



JEFERSON FOSSATTI

**ESTUDO DO BIOPROCESSO UTILIZANDO BACTÉRIAS AERÓBIAS
NO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DA MINERAÇÃO DE
CARVÃO**

CANOAS, 2012

JEFERSON FOSSATTI

**ESTUDO DO BIOPROCESSO UTILIZANDO BACTÉRIAS AERÓBIAS
NO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DA MINERAÇÃO DE
CARVÃO**

Dissertação apresentada para a banca examinadora do Curso de Mestrado do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como exigência parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração.

Orientador: Prof. Dr. Delmar Bizani

CANOAS, 2012

TERMO DE APROVAÇÃO

JEFERSON FOSSATTI

ESTUDO DO BIOPROCESSO UTILIZANDO BACTÉRIAS AERÓBIAS NO TRATAMENTO DA DRENAGEM ÁCIDA DA MINERAÇÃO DE CARVÃO

Dissertação apresentada para a banca examinadora do Curso de Mestrado do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como exigência parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração.

Prof. Dr. Rubens Müller Kautzmann
Unilasalle

Prof. Dr. Silvio Roberto Taffarel
Unilasalle

Profª Drª. Patrice Monteiro de Aquim
Feevale

CANOAS, 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por cuidar de cada passo em minha vida.

Aos meus pais, Silvio e Sonia Fossatti, que são a minha estrutura, exemplos de vida e superação. Sou grato por me mostrarem, sempre de forma tão natural, os verdadeiros valores da vida, pelo amor incondicional e se fazerem presentes a cada segundo.

À minha namorada, Jucieli Saggin, pelo amor, paciência, incentivo, cooperação e sempre se mostrar presente, mesmo estando distante.

Ao meu orientador, Profº Delmar Bizani, pelo apoio, incentivo, paciência e conselhos.

Aos meus colegas do laboratório, Matheus, Débora, Juliana e Priscila pela ajuda fundamental.

A todos os professores do mestrado do curso de Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração do Unilasalle, pelos importantes ensinamentos transmitidos;

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho acontecesse. Estou certo de que esta conquista não é só minha, mas de todas as pessoas que colaboraram de alguma forma.

RESUMO

A Drenagem Ácida de Mina (DAM) é um dos grandes problemas da mineração no mundo. São águas que possuem pH baixo, alta concentração de sulfato e metais dissolvidos. É gerada quando o sulfeto mineral entra em contato com a água e o oxigênio. Os métodos mais comuns para tratamento, usado atualmente, são os químicos. Neste estudo utilizou-se o processo de biorremediação, o qual consiste no estímulo do processo natural de microrganismos em degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas. O objetivo deste trabalho foi produzir DAM em laboratório e estudar a possibilidade da utilização de bactérias no tratamento deste líquido de beneficiamento do carvão. Para o desenvolvimento do experimento foram empregados rejeitos piritosos, equipamentos e reagentes do Laboratório de Microbiologia do Unilasalle. Foram utilizadas duas linhagens bacterianas: *Acetobacter aceti* e *Micrococcus luteus*. Os microrganismos foram cultivados em ágar D-Manitol e o ágar nutriente, respectivamente. Essas bactérias foram inoculadas e incubadas em meio líquido contendo DAM e uma suplementação de 0,6% de lactato de sódio ($C_3H_5O_3Na$). Na preparação do meio a adição do lactato mostrou-se positiva, uma vez que, elevou-se o pH em valores adequados para o crescimento microbiano e não houve qualquer tipo de precipitação. Os microrganismos foram capazes de reduzir elevadas concentrações de metais, como: 63,85% de níquel, 61,06% de alumínio, 52,8% de ferro e 44,82% de chumbo. A redução de sulfato foi destaque para o *Micrococcus luteus* com 87,37% de remoção.

Palavras-Chave: Drenagem ácida de mina. Bioprocesso. Metais. Sulfato. *Micrococcus luteus*. *Acetobacter aceti*.

ABSTRACT

The Acid Mine Drainage (AMD) is a major problem in the mining world. Are waters that have low pH, high concentrations of dissolved metals and sulphate. It is generated when the sulfide mineral comes in contact with water and oxygen. The most common methods for treatment, currently used are the chemical. In this study we used the bioremediation process, which consists in stimulating the natural substances microorganisms to degrade toxically harmful substances transforming them into less toxic or not. The aim of this work was to produce AMD laboratory and study the possibility of using bacteria to treat this liquid coal beneficiation. For the development of the experiment were used pyritic tailings, equipment and reagents Microbiology Lab's Unilasalle. We used two bacterial strains: *Acetobacter aceti* and *Micrococcus luteus*. The microorganisms were cultivated in D-mannitol agar and nutrient agar, respectively. These bacteria were inoculated and incubated in liquid medium and supplementation for AMD 0.6% of sodium lactate ($C_3H_5O_3Na$). In preparing the medium the addition of lactate was positive, since the pH increased to values suitable for microbial growth and there was no precipitation of any kind. The microorganisms were able to reduce high concentrations of metals such as: 63.85% nickel, 61.06% aluminum, 52.8% iron and 44.82% lead. The sulphate reduction was highlighted with *Micrococcus luteus* to 87.37% removal.

Keywords: Acid Mine Drainage. Bioprocess. Metals. Sulfate. *Micrococcus luteus*. *Acetobacter aceti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estágios de formação de drenagem ácida.	17
Figura 2 - Influência do pH e da temperatura na atividade reativa da <i>T. ferrooxidans</i>	18
Figura 3 - Comportamento de alguns metais pesados em função do pH.	22
Figura 4 - Solubilidade de acordo com pH e Eh.	23
Figura 5 - Classificação do mecanismo de bioissorção: sítio onde o metal é removido	28
Figura 6 - Classificação do mecanismo de bioissorção: dependência do metabolismo celular	29
Figura 7- Produção de DAM em laboratório. A- Produção de DAM em coluna de vidro com aeração forçada; B- Esboço do sistema utilizado.	32
Figura 8 A e B – Fotografia através do aparelho contador de colônia da cultura de <i>M. luteus</i> em ágar nutriente (A) e cultura de <i>A. aceti</i> em Agar manitol (B), após incubação a 32°C/24hs.	34
Figura 9 - Montagem do experimento antes do bioprocesso.	35
Figura 10 - Experimento após o bioprocesso em estufa com aeração forçada, agitação e temperatura constante de 32°C.	35
Figura 11 - Suplementação e ajuste de pH da DAM produzida em laboratório.	38
Figura 12 - Curva do crescimento microbiano das linhagens de <i>A. aceti</i> e <i>M. luteus</i> a partir da densidade óptica amostrada durante o bioprocesso.	43
Figura 13 - Valores de OD na fase inicial e final do bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas de <i>A. aceti</i> e <i>M. luteus</i>	44
Figura 14 - Valores de DBO na fase inicial e final do bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas de <i>A. aceti</i> e <i>M. luteus</i>	44
Figura 15 - Valores de DQO na fase inicial e final do bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas de <i>A. aceti</i> e <i>M. luteus</i>	45
Figura 16 (A, B, C, D, E e F) - Ilustra respectivamente a redução das concentrações de alumínio, ferro, manganês, chumbo, níquel e cobre.	49
Figura 17 – Quantidade de redução de íon sulfato para as duas linhagens bacterianas.	52
Figura 18 - Redução assimilativa e desassimilativa do sulfato.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias envolvidas na formação da DAM e suas condições de desenvolvimento	18
Tabela 2 - Linhagens bacterianas utilizadas	32
Tabela 3 - Meio de crescimento do <i>Micrococcus luteus</i>	33
Tabela 4 - Meio de crescimento e manutenção para o <i>Acetobacter aceti</i>	33
Tabela 5 - SMEWW: Abreviatura de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21 ^a Edição/2005.	36
Tabela 6 - Valores dos principais metais na DAM suplementada e com pH ajustado e DAM sem suplementação	37
Tabela 7- Valores de pH e potencial redox durante o bioprocesso	40
Tabela 8 - Valores de absorbância de acordo com o tempo de cultivo das linhagens de <i>A. aceti</i> e <i>M. luteus</i> em comprimento de onda de 600 _{nm}	42
Tabela 9 - Valores das médias das análises iniciais da DAM suplementada para pH, metais e sulfato	46
Tabela 10 - Valores comparativos das médias das análises da DAM suplementada antes e após o bioprocesso para cada bactéria	47
Tabela 11- Biossorventes empregados na remoção de metais pesados reportados pela literatura em função de alguns parâmetros de operação	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

σ	- Desvio padrão
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Celsius
Al	- Alumínio
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- <i>Brain Heart infusion Agar</i>
Cd	- Cádmio
CO_2	- Óxido de Carbono
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu	- Cobre
DAM	- Drenagem ácida de Minas
Eh	- Potencial redox
$\text{Fe}(\text{OH})_3$	- Hidróxido férrico
Fe	- Ferro
Fe^{2+}	- Íon ferroso
Fe^{3+}	- Íon férrico
FeS_2	- Pirita
g/cm^3	- Gramas por centímetro cúbico.
H^+	- Íon hidrogênio
H_2O	- Água
H_2SO_4	- Ácido sulfúrico
Hs	- Horas
K	- Potássio
Mg	- Magnésio
mg/L	- Miligramas por litro
mL	- Mililitros
Mn	- Manganês
mV	- Milivolts
Nº	- Número
NaOH	- Hidróxido de sódio
Ni	- Níquel
nm	- Nanômetros
O_2	- Oxigênio

OD	- Oxigênio Dissolvido
P	- Fósforo
Pb	- Chumbo
pH	- Potencial hidrogeniônico
Si	- Silício
SO ₄ ⁻²	- Íon sulfato
UFC	- Unidades formadoras de colônias
Zn	- Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1. Drenagem ácida de mina (DAM).....	15
3.1.1 Reações de geração de DAM por oxidação da pirita	15
3.1.2 Atuação microbiológica	17
3.1.3 Parâmetros de controle de drenagem ácida de mina	19
3.2 Metais dissolvidos	20
3.3 Sulfato	24
3.4 Biorremediação	25
3.4.1 Conceitos envolvidos na biorremediação.....	26
3.4.1.1 Ação dos microrganismos	26
3.4.1.2 Microrganismos	27
3.4.1.2.1 Micrococcus luteus	27
3.4.1.2.2 Acetobacter aceti.....	27
3.4.1.3 Biossorção	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Materiais	30
4.1.1 Equipamentos:.....	30
4.1.2 Rejeitos.....	30
4.1.3 Reagentes	31
4.2 Experimento	31
4.2.1 Preparação da drenagem ácida de mina	31
4.2.2 Montagem da coluna	31
4.2.3 Preparação do meio de crescimento e manutenção para os microrganismos.....	32
4.2.3.1 Reativação das linhagens bacterianas liofilizadas	33
4.2.4 Suplementação do meio e ajuste do pH	33
4.2.5 Inoculação e incubação	34
4.2.6 Realização das análises	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

5.1 Estudos preliminares	37
5.2 Relação entre pH e Potencial Redox (Eh).....	40
5.3 Curva do crescimento microbiano	41
5.4 Oxigênio Dissolvido, Demanda Bioquímica de Oxigênio e Demanda Química de Oxigênio	43
5.4.1 Oxigênio Dissolvido.....	43
5.4.2 DBO e DQO	44
5.5 Metais dissolvidos e sulfato	45
6. CONCLUSÃO.....	55
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas ambientais associados à extração de carvão mineral no Brasil é a ocorrência da Drenagem Ácida de Mina (DAM). A poluição do meio ambiente com metais pesados tóxicos está se espalhando pelo mundo, juntamente com o progresso industrial. A drenagem ácida na mineração de carvão se inicia quando materiais contendo altas concentrações de pirita (FeS_2) são expostos ao oxigênio atmosférico e a água durante o processo de mineração. Neste processo podem existir catalisadores biológicos, tais como bactérias acidófilas (RUBIO e SILVA, 2009; McCAULEY et al., 2009; LUPTAKOVA e KUSNIEROVA, 2005).

A ocorrência de DAM tem sido relatada na extração de ouro, carvão, cobre, zinco ou urânio. A disposição adequada dos resíduos destas minerações evita que sejam expostos às condições oxidantes na presença de água, sendo fundamental para a prevenção e minimização da DAM (SOARES e TRINDADE, 2003). Os maiores problemas ambientais associados à mineração de carvão são: a diminuição da biodiversidade, a redução de áreas de florestas, a erosão do solo, o carreamento de resíduos, o assoreamento dos cursos de água e o transporte de contaminantes (MACHADO, 2007).

Sendo um dos problemas mais sérios enfrentados pela mineração de carvão, a DAM quando não tratada causa grande impacto ao meio ambiente, principalmente sobre os recursos naturais das águas. Em muitos casos, praticamente toda a vida aquática desaparece. O fundo da água de reservatórios torna-se revestido com uma camada de ferrugem e pH baixo (RODRÍGUEZ et al., 2009).

A crescente conscientização e preocupação com o meio ambiente tem motivado nos últimos anos uma extensa pesquisa sobre o desenvolvimento de novas tecnologias eficientes para o tratamento da DAM. Nos Estados Unidos quase 1000 mil dólares é gasto por dia em prevenção e redução de DAM por empresas de mineração. Um estudo realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA estimou o custo da reparação dos danos por tecnologias de tratamento convencional para mais de US \$ 5 bilhões no estado da Pensilvânia (SHEORAN, et al., 2010).

Existem muitos estudos no intuito de remediar a geração de DAM, pelo grande impacto ambiental da metalurgia extrativista. Atualmente, entre os métodos mais comuns para o tratamento de DAM, estão os métodos químicos, por exemplo, a neutralização com cal ou outros componentes alcalinos (LUPTAKOVA e KUSNIEROVA, 2005).

Há outros meios para o tratamento de efluentes ricos em contaminantes metálicos, tais como troca iônica, adsorção, precipitação química, oxidação, redução e osmose reversa. No entanto, muitas destas abordagens podem ser menos rentáveis ou de difícil uso prático. Uma vez que, à procura de um adsorvente de baixo custo e facilmente disponível levou à investigação de materiais de origem agrícola e biológica. Estes materiais biológicos são conhecidos por seu potencial de adsorver metais pesados. Biossorção de metais pesados é uma das tecnologias mais promissoras envolvidos na remoção de metais tóxicos de fluxos de resíduos industriais e tem recebido uma grande atenção nos últimos anos, não só como uma novidade científica, mas também para sua potencial aplicação na indústria (BUENO et al., 2008).

A biorremediação está se tornando uma alternativa viável e promissora ao tratamento de efluentes contaminados e solos impactados. Nesse processo os microrganismos são selecionados e cultivados em laboratório e, posteriormente inoculados em contaminantes. Os metais precipitados por ação bacteriana podem ser recuperados e reciclados.

Com isso, este trabalho se propõe estudar a possibilidade de utilização de linhagens bacterianas padrão no tratamento de líquidos de escoamento provenientes do beneficiamento do carvão. Os resultados, as discussões e as conclusões aqui contidos disponibilizam informações úteis para realização de trabalhos de pesquisa que abordam os aspectos da biorremediação e a aplicação dessa tecnologia em tratamento de efluentes.

O vínculo financeiro deste trabalho fez parte do projeto intitulado “Seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes a partir de efluentes de mineração e sua aplicação em processos de biorremediação,” Nº 550233/2010-5 MCT/CNPq/Vale/CT-Mineral, sob a coordenação do prof. Dr. Delmar Bizani.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o crescimento microbiano no bioprocesso e parâmetros físico-químicos relevantes, bem como a otimização experimental de um sistema de recuperação de águas comprometidas com líquidos de escoamentos provenientes do beneficiamento do carvão através do uso de linhagens bacterianas com capacidade redutora.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos compreendidos são:

1. Caracterizar a drenagem ácida de mineração produzida em laboratório;
2. Estudar a cinética de comportamento microbiano no bioprocesso, com águas de drenagem ácida, através do acompanhamento individual da curva de crescimento, utilizando as linhagens bacterianas padrão: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *Acetobacter aceti* ATCC 15973, e;
3. Avaliar a atividade redutora de sulfato e de alguns metais pesados presentes na DAM suplementada com lactado de sódio e submetida ao bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Drenagem ácida de mina (DAM)

A mineração de carvão promove a exposição de grandes volumes de pirita em seu processo de lavra e beneficiamento, com isso, gera rejeitos depositados em pilhas ou barragens. Esses depósitos, ricos em sulfetos, podem se tornar graves fontes geradoras de águas ácidas rica em metais dissolvidos (SILVA, 2010).

As DAMs são geradas quando minerais sulfetados presentes em resíduos de mineração (rejeito ou estéril) oxidam naturalmente em presença de água e oxigênio. Esta solução ácida age como agente lixiviante dos minerais presentes no resíduo, produzindo um percolado rico em metais dissolvidos e íons sulfato (SOARES e TRINDADE, 2003).

O problema específico associado com metais pesados no ambiente é a sua acumulação na cadeia alimentar e sua persistência na natureza (BUENO et al., 2008). Estudos da DAM em um local da Nova Zelândia representaram que mais de 98% dos metais presentes eram compostos de Fe e Al (McCAULEY et al., 2009).

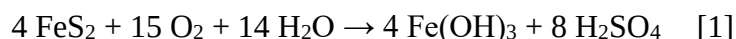
No Brasil, uns dos grandes problemas ambientais é a geração de DAM a partir da mineração de carvão. Em torno de 5000 ha de áreas estão contaminadas pela atividade da mineração de carvão na região carbonífera Catarinense, estando 2/3 dos cursos das águas contaminadas pelos líquidos de escoamento da mineração local (GALATTO et al., 2007).

As fontes comuns de DAM são minas subterrâneas, minas a céu aberto, pilhas de estéril e descoberturas geradas durante a mineração, rejeitos de processamento mineral e pilhas temporárias ou permanentes de concentrados sulfetados (principalmente que possuem pirita), as quais não possuem valor comercial sob as condições econômicas correntes. Essas fontes podem permanecer ativas por décadas ou séculos após o fechamento da mina (KONTOPOULOS, 1998).

3.1.1 Reações de geração de DAM por oxidação da pirita

A pirita é a maior fonte geradora de DAM em áreas de disposição de rejeitos de mineração de carvão. Ela é estável, desde que não entre em contato com água e oxigênio. Porém, na mineração ela é exposta em contato com a água e o ar. Segundo Kontopoulos

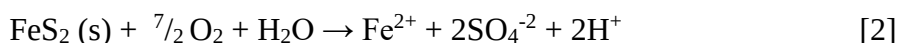
(1998) o processo de geração de DAM pode ser representado de forma simplificada pela equação:



Segundo Kleinmann et al. (1981) a oxidação da pirita é um processo de uma série de reações, envolvendo processos químicos e biológicos. Fagundes (2005) salienta que a drenagem ácida de mina pode ser descrita em quatro reações básicas que, por sua vez, são agrupadas em três estágios. As reações químicas associadas a estes estágios estão representadas nas equações abaixo e ilustradas na Figura 1.

Estágios I e II:

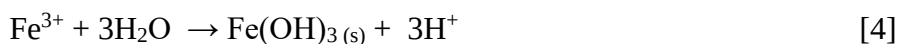
Oxidação da pirita pelo oxigênio atmosférico (oxidação direta):



Oxidação do Fe^{2+} ao Fe^{3+} :

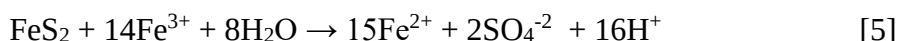


Precipitação do Fe(OH)_3 :



Estágio III:

Oxidação da pirita pelo Fe^{3+} (oxidação indireta):



Conforme apresentado na Figura 1, nos estágios I e II as reações ocorrem basicamente em ambiente com o pH em torno de 4,5 e em velocidade baixa. A oxidação da pirita ocorre abioticamente. A primeira reação descreve a oxidação do sulfeto mineral (pirita), gerando os produtos da dissociação do ácido sulfúrico e, conseqüentemente, elevando a acidez do meio. E se o seu potencial de oxidação for mantido, a oxidação do íon Fe^{2+} para o Fe^{3+} ocorrerá, consumindo parte da acidez da pirita pelos íons H^+ , ou seja, esta redução dos valores de pH favorece as reações (3) e (4). A oxidação dos íons Fe^{2+} a Fe^{3+} é apresentado na reação (3) e ocorre em pH mais ácido. À medida que a acidez for mantida próxima ou maior que pH 4,5, o íon férrico Fe^{3+} , produzido pela reação (3), se precipitará na forma de hidróxido de ferro, conforme a reação (4) (FAGUNDES, 2005; MACHADO, 2007).



Figura 1- Estágios de formação de drenagem ácida.
Fonte: Adaptado de FAGUNDES, 2005.

O estágio III ocorre em valores de pH inferiores a 3,5. Neste caso, o íon Fe^{3+} , ao invés de precipitar, permanece em solução e oxida diretamente a pirita, como representa a reação (5). Nesta reação há geração de íons de hidrogênio e sulfato, o que intensifica a acidificação do meio. Além disso, a redução do pH contribui para a reprodução de bactérias acidófilas, normalmente dos gêneros *Thiobacillus* e *Acidithiobacillus*, as quais aceleram a transformação de Fe^{2+} a Fe^{3+} (reação 3). Sendo assim, fica estabelecido rapidamente um ciclo entre as reações (2) e (5) que só terminará com o consumo total da pirita. O pH baixo da água também aumenta a solubilização dos metais (FAGUNDES, 2005; MACHADO, 2007).

Em pH inferior a 2 o processo ocorre praticamente controlado pelo mecanismo indireto. A oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} ocorre totalmente por via ação bacteriana. O resultado do estágio III é a produção de uma água ácida com pH inferior a 2,5 e rica em concentrações de sulfato, ferro total, e metais dissolvidos (MACHADO, 2007).

3.1.2 Atuação microbiológica

A existência de bactérias no processo de oxidação da pirita foi descoberta em 1957. Algumas das principais bactérias envolvidas nas reações de oxidação e suas respectivas condições ambientais favoráveis estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Bactérias envolvidas na formação da DAM e suas condições de desenvolvimento

Microrganismo	pH	Temperatura °C	Nutrição
<i>Thiobacillus thioparus</i>	4,5 - 10	10 – 37	Autotrófica
<i>T. ferrooxidans</i>	0,5 - 6,0	15 – 25	Autotrófica
<i>T. thioxidans</i>	0,5 - 6,0	10 – 37	Autotrófica
<i>T. neopolitanus</i>	3,0 - 8,5	8 – 37	Autotrófica
<i>T. denitrificans</i>	4,0 - 9,5	10 – 37	Autotrófica
<i>T. novellus</i>	5,0 - 9,2	25 – 35	Autotrófica
<i>T. intermedius</i>	1,9 - 7,0	25 – 35	Autotrófica
<i>T. perometabolis</i>	2,8 - 6,8	25 – 35	Autotrófica
<i>Sulfolobus acidocalderius</i>	2,0 - 5,0	55 – 85	Autotrófica
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	5,0 - 9,0	10 – 45	Heterotrófica

Fonte: Adaptado de FAGUNDES, 2005.

De acordo com a Tabela 1, podemos observar que as bactérias do gênero *Thiobacillus* são os principais microrganismos envolvidos na formação da DAM. Dentre elas, a de maior interesse é a *T. ferrooxidans*, esta oxida sulfetos a sulfato e gera ácido sulfúrico, atuando na produção de águas ácidas de minas. Ainda atua como catalisadora em ambientes ácidos, ou seja, pode acelerar substancialmente a taxa de oxidação de sulfato e de íons Fe^{2+} a Fe^{3+} , conforme a reação 3.2. Esta reação é considerada o principal passo da oxidação da pirita (FAGUNDES, 2005).

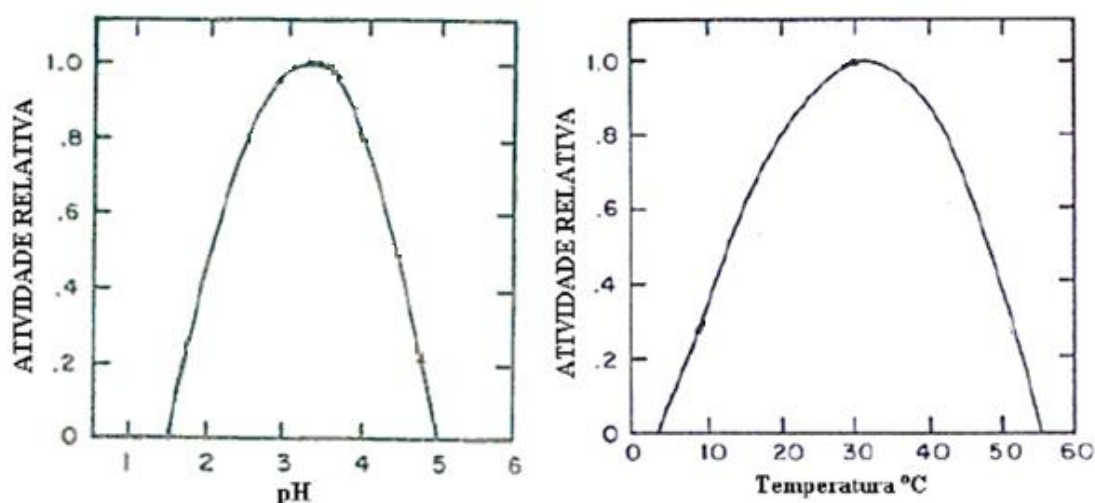


Figura 2 - Influência do pH e da temperatura na atividade relativa da *T. ferrooxidans*.

Fonte: (Adaptado de FAGUNDES, 2005).

De acordo com a Figura 2, percebe-se que por serem bactérias acidófilas são mais ativas em pH na faixa de 3,0 e a faixa de temperatura de maior prosperidade é em torno de 30°C (EVANGELOU, 1995).

A *Thiobacillus Ferrooxidans* pode reagir com os minerais sulfetados de duas formas distintas: direta ou indireta. Na forma direta as bactérias utilizam enzimas para atacar os materiais oxidáveis, através do contato físico entre ambos, obtendo energia da troca de elétrons entre o elemento oxidado (Fe^{2+} ou S) e o oxidante (O_2). Estes elétrons são transportados através de proteínas na membrana das células, e esta transferência de elétrons fornece energia que é, então, associada à formação de trifosfato adenosina (ATP), responsável pela circulação de energia da célula. Na forma indireta não há, reações enzimáticas, e o agente de lixiviação é unicamente gerado pelo organismo. Por exemplo, os sulfetos metálicos podem se oxidar quimicamente a sulfatos por meio do sulfato férrico. A bactéria gera Fe^{3+} por solubilização oxidante do Fe^{2+} (reação 3.2). O Fe^{3+} , poderoso oxidante, reage com outros metais, tornando-se solúvel, e nesta reação o Fe^{2+} é oxidado novamente (FAGUNDES, 2005; MARTINS et al., 2004a).

3.1.3 Parâmetros de controle de drenagem ácida de mina

No lixiviado da DAM proveniente da mineração de carvão, Machado (2007) verificou a ocorrência de alguns parâmetros considerados importantes e que devem ser analisados, tais como: pH, potencial redox, acidez, alcalinidade, condutividade e sulfato, além de alguns metais. Segue abaixo uma breve descrição das características deste líquido:

1. pH: O produto do processo de lixiviação dos rejeitos modifica o pH natural dos corpos d'água, geralmente compreendidos entre 4,5 e 8,5, para valores aproximadamente de 2,0 e 3,0. O rebaixamento do pH da água e os elevados níveis de sulfato e metais são as consequências das drenagens dos efluentes dos lavadores de carvão e da disposição dos rejeitos. Os baixos valores de pH das águas na mineração de carvão liberam elementos tóxicos que ficam dissolvidos, colocando muitos seres vivos em risco.

2. Potencial redox: é empregado para descrever a tendência de uma substância de reagir com outra, adicionalmente às constantes de equilíbrio e à energia livre, sendo utilizado somente para processos envolvendo reações de oxidação ou redução. A reatividade e mobilidade de elementos dependem da condição de oxi-redução do meio, sendo possível utilizar os potenciais de oxidação para abordar as reações químicas envolvidas em um meio

aquoso. Por exemplo, o enxofre dissolvido, pode apresentar-se na forma sulfato em condições oxidantes ou na forma ácido sulfídrico em condições redutoras. Segundo a equação de *Nernst* quanto maior for o pH, mais baixo será o potencial redox, e vice-versa.

3. Acidez: em termos quantitativos é a capacidade do meio aquoso reagir com íons hidroxila (OH^-). A água resultante da lixiviação de rejeitos piritosos é caracterizada pela alta quantidade de metais dissolvidos e baixo pH.

4. Alcalinidade: é a capacidade de neutralizar H^+ . Embora toda água tenha alguma alcalinidade, águas muito ácidas, exceto em caso de poluição severa, não são encontradas com frequência na natureza. No caso das drenagens ácidas de minas toda a alcalinidade da água foi consumida.

5. Sulfato: é proveniente fundamentalmente da oxidação da pirita. Os íons sulfato, nas águas de abastecimento público, devem ser controlados, pois quando presentes em quantidades elevadas possuem efeito laxativo. Quando presentes em águas residuárias são responsáveis, indiretamente, por problemas de odor e corrosão, devido à formação de gás sulfídrico, pela sua redução por bactérias em condições anaeróbicas.

A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 430, 2011) estabelece os parâmetros para lançamentos de efluentes para o corpo receptor. Esta resolução estabelece que o valor do pH para o lançamento de efluentes no corpo receptor, deve situar-se entre 5 a 9 unidades.

3.2 Metais dissolvidos

Os graves problemas ambientais gerados pelo aumento considerável dos descartes de efluentes industriais contaminados com metais pesados nos rios e mares, aliados às exigências das leis ambientais, estimulam as pesquisas nesta área, visando à obtenção de métodos alternativos de baixo custo e de maior eficiência no tratamento de águas e despejos (AGUIAR et al., 2002). Os metais pesados podem ser encontrados em todos os compartimentos do ecossistema, nunca se esgotam e sempre existiram no planeta. São oriundos de fontes naturais e/ou antrópicas como intemperismo de rochas, deposição atmosférica, lançamentos de efluentes urbanos, industriais e agrícolas, além da lixiviação de resíduos contaminados, sendo a mineração e a purificação de minérios dois dos grandes causadores da sua disseminação mundial (PASCALICCHIO, 2002).

Remoção dos excessos de íons de metais pesados em efluentes é essencial devido à sua extrema toxicidade para a vida aquática e os seres humanos. Íons metálicos de águas residuais são normalmente removidos por precipitação química, troca iônica e processos de osmose reversa. Estes métodos têm algumas desvantagens, tais como remoção de íons metálicos não desejáveis, uso de altas concentrações de reagentes, e a geração de lamas tóxicas que são muitas vezes difíceis de serem eliminadas e necessitam de extremo cuidado em sua disposição (KAPOOR et al., 1999). Há uma necessidade de tecnologias inovadoras de tratamento para a remoção destes metais. No mais os microrganismos deveriam ser mais bem estudados quanto à remoção de metais pesados em soluções aquosas, o que segundo os mesmos autores a remoção microbiana dos íons metálicos catiônicos é mais eficaz quando as concentrações de metais variam cerca de 1 a 20 mg/l.

Segundo Campos (2010), metais pesado são os elementos que apresentam massa específica maior que 6 g.cm^{-3} ou possuem número atômico maior que 20. Neste grupo encontram-se os íons metálicos Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn, alguns semi-metais e outros ametais como As e Se. Estes elementos normalmente estão associados à poluição, à contaminação e à toxidez dos seres vivos, incluindo alguns elementos essenciais (Ni, Zn e Cu) aos seres vivos, quando em concentrações adequadas.

Altas quantidades de metais dissolvidos é uma das principais características da drenagem ácida de mina. Normalmente encontramos concentrações consideráveis de alumínio, manganês e zinco, mas o elemento componente majoritário é o ferro, independente do local de geração. A concentração dos outros metais depende da composição do material associado à pirita (SILVA, 2010).

As ações antrópicas são responsáveis por adições de até 1,16 milhões de toneladas de metais por ano em ecossistemas terrestres e aquáticos no mundo todo. Porém, os metais pesados estão presentes naturalmente no meio ambiente, mesmo que não haja ação antrópica, o aumento em sua concentração pode ocorrer tanto por processos naturais quanto por atividades humanas. O intemperismo e a lixiviação do solo são exemplos de processos naturais que geram o aparecimento de metais pesados na água e no solo, todavia a extração e o beneficiamento de metais, rejeitos industriais, efluentes domésticos, insumos agrícolas, descarte de produtos comerciais, queima de combustíveis fósseis e descarte de lodo de esgoto são atividades antrópicas associadas à contaminação do meio ambiente por tais metais (MUNIZ et al., 2006).

Na lixiviação de metais pesados, o processo de oxidação de minerais sulfetados provoca o rebaixamento dos valores de pH. Nessas condições, metais pesados como o ferro,

cobre, zinco, cádmio, manganês, entre outros, presentes nas rochas e/ou minerais, são solubilizados, conforme a Figura 3. Neste tipo de ambiente é comum encontrar concentrações bem acima dos normalmente aceitos pela legislação (FAGUNDES, 2005).

Conforme aumenta a percolação da água no depósito mineral, a situação vai se agravando. A qualidade da água é determinada por fatores como a natureza dos sulfetos, a disponibilidade e tipo dos constituintes solúveis, o regime hídrico, a natureza dos reagentes alcalinos e as propriedades físicas dos resíduos (FAGUNDES, 2005).

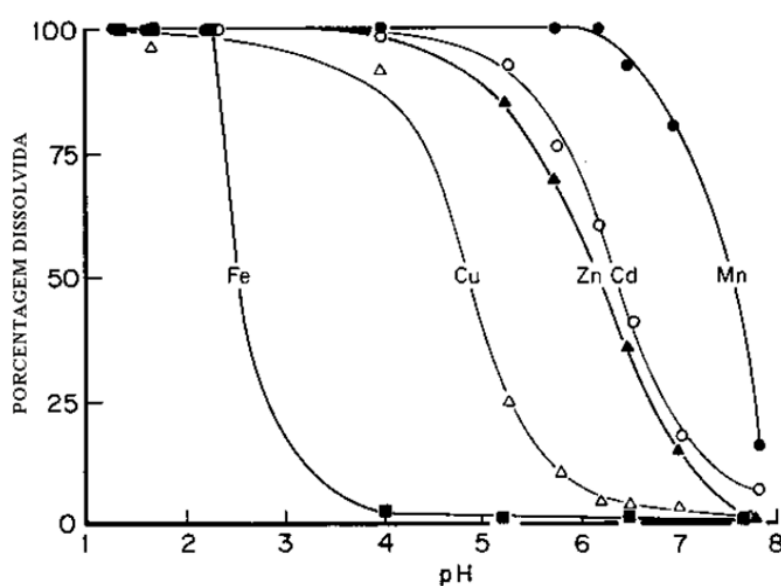


Figura 3 - Comportamento de alguns metais pesados em função do pH.

Fonte: Adaptado de FAGUNDES, 2005.

Os efeitos do pH, potencial redox (Eh), características de adsorção e a composição química do percolado influenciam na solubilização dos metais pesados (FAGUNDES, 2005).

A Figura 4 ilustra a relação entre Eh e pH na solubilidade de metais.

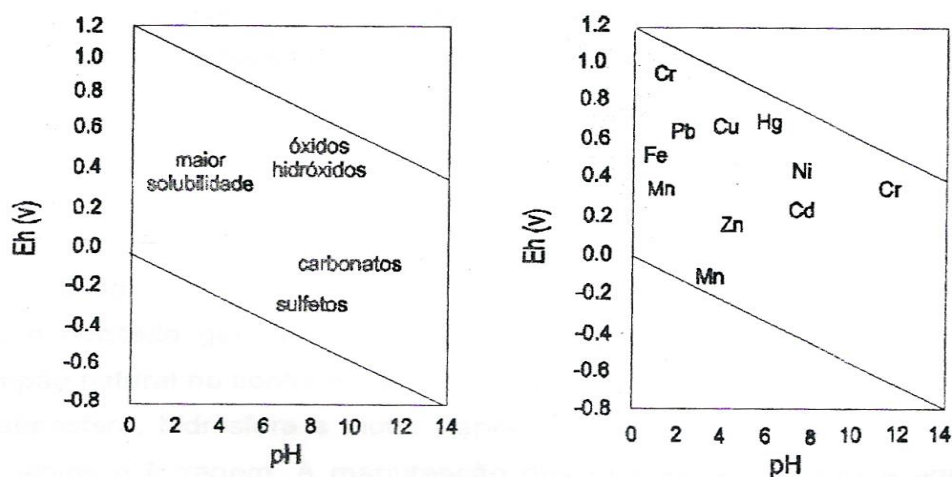


Figura 4 - Solubilidade de acordo com pH e Eh.

Fonte: Adaptado de Salomons, 1995.

Dentre alguns dos metais com ampla utilização na indústria e causadores de impactos ambientais, temos: cobre, chumbo e cromo. Cobre não é tóxico para os seres humanos com precisão, mas seu uso extensivo aumenta os níveis no ambiente podendo causar sérios problemas de saúde. O chumbo é um veneno altamente tóxico e cumulativo, pode danificar o sistema nervoso central e periférico, rins e sistema reprodutivo, particularmente em crianças. O chumbo pode contaminar o meio ambiente a partir de fontes antropogênicas, bem como processos geoquímicos naturais, este metal é amplamente utilizado em muitas aplicações industriais importantes, tais como, produção de pigmentos de impressão, combustíveis, materiais fotográficos, fabricação de explosivos, revestimento, automotiva, aeronáutica e siderurgia (BUENO et al., 2008). Porém, o chumbo é pouco absorvido, sendo considerado praticamente inócuo, no entanto, alguns dos seus sais solúveis, como o cloreto, nitrato e acetato são venenos ativos (LEMOS, 2008).

O cromo no estado III é altamente solúvel em água e cancerígeno para o ser humano (CONGEEVARAM et al., 2007), podendo ser liberado no meio ambiente por um grande número de processos, tais como, galvanoplastia, curtimento de couro, conservação de madeira, processamento de celulose, fabricação de aço, material fotográfico, tintas corrosivas, etc. (BUENO et al., 2008).

Segundo Machado (2007) há alguns metais de grande presença e importância em DAM, como:

Ferro: é o principal metal presente na DAM, originado diretamente da oxidação da pirita. Pode estar presente na forma de Fe^{2+} e/ou Fe^{3+} . O Fe^{3+} é um forte oxidante, e como tal,

provoca a dissolução de vários minerais. A hidrólise do ferro permite a precipitação do hidróxido de ferro na forma de um lodo alaranjado que cobre a superfície do substrato.

Alumínio: esta entre os metais com valores de concentrações consideráveis na DAM. Em concentração acima de 0,5 g/L, em efluente com pH abaixo de 5,5, pode ser tóxico a peixes e macroinvertebrados.

Manganês: ocorre principalmente na forma de dióxido de manganês, o qual é muito insolúvel em água contendo CO_2 . Em condições redutoras, o óxido de manganês é reduzido do estado Mn^{4+} para Mn^{2+} .

Zinco: presente em concentrações menores que o ferro e alumínio nas DAM de minas de carvão. Tem facilidade de formar compostos de baixa solubilidade, como hidróxidos, carbonatos e sulfetos. A água com alta concentração de zinco tem uma aparência leitosa e produz um sabor metálico ou adstringente quando aquecida. O zinco, por ser um elemento essencial para o ser humano, só se torna prejudicial à saúde quando ingerido em concentrações muito elevadas. Neste caso, pode-se acumular em outros tecidos do organismo.

Segundo CONAMA (430/2011) os padrões para lançamento de efluentes são: ferro 15 mg/L, níquel 2,0 mg/L, manganês 1,0 mg/L e zinco 5,0 mg/L.

3.3 Sulfato

Os íons sulfato são encontrados em mananciais hídricos, na forma de sais de sódio e cálcio, e principalmente, em efluentes de atividades industriais, como a mineração. Na indústria mineira, efluentes com elevadas concentrações de íons sulfato são descartados na forma de águas residuais (águas excedentes) após o processamento de minérios como: Barita (BaSO_4), Epsomita ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Gipsita ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfetos minerais (cobre, ferro e molibdênio, principalmente), e o carvão. Esses íons apresentam problemas (entre outros) de saúde (distúrbios gastrointestinais), de corrosão e de acidificação de solos (SILVA e RUBIO, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde (2004), o limite de concentrações dos ânions de sulfato em águas para abastecimento público é padronizado em 250 mg.L^{-1} , mas não é listado entre os elementos com padrões de emissão de efluentes industriais ou urbanos, definidos no Brasil. Sendo que no tratamento de DAM, as concentrações de íons sulfato ocorrem entre 600 a 15.000 mg.L^{-1} . Porém, este fato pode ser atribuído às dificuldades técnico-econômicas que envolvem sua remoção, pela falta de limites legais de emissão de efluentes e pelos menores riscos ambientais e de toxicidade quando comparado a parâmetros como acidez e íons

metálicos. Em elevada concentração na água, o sulfato pode causar gosto amargo e provocar diarreia e desidratação tanto ao homem quanto a animais. Problemas de corrosão em encanamentos também estão relacionados aos altos níveis de sulfatos na água (SILVA e RUBIO, 2011).

Vários processos podem ser utilizados para o tratamento de efluentes contendo sulfatos dissolvidos. Precipitação química, redução biológica (GHIGLIAZZA et al., 2000; TYRRELL et al., 1997; HEAL e SALT, 1999), processos de troca iônica, adsorção (BORGES, 2002; KAMEDA et al., 2003), osmose reversa e outros processos com membranas são algumas alternativas estudadas.

3.4 Biorremediação

É a técnica de remediação que utiliza organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismo, na degradação, redução, eliminação e/ou transformação de poluentes presentes em solos, sedimentos e água (GAYLARDE et al., 2005). O processo consiste na utilização de carbono orgânico como fonte de alimentação para os microrganismos, convertendo os contaminantes em CO₂ e H₂O, ou seja, por meio de um processo autotrófico. Este tipo de tratamento é considerado econômico, não poluente e não é uma fonte de resíduos secundários (BENAZIR et al, 2010).

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

3.4.1 Conceitos envolvidos na biorremediação

3.4.1.1 Ação dos microrganismos

A biorremediação é uma técnica baseada em processos, nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por microrganismos. Geralmente um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como aceptor final de elétrons quando presente e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular são chamados de respiração aeróbia heterotrófica. Há casos em que o oxigênio não está presente, assim os microrganismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (MARIANO, 2006).

O metabolismo dos microrganismos é bastante influenciado pela estrutura química dos poluentes orgânicos, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Há compostos orgânicos que são biodegradados rapidamente, como é o caso de hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e alcoóis. Porém, outros compostos são recalcitrantes (não biodegradáveis), como por exemplo, compostos xenobióticos (compostos químicos fabricados pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação. Normalmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (MARIANO, 2006).

O processo de biorremediação é um processo natural e, portanto, é vista como um processo aceitável de tratamento de resíduos de material contaminado. Geralmente, os resíduos do tratamento por microrganismos são produtos inofensivos, como o dióxido de carbono, água e biomassa celular (VIDALI, 2001).

Teoricamente é útil para a destruição completa de uma grande variedade de contaminantes. Muitos dos compostos que são legalmente considerados perigosos podem ser transformados em produtos não tóxicos ou menos tóxicos (VIDALI 2001).

Biorremediação, muitas vezes, podem ser realizadas no local, sem causar grandes transtornos nas atividades normais. Isso elimina a necessidade de transportar quantidades de resíduos fora do local e as ameaças potenciais para a saúde humana e o meio ambiente que podem ocorrer durante o transporte. Ela também pode ser economicamente viável

comparando com outras tecnologias usadas no tratamento de resíduos tóxicos (VIDALI, 2001).

Porém, a biorremediação está limitada a compostos que são biodegradáveis. Nem todos os compostos são susceptíveis de degradação rápida e completa. Os processos biológicos são muitas vezes altamente específicos e, muitas vezes, leva mais tempo do que outros tipos de tratamento (VIDALI, 2001).

3.4.1.2 Microrganismos

3.4.1.2.1 *Micrococcus luteus*

Bactérias em forma de cocos, geralmente organizadas em tétrades não apresentam espontaneidade de locomoção, mas possuem habilidade de direcionar-se para a obtenção de substrato, são gram-positivas e aeróbias. Produzem pigmento amarelo insolúvel em água. Este microrganismo é encontrado na pele humana, na água, no solo e na matéria orgânica. A prolongada fase estacionária deste organismo origina células em estado dormente (uma espécie de hipobiose), permitindo que sobreviva por muito tempo em ambientes extremos (ZERAUK, 2009).

O *M. luteus* possui habilidades incomuns para tolerar e usar moléculas orgânicas tóxicas como fonte de carbono. Este microrganismo é conhecido pelo seu potencial na biorremediação e na sua importância para a biotecnologia. Possui duas propriedades essenciais para o tratamento de resíduos tóxicos, a capacidade de degradar poluentes orgânicos tóxicos e sua tolerância com metais (SANDRIN, et al., 2003).

3.4.1.2.2 *Acetobacter aceti*

São bactérias que possuem como meio ideal de crescimento o caldo manitol ou ágar manitol. São gram-negativas e aeróbias. Mobilizam-se através de flagelos do tipo peritríquios (uniformemente distribuídos em volta de sua membrana celular) (EDBERG, 1992).

O *A. aceti* é um microrganismo benigno ubíquos no ambiente, existente em nichos ecológicos alcoólicos, tais como flores, frutos, abelhas produtoras de mel, bem como na água, no solo e na matéria orgânica e ainda em consórcio simbiótico com micro-invertebrados. Esta bactéria tem uma longa história de utilização na indústria fermenteira, para a produção de

ácido acético a partir de álcool. Não existem relatos na literatura tratando do *A. aceti* como um agente patogênico aos seres humanos ou animais. Também não é considerado um patógeno de plantas. Os riscos potenciais para a saúde humana ou para os ambientes associados à utilização desta bactéria em instalações de fermentação são baixos. Acetato e lactato são oxidados para CO₂ e H₂O como produto final pelo microrganismo (EDBERG, 1992).

3.4.1.3 Biossorção

O significado do termo “biossorção” é definido como um processo onde se utilize sólidos de origem vegetal ou microrganismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido. A biossorção é caracterizada por ser um processo com duas fases: a adsorção e a absorção. A primeira independente de energia e atividade metabólica e, a segunda, dependente de energia e metabolismo (DEL RIO, 2004).

Os microrganismos removem metais em soluções, o que segundo Silvas (2010), o fazem por diferentes mecanismos, os quais são esboçados nas Figuras 5 e 6 e citados abaixo:

- Acumulação extracelular/ precipitação;
- Sorção na superfície celular ou complexação;
- Acumulação intracelular.

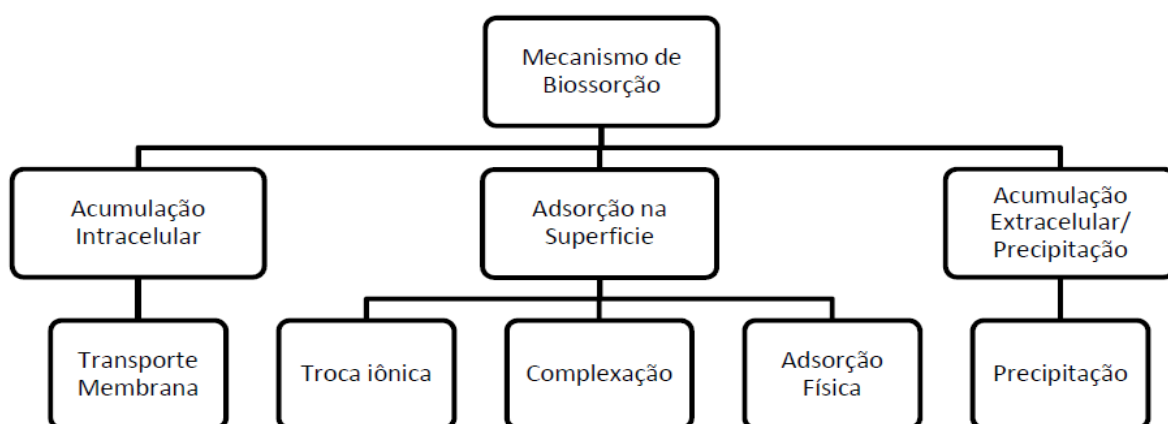


Figura 5 - Classificação do mecanismo de biossorção: sítio onde o metal é removido

Fonte: adaptado de SILVAS, 2010.

A biossorção de metais não é simplesmente baseada em um único mecanismo. Esta consiste de vários parâmetros que quantitativa e qualitativamente diferem de acordo com as espécies usadas, a origem da biomassa e seu processamento. A biossorção de metais segue mecanismos complexos, principalmente troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e o

aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e espaços de rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular e membranas (DEL RIO, 2004).

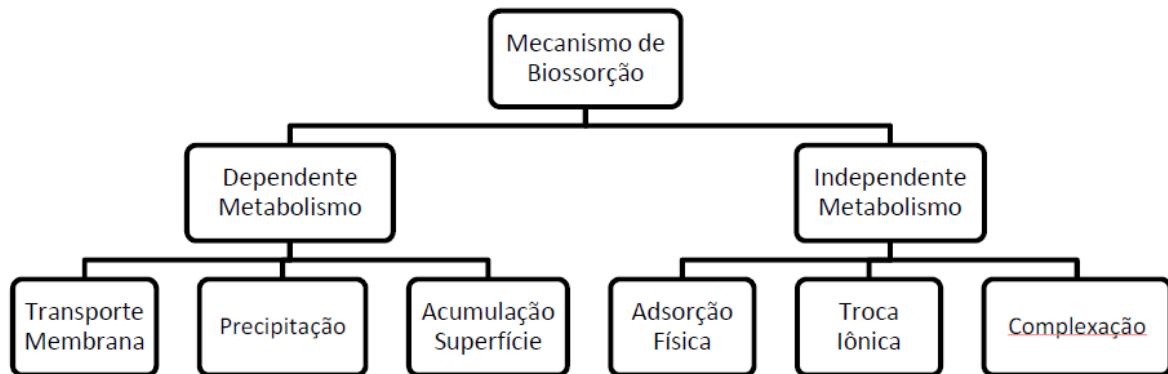


Figura 6 - Classificação do mecanismo de bioissorção: dependência do metabolismo celular
Fonte: adaptado de SILVAS, 2010.

A desvantagem do mecanismo de bioissorção dependente do metabolismo celular é a demora na resposta, pois é necessário um tempo para a reação do metal com o microrganismo (SILVAS, 2010).

Tanto células vivas ou mortas são capazes de acumular metais, podendo apresentar diferenças nos mecanismos envolvidos em cada caso, dependendo da extensão da dependência metabólica. A bioissorção depende de parâmetros, como pH, tipo de metal, concentração do íon, concentração de biomassa, volume e temperatura (DEL RIO, 2004)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados as etapas e os materiais empregados no desenvolvimento da pesquisa e a respectiva metodologia aplicada.

4.1 Materiais

Para a elaboração deste trabalho foram empregados rejeitos, equipamentos e reagentes, os quais serão listados na seguir:

4.1.1 Equipamentos:

1. Agitador magnético Fisaton, modelo 752;
2. Autoclave;
3. Balança eletrônica *Shimadzu*, modelo AX200;
4. Bécker de 50ml e 2L;
5. Bomba peristáltica;
6. Coluna de vidro;
7. Mangueira de silicone;
8. Espectrofotômetro marca *Gehaka*, modelo Uv/Vísivel – UV 380G;
9. Incubadoras Climatizadas marca *Quimis*, modelo Q315M;
10. Pipetas automáticas marca *Labmatte*;
11. pH metro digital *Digimed*, modelo DM-22.

4.1.2 Rejeitos

1. Rejeitos da mineração de carvão, rico em pirita, gentilmente cedidos pela empresa de mineração COPELMI Mineração Ltda¹.

¹ **Mina do Recreio**, BR 290, km 178, Butiá – RS, CEP 96750-000/ <http://www.copelmi.com.br>

4.1.3 Reagentes

1. Ágar;
2. Água deionizada/destilada;
3. D-Manitol; Extrato de carne;
4. Extrato de levedura;
5. Hidróxido de sódio;
6. Lactato de sódio;
7. Peptona bacteriológica.

4.2 Experimento

A parte experimental do trabalho foi dividida nas seguintes etapas: preparação da drenagem ácida de mina, montagem da coluna, estudos preliminares, preparação do meio de crescimento e manutenção para os microrganismos, suplementação do meio e ajuste do pH, inoculação e incubação, e realização das análises.

4.2.1 Preparação da drenagem ácida de mina

As amostras de drenagem ácida foram produzidas em laboratório, utilizando rejeitos de carvão, rico em pirita. A produção de água de drenagem foi realizada em uma coluna de vidro (0,5m X 0,1m X 0,1m) com a percolação direta de água.

Todo material utilizado no processo de geração desta drenagem ácida de mina foi esterilizado em autoclave por 121°C/10min.

4.2.2 Montagem da coluna

A coluna preenchida de pirita, conforme mostra a Figura 7, possui em sua base uma bomba peristáltica, para recirculação da água de lixiviação com o auxílio de uma mangueira de silicone. A recirculação da lixívia ou DAM permitiu um fluxo contínuo de 180 L/h durante o período aproximado de 2 dias.

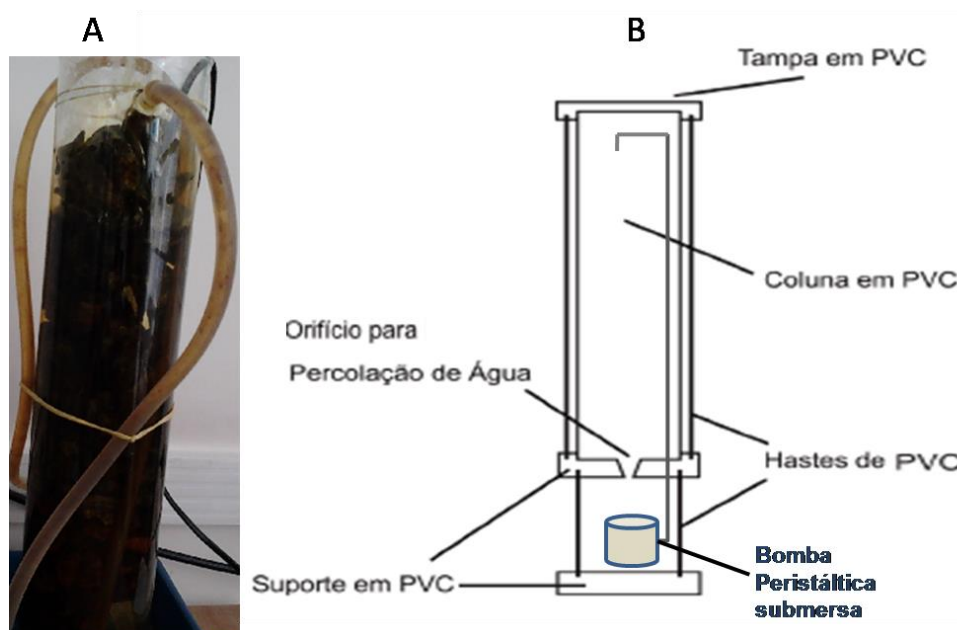


Figura 7- Produção de DAM em laboratório. A- Produção de DAM em coluna de vidro com aeração forçada; B- Esboço do sistema utilizado.

Fonte: Autoria própria, 2012.

4.2.3 Preparação do meio de crescimento e manutenção para os microrganismos

Para este estudo foram utilizadas duas linhagens bacterianas, as quais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens bacterianas utilizadas

Microrganismo	Referência	Lote
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	07.10
<i>Acetobacter aceti</i>	ATCC 15973	17.08

Fonte: Fundação André Tosello (2011)².

2. **Catálogo de linhagens**, Coleção de Cultura Tropical - CCT, Fundação André Tosello de Pesquisas e Tecnologia, 1ª. Ed., 1996.

4.2.3.1 Reativação das linhagens bacterianas liofilizadas

Todo material empregado foi estéril ou flambado. As ampolas eram limpas e desinfetadas com uma gaze (algodão) embebida em álcool 70%. Foi adicionado cerca de 0,2 mL de água destilada com o auxílio de uma pipeta automática estéril.

Para a suspensão das culturas procedeu-se a reidratação do liofilizado por aproximadamente, 10-15 minutos com 1,0 mL de solução fisiológica e em seguida seu conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de cultura líquido indicado para a espécie. Posteriormente as culturas foram incubadas conforme orientação para cada linhagem.

A partir da cultura crescida no caldo, foram feitas estrias de esgotamento em placa contendo o meio sólido recomendado para cada espécie padrão ATCC.

Para o crescimento das linhagens foram utilizados os meios específicos abaixo e autoclavados a 121° C a 1,5 atm por 10 min., para garantir esterilidade e pureza das culturas:

Tabela 3 - Meio de crescimento do *Micrococcus luteus*

Ingredientes	Quantidades
Extrato de carne	3,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Fonte: Fundação André Tosello (2011).

Tabela 4 - Meio de crescimento e manutenção para o *Acetobacter aceti*

Ingredientes	Quantidades
Extrato de levedura	5,0 g
Peptona bacteriológica	3,0 g
D-Manitol	25,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Fonte: Fundação André Tosello (2011).

4.2.4 Suplementação do meio e ajuste do pH

O meio líquido contendo DAM e uma suplementação de 0,6% de lactato de sódio ($C_3H_5O_3Na$), o qual funciona como solução *starter* do bioprocesso, foi ajustado a um valor de pH em torno de 6,5.

4.2.5 Inoculação e incubação

Após o crescimento das bactérias em meio sólido, estas foram inoculadas, em *erlenmeyer* de 125 ml, contendo seu respectivo meio líquido de crescimento. Em seguida quando as colunas de vidro foram preenchidas com o meio líquido (DAM) suplementado, foram então, adicionadas as cultura bacteriana em seu meio líquido de crescimento junto às colunas e assim mantido sobre agitação e aeração forçada em temperatura constante de 32°C.

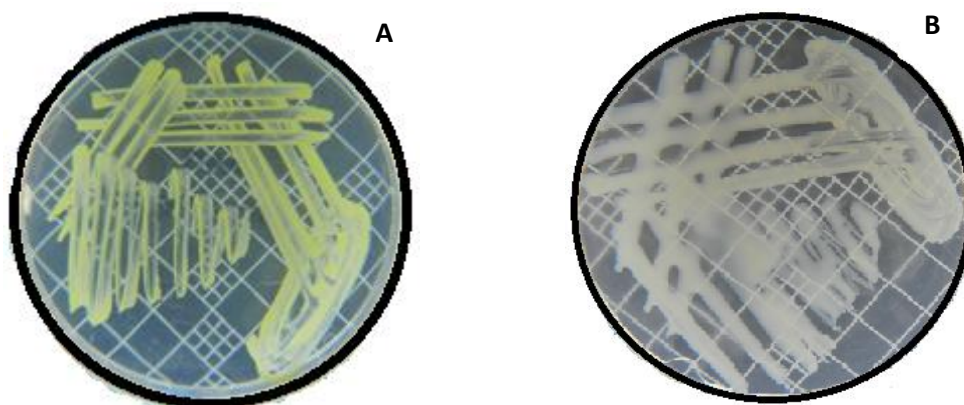


Figura 8 A e B – Fotografia através do aparelho contador de colônia da cultura de *M. luteus* em ágar nutriente (A) e cultura de *A. aceti* em Agar manitol (B), após incubação a 32°C/24hs. Fonte: Autoria própria, 2012.

Para a inoculação das linhagens de *A. aceti* e *M. luteus* foram cultivados separadamente em placas de *petri* contendo meio BHI³ (Figura 8). Destas placas foram retiradas, separadamente, amostras de colônias de ambas as linhagens bacterianas com auxílio de uma alça de platina e diluídas em 250 mL de água peptonada (ajustando-se a concentração bacteriana para aproximadamente 10^6 UFC mL⁻¹(unidades formadoras de colônias), através da determinação da absorbância em espectrofotômetro - Abs_{600nm}). Desse caldo obtido, 125 mL foram adicionadas às respectivas colunas do bioprocesso utilizados nos ensaios.

3 -Brain Heart Infusion Agar-Cód. M1406, 500 gr. HIMEDIA Laboratory - Manual of Medical Microbiology, Atlanta, Ga.: US. DHEW, 2012.



Figura 9 - Montagem do experimento antes do bioprocesso.
Fonte: Autoria própria, 2012.



Figura 10 - Experimento após o bioprocesso em estufa com aeração forçada, agitação e temperatura constante de 32°C.
Fonte: Autoria própria, 2012.

4.2.6 Realização das análises

O acompanhamento do bioprocesso foi feito diariamente pela retirada de uma alíquota em torno de 1 mL por coluna, e analisadas em espectrofotômetro (A_{600nm}) com a finalidade de

determinar o comportamento biológico das linhagens e estabelecer uma curva de comportamento bacteriano.

As análises em solução da drenagem ácida de mina foram realizadas em duas oportunidades:

Na etapa inicial do processo foram analisadas amostras para a determinação dos parâmetros característicos do meio ao qual foi submetido o bioprocessamento. Na segunda etapa foram realizadas análises dos líquidos após o bioprocessamento com a finalidade de investigar a capacidade redutora das linhagens testadas.

As análises foram realizadas segundo as recomendações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 21ª Edição/2005, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - SMEWW: Abreviatura de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21ª Edição/2005.

Parâmetro	Método	Laboratório
DBO	SMEWW 5210 B: Incubação/Titulometria	Alac
DQO	SMEWW 5220 B: Refluxo aberto	Alac
Oxigênio dissolvido	SMEWW 4500 C	Alac
Sulfato	SMEWW 4500-SO42- E: Turbidimetria	Laborquímica
Metais	SMEWW 3030 C,D,E,F: Tratamento da amostra e SMEWW 3120 B: ICP.	Laborquímica e <i>Fundació CTM Centre Tecnològic</i>
pH e Potencial Redox	Eletrométrico	Laboratório Unilasalle
Absorbância	Espectrofotométrico	Laboratório Unilasalle

Fonte: SMEWW, 2005.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos preliminares

Estudos preliminares foram realizados para verificar possíveis alterações entre as características da DAM gerada com suplementação de lactato de sódio e pH ajustado com hidróxido de sódio, e a DAM normal (sem modificações). Sendo assim, a Tabela 6 mostra uma comparação dos valores dos principais metais entre elas.

Tabela 6 - Valores dos principais metais na DAM suplementada e com pH ajustado e DAM sem suplementação

Parâmetro	Unidade	DAM Suplementada, com ajuste de pH	DAM sem suplementação, sem ajuste de pH	σ DAM suplementada com ajuste de pH
pH	-	6,5	1,6	
Al total	mg/L	3,09	2,7	0,036
Cádmio	mg/L	0,004	0,0033	0,002
Chumbo	mg/L	0,27	0,29	0,015
Fe total	mg/L	182	166	5,508
Magnésio	mg/L	7,4	5,4	0,132
Manganês	mg/L	20,7	16,9	0,586
Níquel	mg/L	2,59	2,8	0,044
Zinco	mg/L	0,21	0,19	0,006

Fonte: Autoria própria, 2012.

Os resultados estão representados pela média das análises em triplicata. Esta comparação se fez necessária para verificar a interferência do ajuste de pH e a suplementação com o lactato de sódio nos resultados finais. Porém, percebe-se que não houve grandes diferenças entre os resultados das DAMs, nem qualquer tipo de precipitação de metais e/ou outros componentes nas respectivas amostragens. A Figura 11 ilustra uma amostra da DAM

suplementada e com pH ajustado em um *becker* de 2L, onde é possível observar a homogeneidade da amostra.

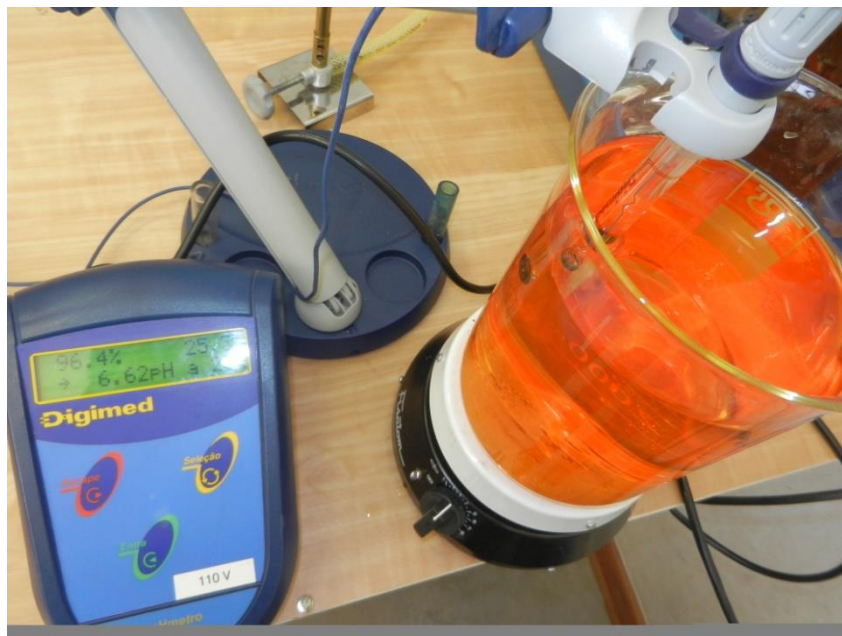


Figura 11 - Suplementação e ajuste de pH da DAM produzida em laboratório.
Fonte: Autoria própria, 2012.

Para se entender os efeitos que ocorreram, é preciso discutir algumas probabilidades que viriam explicar as observações, embora hipotéticas, obtidas neste experimento.

Segundo Cesar (2010) uma solução tampão ou solução tamponada é aquela que, ao adicionarmos uma pequena quantidade de ácido ou base, mesmo que fortes, mantém o seu pH praticamente invariável, cujo o qual é seu objetivo principal. Tal feito ocorre quando se tem uma solução tampão constituída por uma base fraca (BOH) e um sal (BA) derivado desta base. Nesta solução, ocorrem os seguintes fenômenos:

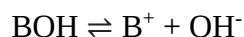
-Dissociação da base: $\text{BOH} \rightleftharpoons \text{B}^+ + \text{OH}^-$

(Na solução predominam fórmulas da base BOH)

-Dissociação total do sal: $\text{BA} \rightarrow \text{B}^+ + \text{A}^-$

(Na solução predominam íons B^+ e A^-)

Note que o íon B^+ é comum à base e ao sal. Ao juntarmos a esta solução uma base forte, esta irá liberar íons OH^- , que serão consumidos pelo equilíbrio:



Como consequência, este equilíbrio desloca-se para a esquerda, e com isso a basicidade da solução não aumenta e o pH não sofre variação. Percebe-se que não irá faltar o

íon B^+ para que o equilíbrio acima se desloque para a esquerda, uma vez que a dissociação do sal $BA \rightarrow B^+ + A^-$ fornece uma boa reserva deste íon.

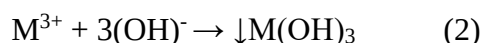
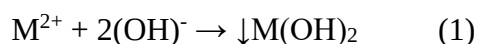
Se juntarmos à solução tampão um ácido qualquer, este irá se ionizar colocando íons H^+ em solução. Estes íons H^+ serão consumidos pelos íons OH^- resultantes da dissociação da base, e, desta forma, a acidez não aumenta e o pH não muda.



Nesta reação, também, pode-se perceber que não irão faltar íons OH^- para reagir com o H^+ do ácido e o estoque de fórmulas BOH que continuará se dissociando e fornecendo OH^- é muito grande.

Desta forma, a solução tampão só resistirá às variações de pH até que toda base BOH ou todo sal BA sejam consumidos. A resistência que uma solução tampão oferece às variações de pH recebe o nome de efeito tampão (caso a solução tampão fosse constituída por um ácido fraco e um sal derivado deste ácido, a explicação para o comportamento desta solução seria semelhante à anterior).

Porém, segundo Possa e Santos, (2003) o pH requerido para precipitar a maioria dos metais da água varia no intervalo de 6 a 9; são exceções o hidróxido férrico que precipita em pH ácido, em torno de 3,5, e o hidróxido de alumínio, próximo a 5,5. As reações de precipitação em meio aquoso ocorrem segundo as equações genéricas (1) e (2); onde M representa os íons metálicos em solução.



Quando os íons férricos se formam nas drenagens ácidas, imediatamente, sofrem hidrólise e precipitam da solução caso o pH estiver acima de 3,5, nas formas de hidróxido férrico $Fe(OH)_3$ ou oxi-hidróxido de ferro $FeOOH$ ou ainda sulfato básico de ferro $FeOHSO_4$. Entretanto, antes da formação dos precipitados insolúveis, os íons Fe^{3+} sofrem hidrólise parcial com formação de espécies hidrolisadas solúveis (POSSA e SANTOS, 2003).

Geremias et al., (2010) estudaram a remoção de íons metálicos presentes na DAM através da precipitação com rejeito calcinado e constataram que em valores de pH próximos a 3,7 e 5,4, ocorreu a precipitação do ferro e alumínio na forma dos hidróxidos $Fe(OH)_3$ e $Al(OH)_3$.

Neste experimento, portanto, não houve precipitação imediata dos íons férricos, pois o pH da DAM encontrava-se em valor inferior a 3,5. Sendo que após a suplementação com o lactato, o pH elevou-se imediatamente a faixa de pH 5,5, seguido pelo acréscimo de uma solução de hidróxido de sódio para obter um pH próximo de 6,5.

Analizando este aumento de pH, os íons férricos e alguns íons de alumínio deveriam sofrer precipitação (POSSA e SANTOS, 2003), porém tal fato não foi observado no presente experimento. Entretanto a precipitação só foi verificada, durante teste experimental, pela adição elevada de hidróxido de sódio até a solução atingir pH 9. A explicação para este fato seria a geração de uma solução tamponante entre o lactato de sódio com o hidróxido de sódio, em pH 5,5 a 6,5. Provavelmente, com a formação da solução tampão, os íons metálicos presentes em maiores quantidades na DAM (íons férricos e íons de alumínio) ligaram-se ao lactato de sódio, e este conseqüentemente liberou íons de sódio, o qual não precipitou na faixa de pH utilizada no estudo. Outro fato que permite essa interpretação é a coloração laranja-amarelado, característico da formação de compostos com íons férricos no meio (POSSA e SANTOS, 2003).

5.2 Relação entre pH e Potencial Redox (Eh)

A Tabela 7 descreve o tempo, pH e Eh de cada microrganismo utilizado no bioprocesso.

Tabela 7- Valores de pH e potencial redox durante o bioprocesso

Tempo	<i>A. aceti</i>		<i>M. luteus</i>	
	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)
Dias				
0	6,03	0,51	6,07	0,5
2	6,35	24,5	6,4	33
4	5,1	105	5,52	81,6
5	5,2	99,6	5,64	73,2
6	5,35	90,6	5,85	63,5
8	5,6	77	5,82	64
14	6,1	27	6,7	20

Fonte: Autoria própria, 2012.

Observando a Tabela 7, pode-se perceber que há um aumento gradativo do pH a partir do quarto dia (antes disso há um fase de adaptação das bactérias), em contrapartida há um decréscimo nos valores do potencial redox. Isso é devido à equação de *Nernst*, que segundo Machado (2007), esta explica que quanto maior for o pH, mais baixo será o potencial redox, e vice-versa.

Segundo Mariano (2006) um declínio do potencial redox de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos microrganismos aeróbios) para condições redutoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios). Porém, no período em estudo os resultados não apresentaram valores de potencial redox negativo, ou seja, o processo pode ser identificado como de ocorrência de um metabolismo aeróbio.

O aumento dos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons H^+ durante a redução de íons metálicos, como por exemplo, a redução de íons férricos (MARIANO, 2006).

5.3 Curva do crescimento microbiano

O crescimento celular foi acompanhado por medidas de absorbâncias em 600_{nm} em espectrofotômetro de acordo com o tempo de crescimento do bioprocessamento (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de absorbância de acordo com o tempo de cultivo das linhagens de *A. aceti* e *M. luteus* em comprimento de onda de 600_{nm}

Tempo (dias)	<i>A. aceti</i>	<i>M. luteus</i>
0	0,022	0,022
1	0,072	0,061
2	0,296	0,258
5	0,866	0,493
6	0,848	0,400
7	0,870	0,366
8	0,870	0,360
9	0,880	0,355
12	0,903	0,319
13	0,663	0,208
14	0,604	0,200

Fonte: Autoria própria, 2012.

A fim de se obter uma curva de crescimento e acompanhar a sobrevivência de cada microrganismo no bioprocesso, foram realizadas medições de absorbância para cada microrganismo. Verificou-se que a manutenção do crescimento celular microbiano teve uma durabilidade em torno de 8 e 12 dias para o *M. luteus* e *A. aceti*, respectivamente, sendo que a fase exponencial de crescimento se mostrou positiva aproximadamente até o quinto dias do bioprocesso, para ambas as linhagens. Após este período, verificou-se um decréscimo na contagem de células microbianas, diferente para ambas as espécies, indicando que o bioprocesso se encontrava na fase de declínio ou morte celular. Com isso o bioprocesso em estudo teve durabilidade de 14 dias, conforme mostra a Figura 12.

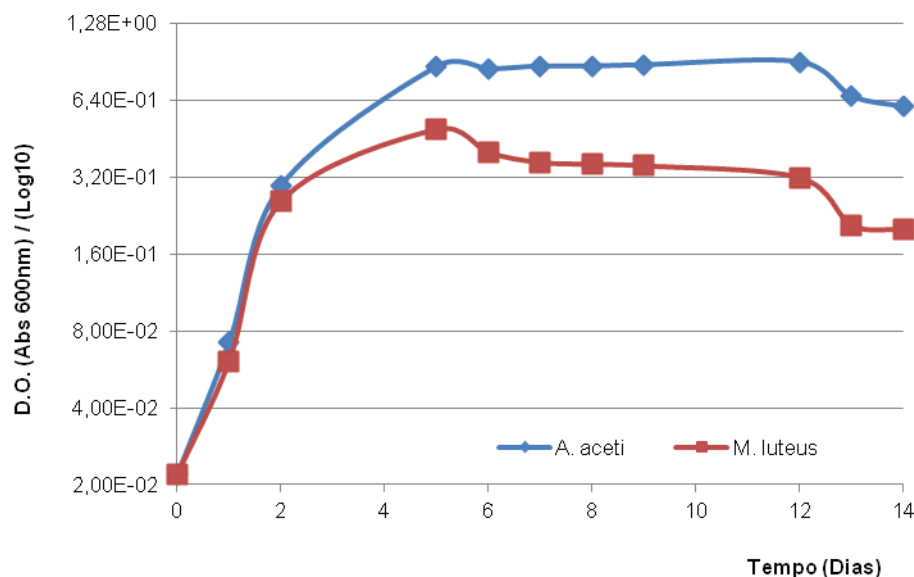


Figura 12 - Curva do crescimento microbiano das linhagens de *A. aceti* e *M. luteus* a partir da densidade óptica amostrada durante o bioprocessamento.
Fonte: Autoria própria, 2012.

5.4 Oxigênio Dissolvido, Demanda Bioquímica de Oxigênio e Demanda Química de Oxigênio

Embora as análises de OD, DBO e DQO não sejam a parte principal deste trabalho, esses parâmetros foram acompanhados com o intuito de verificar uma possível interferência bioquímica da via bacteriana diretamente no bioprocessamento.

5.4.1 Oxigênio Dissolvido

Observando a Figura 13, que demonstra o metabolismo respiratório das duas linhagens bacterianas utilizadas no bioprocessamento, pode-se perceber diferenças entre os valores de OD nos dois casos, sendo que o resultado do *A. aceti* ficou praticamente estável, enquanto que o *M. luteus* apresentou uma diminuição em torno de 20% nas concentrações de OD, porém ainda permaneceu dentro dos limites estabelecidos pela legislação nacional, que é no mínimo de 6,0 mg/L de O₂ (CONAMA 357, 2005). Percebeu-se valores iniciais de OD elevados, isso provavelmente aconteceu, pelo fato de manterem-se as amostras em temperaturas de refrigeração (4°C - 8°C).

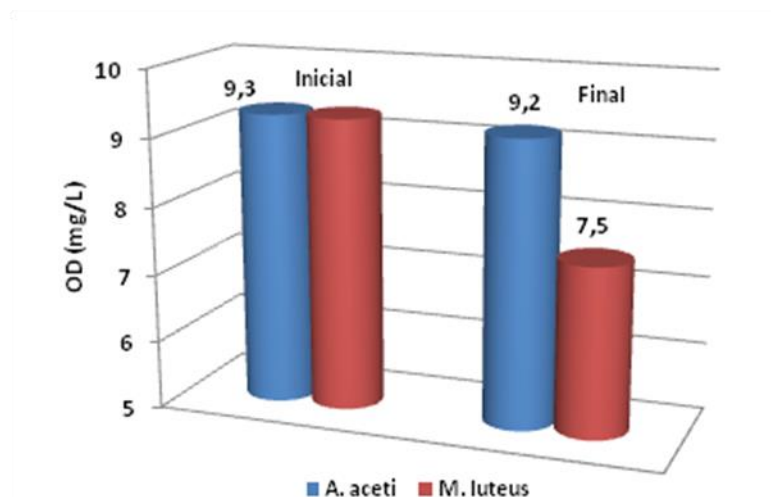


Figura 13 - Valores de OD na fase inicial e final do bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas de *A. aceti* e *M. luteus*.

Fonte: Autoria própria, 2012.

Segundo Mariano (2006) a diminuição da concentração de OD na água é um indicativo de processo microbiano com atividade aeróbia. Tanto o *M. luteus*, quanto o *A. aceti* são bactérias aeróbias estritas.

5.4.2 DBO e DQO

Nas Figuras 14 e 15 estão ilustrados os valores médios de DBO e DQO obtidos através das análises do bioprocesso utilizando as duas linhagens bacterianas.

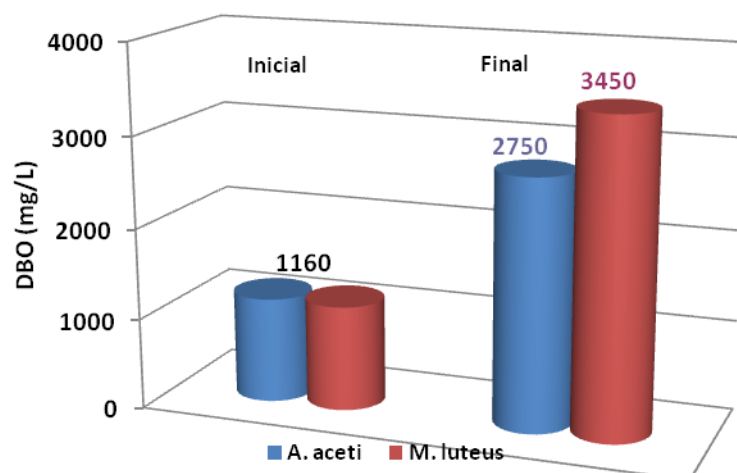


Figura 14 - Valores de DBO na fase inicial e final do bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas de *A. aceti* e *M. luteus*.

Fonte: Autoria própria, 2012.

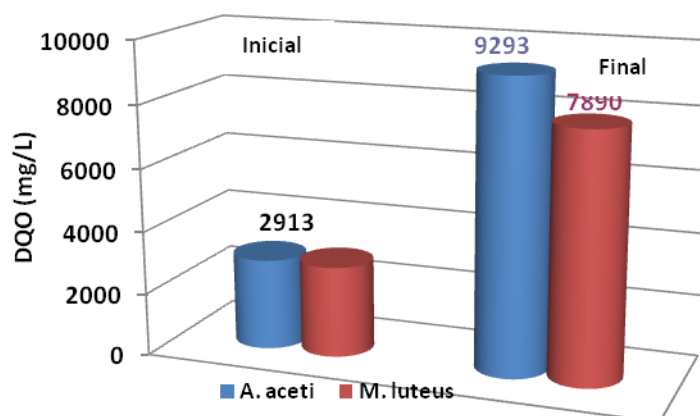


Figura 15 - Valores de DQO na fase inicial e final do bioprocesso utilizando as linhagens bacterianas de *A. aceti* e *M. luteus*.

Fonte: Autoria própria, 2012.

Segundo Machado (2012), em seu estudo a redução de DQO e DBO mostrou-se efetiva pelo fato das condições experimentais do meio serem favoráveis às atividades bacterianas anaeróbias presentes no efluente. Do contrário neste experimento, possivelmente por serem utilizadas linhagens bacterianas aeróbias obrigatórias, verificou-se uma inversão dos processos, com aumento nos valores.

O aumento da DBO/DQO pode ser atribuído ao aumento da carga orgânica, biomassa e íons metálicos (reduzidos) em solução.

5.5 Metais dissolvidos e sulfato

Foram realizadas análises para caracterização inicial da DAM com pH ajustado em valores adequados ao crescimento das bactérias e suplementação de lactato de sódio.

Tabela 9 - Valores das médias das análises iniciais da DAM suplementada para pH, metais e sulfato

Parâmetro	Unidade	Valores	Desvio padrão - σ
pH	-	6,54	0,184
Al	(mg/L)	77,3	0,566
Fe	(mg/L)	377,2	0,707
Mn	(mg/L)	31,1	0,212
Pb	(mg/L)	0,29	0,042
Ni	(mg/L)	33,2	4,95
Mg	(mg/L)	5,4	1,414
Cu	(mg/L)	0,050	0,003
K	(mg/L)	1,0	0,007
Zn	(mg/L)	0,190	0,004
Si	(mg/L)	3,09	0,134
Cd	(μ g/L)	3,3	1,273
P	(mg/L)	< 0,08	-
Sulfato	(mg/L)	1726,2	27,29

Fonte: Autoria própria, 2012.

Os resultados foram característicos de uma drenagem ácida de mina, pois segundo Lyew *et al.*, (2001) a DAM é um efluente caracterizado por elevada acidez e altas concentrações de sulfato e de metais, tais como Al, , Fe, Mn, Mg e Zn. Lembrando que a acidez neste caso não foi elevada, pois o pH foi ajustado, sendo que o pH desta DAM era inicialmente em torno de pH 2,0.

Tabela 10 - Valores comparativos das médias das análises da DAM suplementada antes e após o bioprocesso para cada bactéria

Parâmetro	Unidade	Antes	<i>A. aceti</i>	<i>M. luteus</i>	CONAMA 430/2011	Maior % reduativa
pH	mg/L	6,54	6,1	6,7	5 a 9	
Al	mg/L	77,3	30,1	31	NA	61,06 %
Fe	mg/L	377,2	198	178	15	52,80 %
Mn	mg/L	31,1	23,4	18	1,0	42,12 %
Pb	mg/L	0,29	0,19	0,16	0,5	44,82 %
Ni	mg/L	33,2	22,5	12	2,0	63,85 %
Mg	mg/L	5,4	5,1	4,78	NA	11,48 %
Cu	mg/L	0,05	0,039	0,028	NA	44,00 %
K	mg/L	1,0	0,81	0,2	NA	80,00 %
Zn	mg/L	0,19	0,19	0,177	5,0	6,84 %
Si	mg/L	3,09	2,05	1,99	NA	35,90 %
Cd	µg/L	3,3	3,09	3,1	0,2	6,06 %
P	mg/L	< 0,08	1,1	1,03	NA	
Sulfato	mg/L	1726,2	568	218	NA	87,37 %

Fonte: Autoria própria, 2012.

Analisando a Tabela 10, após o bioprocesso pode-se observar uma redução parcial em praticamente todos os metais em estudo, exceto na concentração de Fósforo (P) que houve um incremento na sua concentração. A possível explicação para tal fato é que para cada mol de sulfato reduzido há a formação de uma molécula de ATP (MADIGAN et al., 2009).

Dentre os metais de maior relevância presentes nesta DAM a redução de maior nível para o menor, seguiu: Fe > Al > Ni > Mn > Mg, ou seja, a elevação da captação ocorreu conforme a maior concentração inicial do metal. Porém, proporcionalmente, dentre estes metais de maior redução foi o níquel (63,85% para o *M. luteus*), seguido pelo alumínio (61,06% para o *A. aceti*), ferro (52,8% para o *M. luteus*), chumbo (44,82% para o *M. luteus*), Manganês (42,12% para o *M. luteus*) e magnésio (11,48% para o *M. luteus*). Silvas et al., (2011), estudaram a biossorção de metais presentes na DAM utilizando *Rhodococcus opacus* e demonstraram que a captação dos metais, da maior para a menor, seguiu: Fe > Ca > Al > Mg > Mn > Zn. Porém, proporcionalmente, o metal com maior remoção foi o Mn, seguido

pelo Fe, Ca, Al, Zn e Mg. Em um trabalho, realizado por Mattuschka e Straube (1993) utilizando no resíduo de biomassa da indústria farmacêutica, o *Streptomyces noursei*, para a bioissorção de metais. Os resultados obtidos levaram à seguinte ordem de capacidade de bioissorção de metais: $\text{Ag} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Co} > \text{Ni}$.

No mecanismo de bioissorção independente do metabolismo celular, o processo ocorre através da interação físico-química entre o metal e os grupos funcionais da superfície celular (Vásquez, 2005). Desta forma, a capacidade de adsorver metais, assim como o tempo de bioissorção dependem diretamente, das características do revestimento celular de cada espécie (White et al., 1995; Bueno, 2008).

Segundo Bueno et al., (2008) a biorremediação pode ser afetada por variáveis físicas e químicas como pH, força iônica, concentração de biomassa e da presença de diferentes metais pesados em solução. No estudo os mesmos autores concluíram que a capacidade de absorção do chumbo por parte da biomassa foi reduzida pela presença de outras espécies metálicas no sistema, isso demonstra a interferência dos diferentes tipos de metais no processo. Mattuschka e Straube (1993) observaram uma bioissorção seletiva, quando todos os íons metálicos foram misturados numa única solução. A sorção do cromo foi diminuída quando chumbo estava presente na mistura. A remoção de cromo chegou a 72% (10,6 mg/g) quando a solução continha apenas cromo. Quando os testes foram realizados com uma mistura de metais (com exceção do chumbo) 46% do cromo foi removido. A presença do chumbo fez com que a remoção do cromo diminuísse para 7%, possivelmente por efeito competitivo.

Analisando as informações desses autores, pode-se ressaltar uma possível redução seletiva dos metais através dos microrganismos na DAM, pois mesmo reduzindo parcialmente a grande maioria dos metais, não houve reduções acima de 64% em nenhum caso.

Para melhor visualizar o comportamento de cada microrganismo em relação aos metais. Seguem algumas ilustrações dos metais com maior relevância presentes na DAM em estudo.

No presente experimento o alumínio teve uma redução de 61,06% quando utilizado o *A. aceti* e 59,9% com o *M. luteus*. Possivelmente essa redução é devida a solubilidade do alumínio, regida em grande parte pelo pH da água, a qual é afetada pelos processos de oxidação e de redução que ocorrem com outros metais. O alumínio que não é removido por precipitação é captado por bioissorção, seja através de acúmulo de íons na célula bacteriana, ou por adsorção na superfície das células (SHEORAN et al., 2010).

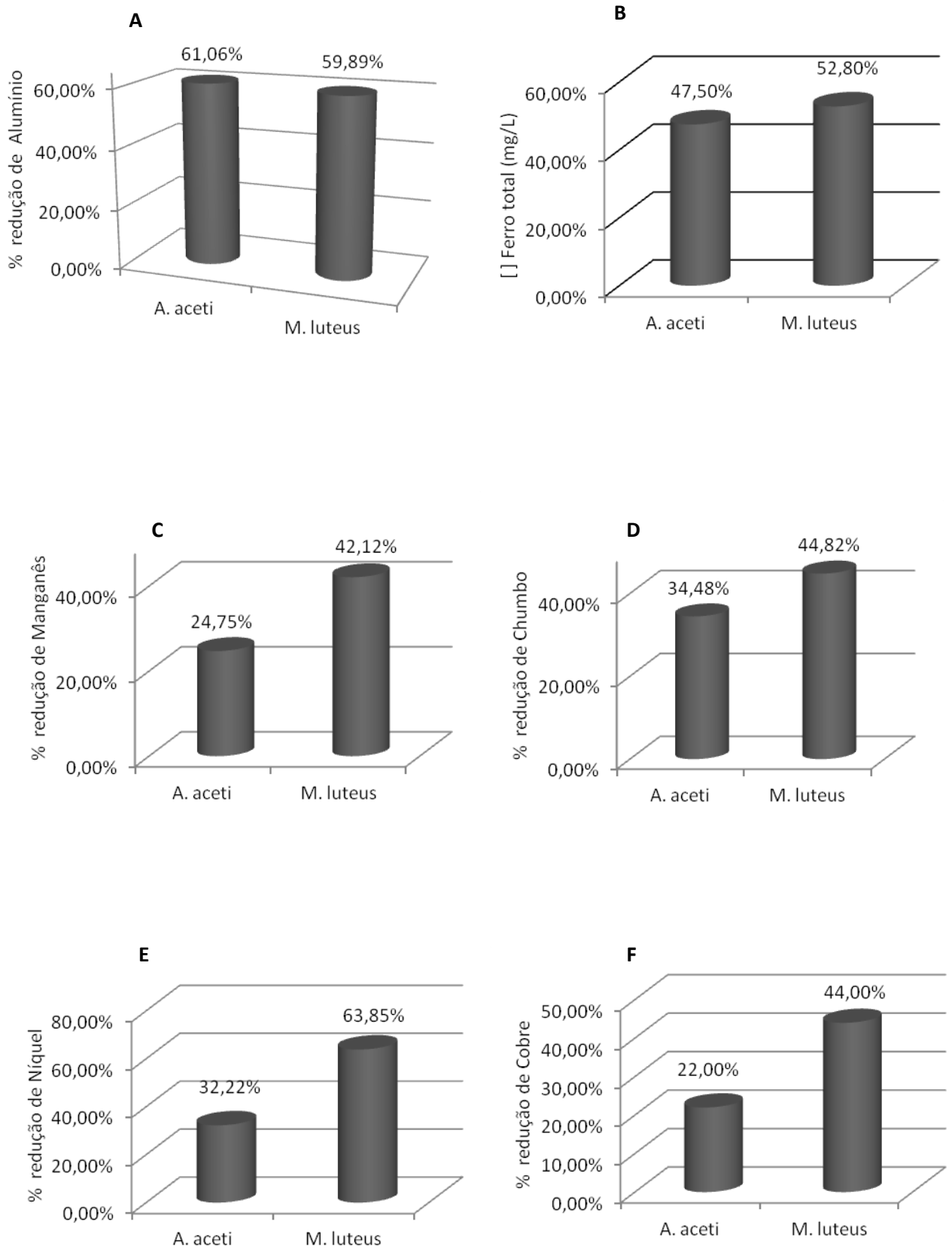


Figura 16 (A, B, C, D, E e F) - Ilustra respectivamente a redução das concentrações de alumínio, ferro, manganês, chumbo, níquel e cobre.

Fonte: Autoria própria, 2012.

Razmovski e Šciban (2008) testaram *Polyporus squamosus*, quanto à sua capacidade de absorver íons de Fe^{3+} a partir de soluções. O aumento na concentração inicial do metal e no pH das soluções resultou em uma maior absorção de ferro. As capacidades máximas de absorção do metal por *P.squamosus*, foram de 31,2, 18,1 e 12,2 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ em concentrações de 1,5, 3,3 e 6,6 gramas de biomassa/litro, respectivamente. No entanto no presente trabalho verificou-se uma redução de ferro de 47,5% para o *A. aceti* e de 52,8% para o *M. luteus*, ou seja, 475mg/g e 528mg/g de ferro, respectivamente.

A diminuição da concentração de chumbo foi de 44,82% para o *M. luteus* e de 34,48% para o *A. aceti*, já a redução de níquel foi de 63,85% para o *M. luteus* e de 32,22%. Leung et al., (2001) *apud* Bueno et al. (2008), estudaram a bioabsorção de cobre, chumbo e níquel entre 12 bactérias isoladas de lodo ativado. A ordem crescente de afinidade dos três metais para *Pseudomonas pseudoalcaligenes* foi Ni, Cu e Pb. Abu Al-Rub et al., (2006) *apud* Bueno et al., (2008) estudaram a bioabsorção de íons cobre usando *Chlorella vulgaris* células de algas, eles relataram que a bioabsorção de cobre foi eficaz e dependente do pH de equilíbrio e concentração de bioabsorvente. Kapoor et al., 1999 mostrou que o fungo *Aspergillus niger* foi capaz de remover significativamente metais pesados como chumbo, cádmio e cobre a partir de soluções aquosas.

Bueno et al., (2008) estudaram a remoção de Pb, Cr e Cu através de *Rhodococcus opacus* e observaram que os melhores resultados ocorreram em pH 5,0 para o chumbo e pH 6,0 para o cobre, respectivamente, onde cerca de 95% e 52% de espécies metálicas foram captadas pela biomassa.

O resultado para a redução de níquel neste trabalho foi de 63,85% para o *M. luteus* e 32,22% para o *A. aceti*. Congeevaram et al., (2007) estudaram a bioabsorção de níquel por fungos e bactérias. Relataram que a máxima remoção de níquel foi em pH 7,0 utilizando *Micrococcus sp.* Em pH baixo a remoção pode ser insignificante devido a competição entre hidrogênio e íons metálicos.

Neste experimento o manganês foi reduzido em 42,12% com a utilização do *M. luteus* e 24,75% com o *A. aceti*. Segundo Sheoran, et al., (2010) o manganês é um metal mais difícil de ser biocaptado. A sua remoção como sulfuretos é menos eficaz em biorreatores. Esses autores relatam que a remoção do manganês está relacionada com a solubilidade relativamente elevada de MnS , o qual estaria presente quando as concentrações de Mn são elevadas em comparação com outros metais.

A quantidade removida de cobre neste estudo foi de 22% para o *A. aceti* e 44% para o *M. luteus*. Pakshirajan et al., (2006) estudaram a remoção de cobre, chumbo e cádmio por *Phanerochaete chrysosporium*. As máximas capacidades de remoção para cobre, chumbo e cádmio foram de 39,2%, 40,6% e 41%, respectivamente.

Há ainda outros estudos utilizando bioissorventes na remoção de metais pesados, como pode ser verificado na Tabela 11.

Tabela 11- Bioissorventes empregados na remoção de metais pesados reportados pela literatura em função de alguns parâmetros de operação

Metal	Bioissorvente	Qmax (mg/g)	pH	Referência
Cd	<i>Fontinalis antipyretica</i>	28	5,0	Martins et al.(2004b)
Cd	<i>B. licheniformis</i>	142,73	7,0	Zoubouilis et al. (2004)
Cd	<i>Myriophyllum spicatum</i>	0,0082	5-8	Wang et al.(1996)
Cr ⁶⁺	<i>S. cerevisiae</i>	3,0	1-2	Nourbakhsh et al. (1994)
Ni	<i>Rhizopus arrhizus</i>	18,7	6-7	Nourbakhsh et al. (1994)
Pb	<i>Myriophyllum spicatum</i>	0,056	5-8	Wang et al. (1996)
Zn	<i>Fontinalis antipyretica</i>	12	5,0	Martins et al. (2004b)
Zn	<i>Streptomyces noursei</i>	1,6	5,8	Veglio et al. (1997)
Cu, Mn, Cd	<i>Saprolegnia subterrânea e Pythium torulosum</i>			Souza et al. (2007)
Cr, Ni	<i>Micrococcus sp e Aspergillus sp.</i>		3-11	Congeevaram et al. (2007)
Pb, Ni	<i>Cladonia furcata</i>		2-8	Sari et al. (2007)
Pb, Cr, Cu	<i>R. opacus</i>		2-7	Bueno et al. (2008)
Cu	<i>Chorella vulgaris</i>			Abu Al-Rub et al. (2006)
Pb, Cd, Cu	<i>Aspergillus Niger</i>			Kapoor et al. (1999)
Cd	<i>M. luteus</i>			Mesquita et al. (2001)
Cr	<i>Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa e S. cerevisiae</i>			Benazir, et al. (2010)

Outro resultado importante neste trabalho foi à redução de sulfato, através da utilização das linhagens bacterianas de *A. aceti* e *M. luteus*. Embora esses microrganismos utilizados não sejam considerados bactérias redutoras de sulfato (BRS), tiveram participação fundamental no mecanismo redutor do sulfato presente na DAM. As BRS, que vêm sendo

estudadas exaustivamente ao longo deste século, são microrganismos anaeróbios que realizam a redução desassimilativa do íon sulfato. Esse processo difere da redução assimilativa que é realizada por todas as plantas, fungos e a maioria das bactérias, onde os íons sulfato são reduzidos a sulfeto e este é incorporado às várias moléculas orgânicas como aminoácidos e coenzimas (RIZZO e LEITE, 2004). Na redução desassimilativa o íon sulfato atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica, da mesma forma como atua o oxigênio na respiração convencional (aeróbia). Uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, porém, a maior parte é excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a H_2S livre (POSTGATE, 1984).

A Figura 17 ilustra a quantidade de redução de sulfato para as diferentes linhagens testadas no biprocesso.

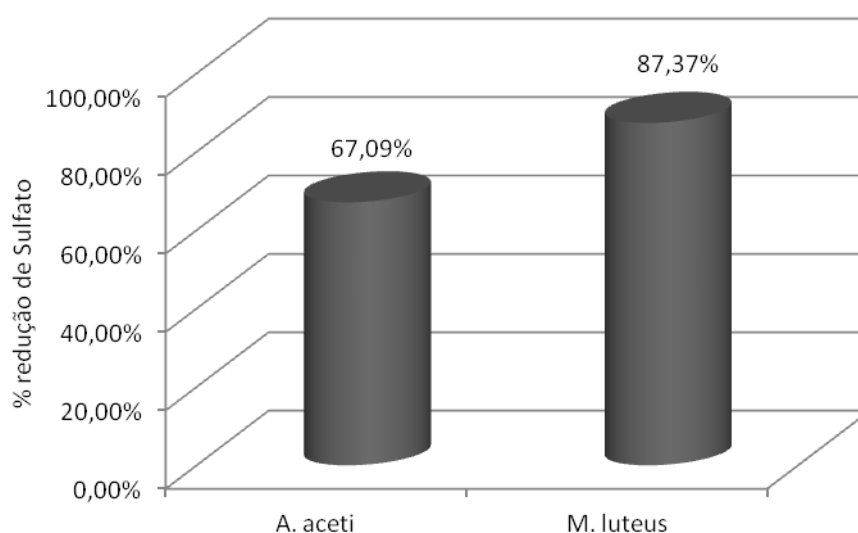


Figura 17 – Quantidade de redução de íon sulfato para as duas linhagens bacterianas.

Fonte: Autoria própria, 2012.

Neste experimento a redução de sulfato foi de 67,09% para o *A. aceti* e de 87,37% para o *M. luteus*. A redução de sulfato é um importante mecanismo para a remoção de metais tóxicos da DAM, entre eles, como: cobre, zinco e cádmio, formam sulfetos altamente insolúveis, por exemplo: $\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{ZnS} + 2\text{H}^+$ (JOHNSON e HALLBERG, 2005).

Martins, et al. (2009) mostraram a redução de sulfato em experimentos realizados na presença de três fontes de carbono diferentes (lactato, lactose e etanol). A redução de sulfato mais eficiente foi observada com lactato para todos os inóculos. O suplemento lactato foi totalmente consumido nos primeiros dias de experiência. A quantidade de lactato utilizada na

experimentação foi de 6g/L. Sheoran et al. (2010) relatam que o lactato é um doador de elétrons superior em comparação aos outros, tais como etanol, ácido acético, propionato e de acetato.

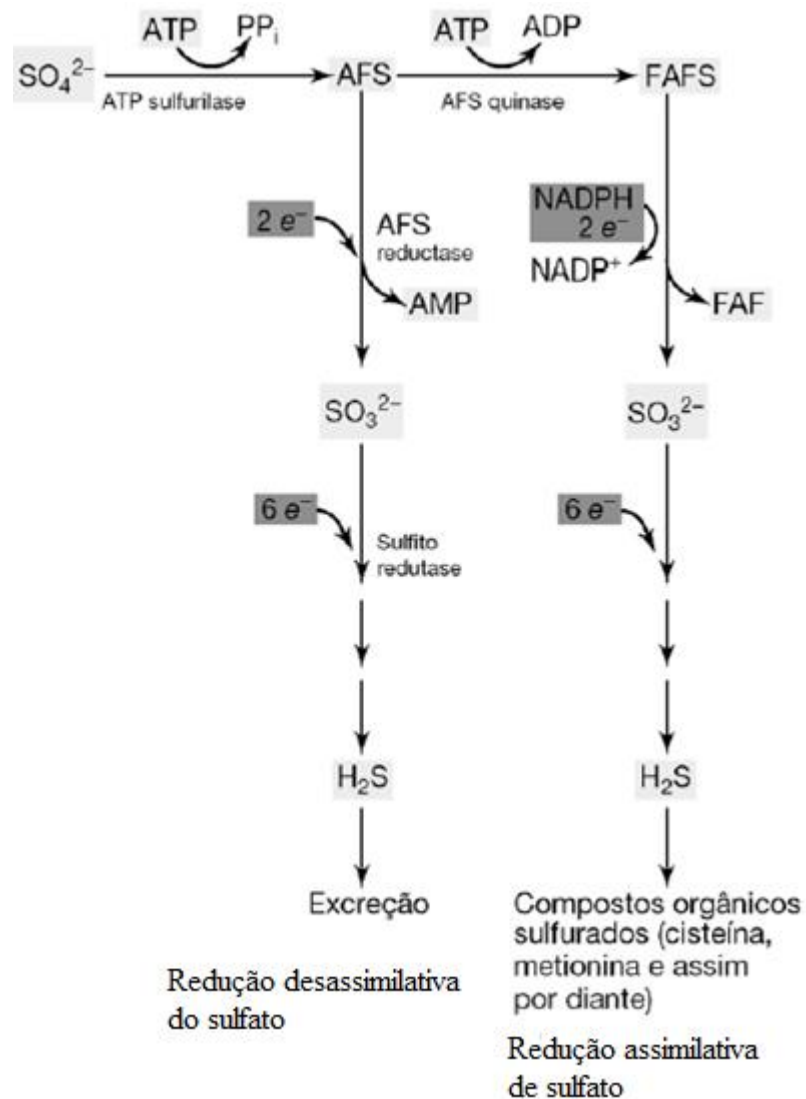


Figura 18 - Redução assimilativa e desassimilativa do sulfato.

AFS: Adenosina Fosfosulfato.

FAFS: Fosfoadenosina fosfosulfato.

Fonte: Adaptado de Madigan et al., 2009.

Segundo Patrício (2009), entende-se por redução desassimilativa de sulfato a utilização conjunta da oxi-redução de compostos orgânicos ou hidrogênio molecular com a redução de sulfato como um aceptor externo de elétrons em anaerobiose. Diferentemente da redução assimilativa de sulfato, onde o mesmo é convertido a enxofre molecular na forma de aminoácidos e segue por diferentes vias bioquímicas (MADIGAN et al., 2009).

Além disso, diferente de algumas espécies de bactérias redutoras de nitrato, as BRS usualmente não excretam intermediários de seu metabolismo respiratório, liberando assim apenas o produto final do mesmo, o ácido sulfídrico (RABUS et al., 2006 apud PATRÍCIO, 2009).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

A DAM gerada em laboratório sob efeito da lixiviação da pirita possui características semelhantes da DAM naturalmente formada em áreas de mineração de carvão.

A suplementação com lactato de sódio não provocou alterações relevantes nas características físico-químicas da DAM, permitindo a realização do bioprocesso em pH variando de 5,10 a 6,70, permanecendo estável em pH 6,5.

A relação entre pH e potencial redox seguiu a equação de *Nerst*, ou seja, quanto maior o pH, menor foi o potencial redox e vice-versa.

Ambas as linhagens bacterianas apresentaram um crescimento exponencial até o quinto dia do bioprocesso, posteriormente apresentaram um comportamento individual até seu declínio final.

Com esta pesquisa, pode-se concluir que dentre as linhagens bacterianas testadas, ambas mostraram-se capazes de reduzir as concentrações iniciais dos diferentes íons metálicos presentes na DAM utilizado no bioprocesso. E a partir das análises comparativas entre as linhagens bacterianas, o *M. luteus* apresentou um melhor desempenho na remoção de metais, exceto o alumínio, onde o *A. aceti* se mostrou ser discretamente superior.

O *M. luteus* apresentou um desempenho destacável na remoção de sulfato, alcançando uma remoção de 87,37%, contra 67,09% do *A. aceti*.

Assim sendo, o desenvolvimento de tecnologias que empregam microrganismos, além de apresentar como uma técnica eficiente, ainda apresenta a vantagem, de possibilitar a reutilização de novas etapas de remoção como, por exemplo, a recuperação do metal na biomassa. No entanto, ainda se faz necessário um entendimento maior dos mecanismos biossortivos, principalmente no seu desenvolvimento em escala industrial.

O emprego adequado de microrganismos na remoção de metais pesados torna-se um desafio na área de biotecnologia ambiental. Assim, a procura por novas tecnologias viáveis e de baixo impacto para o meio ambiente vão ao encontro do desenvolvimento sustentável, podendo conduzir à mitigação do problema ambiental sem gerar efeitos nocivos.

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Comprovar a via bacteriana pela qual ocorre a redução de determinados metais no estudo do bioprocesso;
2. Utilizar consórcios de microrganismos e testar os microrganismos com alguns metais específicos;
3. Testar o bioprocesso com outras fontes de suplementação economicamente viáveis;
4. Otimização do bioprocesso para utilização em escala ampliada;
5. Explorar o processo cinético da redução de sulfato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu AL-Rub, F.A., El-Naas, M.H., Ashour, I., Al-Marzouqi, M.. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single binary and ternary metal aqueous solutions. **Process Biochem.** 41, 457–464, 2006.
- Aguiar M. R. M. P.; Novaes A. C. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, Vol. 25, N°. 6B, 1145 -1154, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21^a ed. Washington: *American Public Health Association*; AWWA; WPCF. 2005.
- Benazir J. F.; Suganthi R.; Rajvel D.; Pooja M. P.; Mathithumilan B.. Bioremediation of chromium in tannery effluent by microbial consortia. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 9 (21), p. 3140-3143, 2010.
- Borges, A.M. 2002. **Utilização do resíduo do processamento do camarão na adsorção de ânions**. Dissertação de Mestrado, PPGEM-EE-UFRGS, Porto Alegre (RS), 98p.
- CONAMA, **Resolução nº357**, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.
- CONAMA. **Resolução nº 430**, 13 de maio de 2011. Brasília: Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>.
- Bueno, B.Y.M.; Torem, M.L.; Molina, F.; Mesquita, L.M.S. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R.opacus*: Equilibrium and Kinetic studies. **Minerals Engineering** 21 (1), p. 65-75, 2008.
- Campos M. C. C.. Atributos dos solos e riscos de lixiviação de metais pesados em solos tropicais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais** V.6, N.3 Set./Dez. 2010.
- Cesar, P. Solução tampão. **Portal de Estudos em Química**. 2010. Disponível em: <http://www.profpc.com.br>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2012.
- Congeevaram, S.; Dhanarani S.; Park J.; Dexilin M.; Thamaraiselvi K. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials** 146, p. 270 – 277, 2007.
- Del Rio, D. T. **Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, 2004.
- Edberg, S. Human health assessment: *Acetobacter aceti*. **Unpublished, U.S. Environmental Protection Agency**, Washington, D.C, 1992.

Evangelou, V. P.; Zhang, Y. L. A review pyrite oxidation mechanisms and acid mine drainage prevention. **Critical reviews in environmental science and technology**. Vol. 25, n°2, 141-199, 1995.

Fagundes, J. R. T. **Balanço hídrico do bota-fora BF4 da mina de Osamu Utsumi, INB, como subsídio para projetos de remediação de drenagem ácida**. Dissertação (mestre em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2005.

Galatto, S. L.; Back, A. J.; Lopes, R. P.; Bif, D. Z.; Santo, E. L. Emprego de coberturas secas no controle da drenagem ácida de mina – Estudos em campo. **Engenharia sanitária ambiental**. Vol.12 - n° 2, p. 229-236, abr/jun 2007.

Gaylarde C. C.; Bellinaso M. de C.; Manfio G. P. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n°34, p. 36-43, jan./jun., 2005.

Geremias, R.; Laus, R.; Fávere, V. T.; Pedrosa, R. C.. Rejeito de mineração de carvão como adsorvente para remoção da acidez, Fe (III), Al (III) e Mn (II) em drenagem ácida. **Química Nova**, Vol. 33, N°. 8, 1677-1681, 2010.

Ghigliazza, R.; Lodi, A.; Rovatti, M. Kinetic and process considerations on biological reduction of soluble sulfates. **Resources Conservation & Recycling**, vol. 29, pp.181-194, 2000.

Heal, K.V.; Salt, C.A. Treatment of acid metal-rich drainage from reclaimed ironstone mine spoil. **Water Science Technology**, vol. 39, No. 12, pp.141-148, 1999.

Johnson, D. B.; Hallberg, K. B.. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of the Total Environment** 338, p. 3-14, 2005.

Kameda, T.; Yabuuchi, F.; Yoshioka, T.; Uchida, M.; Okuwaki, A.. New method of treating dilute mineral acids using magnesium-aluminum oxide. **Water Research**, vol. 37, pp.1545-1550, 2003.

Kapoor A.; Viraraghavan T.; Cullimore D. Roy.. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus Níger*. **Bioresource Technology** 70, p. 95-104, 1999.

Kleinmann, R.L.P.; Crerar D.A.; Pacelli R.R.. Biochemistry of acid mine drainage and a method to control acid formation. **Min. Eng.**, vol.33, p. 300-306. 1981.

Kontopoulos, A.. Acid mine drainage control. In: **Castro, S.H.** Effluent treatment in the mining industry. Chile: *University of Concepción*, p. 57-118. 1998.

Laus, R.; Geremias, R.; Vasconcelos, H. L.; Laranjeira, M. C. M.; Fávere, V. T.. Reduction of acidity and removal of metal ions from coal mining effluents using chitosan microspheres. **Journal of Hazardous Materials** 149, p. 471–474. 2007.

Lemos, J. L. S.. Revisão acerca de utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. **Série Tecnologia Ambiental**, v.43, 65p. CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 2008.

Luptakova, A.; Kusnierova, M.. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. Department of Mineral Biotechnologies, Institute of Geotechnics of Slovak Academy of Sciences. **Hydrometallurgy** 77, p. 97–102, 2005.

Lyew, D., Sheppard, J.. Technical note Use of conductivity to monitor the treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria. **Water Research**. vol. 35. p. 2081-2086, 2001.

Machado, L.. Ensaios estáticos e cinéticos para a prevenção da geração de drenagem ácida de minas da mineração de carvão com escória de aciaria. **Rem: Revista Escola de Minas**. Universidade Federal de Ouro Preto. São Paulo, Brasil, 2007.

Machado, T. F.. Tratamento de drenagem ácida de mina: caracterização e bioativação de lodo anaeróbio em reator UASB. **XX – Jornada de Iniciação Científica – CETEM**. Rio de Janeiro, 2012.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., e Clark, D.P.. Brock – Biology of Microorganisms. 12ª. ed. San Francisco: **Pearson Education**, Inc; 2009, 1061 p.

Mariano A. P.. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de doutorado – Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Rio Claro-SP, 2006.

Martins C.M.; Daman, D.; Roeser H.M.P.; Nalini Jr. H.A. Estudo microbiológico relacionado a geração de drenagem ácida em antigas minas de pirita no município de Ouro Preto, MG. **Geochimica Brasiliensis**, 2004a.

Martins M.; Faleiro M. L.; Barros R. J.; Veríssimo A. R.; Barreiros M. A.; Costa M. C.. Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. **Journal of Hazardous Materials** v.166, p.706–713, 2009.

Martins, R.J.; Pardo, R.; Boaventura, R.. Cadmium (II) And Zinc(II) Adsorption By The Aquatic Moss Fontinalis Antipyretica: Effect Of Temperature, pH And Water Hardness. **Water Research**. 38, p. 693–699, 2004b.

Mattuschka, B.; Straube, G. Biosorption of metals by a waste biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.58, p.57-63, 1993.

McCauley C. A.; O’Sullivan A. D.; Milke M. W.; Weber Paul A.; Trumm D. A.. Sulfate and metal removal in bioreactors treating acid mine drainage dominated with iron and aluminum. **Water research** v.43, p.961-970, 2009.

Mesquita L. M. S. de, Cunha C., Leite S. G. F. Avaliação da bio sorção de cádmio por *Micrococcus luteus*. **Centro de Tecnologia Mineral**. Ministério da Ciência e Tecnologia. Rio de Janeiro, 2001.

Ministério da Saúde do Brasil. **Portaria do Ministério da Saúde, número 518 de 2004**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2004.

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

Nourbakhsh, M.; Sag ,Y.; Ozer, D.; Aksu, Z.; Kutsal, T.; Caglar, A.. A comparative study of various biosorbents for removal chromium (VI) ions from industrial waste waters. **Process Biochemistry**. 29, p. 1-5, 1994.

Pakshirajan, K; Swaminathan, T.. Biosorption of Pb, Cu, and Cd by *Phanerochaete chrysosporium* in a Packed Column Reactor. **Soil & Sediment Contamination**; Vol. 15; Ed. 2, p187-197, 2006.

Pascallicchio, A. E.. Contaminação por Metais Pesados: Saúde Pública e Medicina Ortomolecular. **Annablume**, Ed.1. São Paulo, 2002.

Patrício I. C.. **Caracterização bioquímica e molecular de bactérias redutoras de sulfato isoladas na RPPN do caraça, MG**. Dissertação – Mestrado em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto. OURO PRETO, MG, 2009.

Possa, M. V.; Santos, M. D. C.. Tratamento de drenagem ácida de mina por processo de neutralização controlada. **CETEM – Centro de Tecnologia Mineral**, p. 1-21, Rio de Janeiro, 2003.

Postgate, J.R..The sulphate-reducing bacteria. **Cambridge**: Cambridge University Press, 2nd Ed., 1984.

Razmovski, R.; Šciban, M.. Iron(III) biosorption by *Polyporus squamosus*. Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia. **African Journal of Biotechnology** Vol. 7 (11), pp. 1693-1699, 3 June, 2008.

Rizzo, A. C. L.; Leite, S. G. F.. Produção de sulfeto em reator do tipo UASB e sua potencial aplicação na remoção de metais pesados de efluentes. **CETEM – Centro de Tecnologia Mineral**. Série tecnologia ambiental, ISSN 0103-7374, p. 1-48, Rio de Janeiro, 2003.

Rodríguez A. M. J.; Durán-Barrantes M.M.; Borja R.; Sánchez E.; Colmenarejo M.F.; Raposo F.. Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen sulphide and effluent from anaerobic treatment: Effect of pH. **Journal of Hazardous Materials**, p. 759–765, 2009.

Rubio J.; Silva R. D. R.. Tratamento ativo de drenagem ácida de minas de carvão: situação atual e tendências tecnológicas. **XXIII ENTMME** – Gramado - RS, 2009.

Salomons W.; Forstner U.; Mader P. Heavy metals: problems and solutions. **Springer-Verlag**, p. 412 , 1995.

Sandrin, T.R.; Maier, R.M.. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. **Environ. Hlth. Persp.** 111: 1093-1101, 2003.

Saria A.; Tuzen M.; Uluozlu O.D.; Soylak M.. Biosorption of Pb(II) and Ni(II) from aqueous solution by lichen (*Cladonia furcata*) biomass. **Biochemical Engineering Journal**, 37, p. 151–158, 2007.

Sheoran A.S.; Sheoran V.; Choudhary R.P.. Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. **Minerals Engineering**, v. 23, p. 1073 –1100, 2010.
Silva R. A.. **Recuperação hidrometalúrgica de metais da drenagem ácida de minas por precipitação seletiva**. 2010. 129 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais (PPGE3M), UFRGS, Porto Alegre, 2010.

Silva R.; Rubio J.. O problema da remoção de íons sulfato no reuso de águas tratadas de DAM no Brasil. **XXIV ENTMME** - Salvador-BH, 2011.

Silvas F. P. C.; Buzzzi D. C.; Espinosa D. C. R.; Tenório J. A. S.. Biossorção de metais presentes na DAM utilizando *Rhodococcus opacus*. **Rem: Revista Escola de Minas**. Vol.64 nº.4 Ouro Preto, Oct./Dec. 2011.

Silvas F. P. C.. **Biotecnologia aplicada ao tratamento de drenagem ácida de mina**. Dissertação - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

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

Souza J. I.; Schoenlein-Crusius I. H.; Pires-Zottarelli C. L. A.; Schoenlein N. C.. Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Disssmann) R.L. Seym. e *Pythium torulosum* Coker e P. Patt. (Oomycetes). **Acta bot. bras.** 22, p. 217-223, 2007.

Tyrrell, W.R.; Mulligan, D.R.; Sly, L.I.; Bell, L.C.. Trialing wetlands to treat coal mining wastewaters in low rainfall, high evaporation environment. **Water Science Technology**, Vol.35, N° 5, p. 293-299, 1997.

Wang, T. C.; Weissman, J.C.; Ramesh, G.; Varadarajan, R.; Benemann, J.R.. Parameters for Removal of Toxic Heavy Metals by Water Milfoil (*Myriophyllum spicatum*). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**. 57, p. 779 -786, 1996.

Vásquez, T. G. P. **Avaliação da remoção de Cd e Zn de solução aquosa por bioissorção e bioflotação com *Rhodococcus opacus***. Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 108f, Rio de Janeiro, 2005.

Veglio F.; Beolchini F.. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**. 44: 301- 316, 1997.

Vidali M.. Bioremediation. An overview. **Pure Appl. Chem.**, Vol. 73, N°. 7, p. 1163–1172, 2001.

Zeraik, A. E.. **Biosurfactantes como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de poliestireno**. Dissertação – Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2009.