: Bota fora 8 (WR8) -  $1,1 \cdot 10^6$  bactéria. mL<sup>-1</sup>, Mina (PM) -  $3,5 \cdot 10^5$  bactéria. mL<sup>-1</sup> e no bota fora 4 (WR4) -  $3,4 \cdot 10^5$  bactéria. mL<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Número total de bactérias -AO (acridine orange) e de bactérias sulfato redutoras (BRS) observados nas amostras de água dos três pontos.

### 3. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para as variáveis microbiológicas apresentam uma variação sazonal nos três pontos analisados. Observou-se que as bactérias redutoras de sulfato estavam presentes em amostras de água que apresentavam baixo pH e altas concentrações de metais pesados, bem como em amostras com alto nível de oxigênio. Estes resultados também foram registrado em estudos apresentados por outros autores.

Neste estudo experimental, as bactérias sulfato redutoras ocorreram preferencialmente no sedimento, onde se encontra disponível maior quantidade de matéria orgânica e também no bota fora 8 - ponto WR8.

### REFERÊNCIAS

1. CIPRIANI, M. Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio. Tese de doutorado. Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP (2002).
2. DUGAN, P. Bacterial ecology of strip mine areas and its relationship to the productions of acidic mine drainage. *The Journal of Science* (6), 266-279 (1975).
3. FRÖMMICHEN, R., WENDT-POTTHOFF, K., FRIESE, K., FISCHER, R. Microcosm studies for neutralization of hypolimnic acid mine pit lake water (pH 2,6). *Environ. Sci. Technol.*, 38: 1877-1887 (2004).

4. GARCIA, C; MORENO, D.A.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M.L.; GONZÁLEZ, F. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, v. 14, No 9, pp. 997-1008 (2001).
5. GYURE, R. A., KONOPKA, A., BROOKS, A. and DOEMEL, W.. Microbial sulfate reduction in acidic (pH 3) strip-mine lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3) 193-201 (1990).
6. KUYUCAK, N.; ST-GERMAIN. P.; WHEELAND, K.G. *In situ* bacterial treatment of AMD in open pits. In: Proceedings Second International Conference on the abatement of acidic drainage, Montreal, Canada, Vol. 1, 335-354 (1991).
7. LYEW, D., KNOWLES, R. and SHEPPARD, J. The biological treatment of acid mine drainage under continuous flow conditions in a reactor. *Process Safety and Environmental Protection*, 72(1), 42-47(1994).
8. NORDWICK, S.; ZALUSKI, M.; BLESS, D.; TRUDNOWSKI, J. Development of SRB treatment systems for acid mine drainage. In: Proceedings of Hydrometallurgy – Fifth International Conference in Honor of Professor Ian Ritchie – V.2: Electrometallurgy and Environmental Hydrometallurgy, Edited by Young, A.M. et al. Vancouver, Canadá (2003).
9. POSTGATE, J.R. *The sulphate-reducing bacteria*. 2ª edição Cambridge University Press, New York (1979).
10. QUINELATO, A.L.; GOMES, H.A.; FUKUMA, H.T.; NASCIMENTO, M.R.L.; COSTA, W.C. Removal of radionuclides and heavy metals from acid mine waters by retention on adsorbing materials. **Progress Report**. IAEA Research Contract N<sup>o</sup>: 11569/Regular Budget Fund, Poços de Caldas/MG (2002).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)