

# Tolerância ao manganês por bactérias isoladas em área contaminada por rejeito de mineração

Tolerance to manganese by bacteria isolated in an area contaminated by mining tailings

Tolerancia al manganeso por bacterias aisladas en un área contaminada por relaves mineros

Recebido: 17/03/2022 | Revisado: 25/03/2022 | Aceito: 29/03/2022 | Publicado: 05/04/2022

## **Tayla Évellin de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5184-6549>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [taylaoliveira@hotmail.com](mailto:taylaoliveira@hotmail.com)

## **Paula Cristina Castro Andrade**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5031-9915>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [paulaufop@yahoo.com.br](mailto:paulaufop@yahoo.com.br)

## **Gisele de Fátima Esteves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5095-6161>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [gialfenas@hotmail.com](mailto:gialfenas@hotmail.com)

## **José Ricardo Mantovani**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9817-8143>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [jose.mantovani@unifenas.br](mailto:jose.mantovani@unifenas.br)

## **Adriano Bortolotti da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1316-8243>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [adriano.silva@unifenas.br](mailto:adriano.silva@unifenas.br)

## **Thiago Corrêa de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4991-7704>  
Universidade Federal de Alfenas, Brasil  
E-mail: [thiago.souza@unifal-mg.edu.br](mailto:thiago.souza@unifal-mg.edu.br)

## **Moacir Pasqual**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5612-9186>  
Universidade Federal de Lavras, Brasil  
E-mail: [mpasqual@ufla.br](mailto:mpasqual@ufla.br)

## **Ligiane Aparecida Florentino**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9092-3017>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [ligiane.florentino@unifenas.br](mailto:ligiane.florentino@unifenas.br)

## **Resumo**

O objetivo deste estudo foi isolar bactérias presentes no rejeito de mineração e avaliar sua tolerância ao metal manganês. O isolamento dos microrganismos foi realizado a partir do rejeito coletado no município de Mariana, Minas Gerais, proveniente da área contaminada por lama de mineração em decorrência do rompimento da barragem de Fundão. Foram obtidos quatro isolados, que foram submetidos aos testes de coloração de Gram e tolerância ao manganês. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e três repetições, sendo que cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. Os isolados BRM1 e BRM2 foram os mais tolerantes ao manganês, apresentando boas perspectivas de aplicação em áreas contaminadas por esse metal.

**Palavras-chave:** Contaminação do solo; Metais pesados; Remediação.

## **Abstract**

The aim of this study was to isolate bacteria present in mining tailings and assess their tolerance to manganese metal. The isolation of microorganisms was carried out from the tailings collected in the municipality of Mariana, Minas Gerais, from the area contaminated by mining mud as a result of the Fundão dam failure. Four isolates were obtained, which were submitted to Gram stain and manganese tolerance tests. The experimental design used was completely randomized with six treatments and three replications, with each Petri dish constituting an experimental unit. The isolates BRM1 and BRM2 were the most tolerant to manganese, showing good prospects for application in areas contaminated by this metal.

**Keywords:** Ground contamination; Heavy metals; Remediation.

## Resumen

El objetivo de este estudio fue aislar las bacterias presentes en los relaves mineros y evaluar su tolerancia al manganeso metálico. El aislamiento de microorganismos se realizó a partir de los relaves recogidos en el municipio de Mariana, Minas Gerais, del área contaminada por lodos mineros como consecuencia de la rotura de la represa de Fundão. Se obtuvieron cuatro aislamientos, los cuales fueron sometidos a tinción de Gram y pruebas de tolerancia al manganeso. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con seis tratamientos y tres repeticiones, constituyendo cada caja de Petri una unidad experimental. Los aislados BRM1 y BRM2 fueron los más tolerantes al manganeso, mostrando buenas perspectivas de aplicación en áreas contaminadas por este metal.

**Palabras clave:** Contaminación del suelo; Metales pesados; Remediación.

## 1. Introdução

O maior desastre da história da mineração no Brasil ocorreu em 2015 na cidade de Mariana-MG, com o rompimento da barragem do Fundão, foram mais de 50 milhões de metros cúbicos de rejeito extravasado, que devastaram uma área de aproximadamente 600 km<sup>2</sup>, ocasionando consequências imensuráveis desde Minas Gerais até o Espírito Santo (Lopes et al., 2016; Segura et al., 2016; Andrade et al., 2018).

A recomposição da biodiversidade foi comprometida devido à espessa camada de sedimento que soterrou o solo e percorreu as margens dos afluentes, formado um Tecossolo, com pH alcalino, elevada densidade, baixa porosidade, e teores de matéria orgânica, nutrientes e capacidade de troca catiônica (CTC) muito baixos, além de teores elevados de ferro (Fe) e manganês (Mn) (Silva et al., 2021).

O Mn é requerido pelas plantas e pelos microrganismos em pequenas quantidades, e quando em excesso pode tornar-se extremamente tóxico, por ser um metal pesado. Existem poucos relatos de intoxicação por Mn via oral, a forma mais comum é por via inalatória, contudo, estudos relatam que a exposição a esse metal pode causar déficits intelectuais (Giaia, 2016; Vasconcellos et al., 2021).

Conhecer técnicas seguras e eficientes de tratamento do Mn é fundamental, visto que a maioria dos processos utilizam oxigênio molecular, cloro, dióxido de cloro, permanganato de potássio ou ozônio, elevando o pH próximo do neutro, que precipita os íons de Fe e Mn. (Apolinário et al., 2018). Esses tipos de remoção podem ser ineficientes ou gerar subprodutos, além de serem longas e onerosas. (Queiroz et al., 2018).

No entanto, o tratamento biológico (biorremediação) do Mn tem se mostrado uma alternativa com alta sustentabilidade ecológica, comparado aos tratamentos convencionais físico-químicos (Mehrotra et al., 2021). Esse processo de degradação pode ser realizado de forma individual ou em consórcio, com microrganismos nativos, direta ou indiretamente, visto que os microrganismos estão presentes na natureza e tendem a desempenhar um papel de remoção e ou conversão de contaminantes (Gaylard et al., 2005; Queiroz et al., 2018; Kapahi, & Sachdeva, 2019).

Após o desastre ocorrido na região de Mariana-MG, é iminente a preocupação ambiental, em virtude da extensão das áreas atingidas. Assim, há um grande interesse em novas alternativas, que busquem recuperar essas áreas de forma eficiente. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo isolar bactérias presentes no rejeito de mineração e avaliar sua tolerância ao metal manganês.

## 2. Metodologia

### 2.1 Identificação do rejeito utilizado no experimento

O isolamento dos microrganismos foi realizado a partir da coleta de amostra do rejeito de mineração, em local situado a cerca de 10 km do ponto de rompimento da barragem de Fundão (coordenadas UTM 669690 Oeste, 779984 Sul), 27 meses após a ocorrência do desastre ambiental.

A caracterização química do rejeito de mineração foi realizada de acordo com Raij et al (2001), cujos valores são

apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização química do rejeito de mineração utilizado no experimento.

pH em H <sub>2</sub> O	7,8
MO g kg <sup>-1</sup>	2,7
P mg kg <sup>-1</sup>	12
K mg kg <sup>-1</sup>	16
Ca cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	1,5
Mg cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,1
Al cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,04
H+Al cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,6
SB cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	1,6
CTC cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	2,2
m %	2,4
V %	72
Fe mg dm <sup>-3</sup>	55.212
Mn mg dm <sup>-3</sup>	562

H+Al: acidez potencial; MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions, a pH 7,0; m (%): saturação por alumínio; V (%): saturação por bases. Fonte: Autores.

## 2.2 Isolamento dos microrganismos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Solo (LMS) da Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, campus de Alfenas, por meio da técnica de diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ).

Para o preparo da diluição, 10g de solo foram homogeneizados em 100 ml de solução salina – Cloreto de sódio (NaCl) 0,55%. Transferiu-se um 1 desta solução para um tubo de ensaio contendo 9 ml da mesma solução salina, e assim sucessivamente até a diluição de  $10^{-6}$ . De cada diluição foi retirada uma alíquota de 1 ml e inoculou-se em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente. As placas foram incubadas em estufa a 25°C por um período de 72 horas.

As colônias que apresentaram aparência semelhante à bactéria foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente por 48 horas, tempo suficiente para a formação de colônia isolada e confirmação da pureza. Foram obtidos 4 isolados, aqui denominadas como: BRM1, BRM2, BRM3 e BRM4.

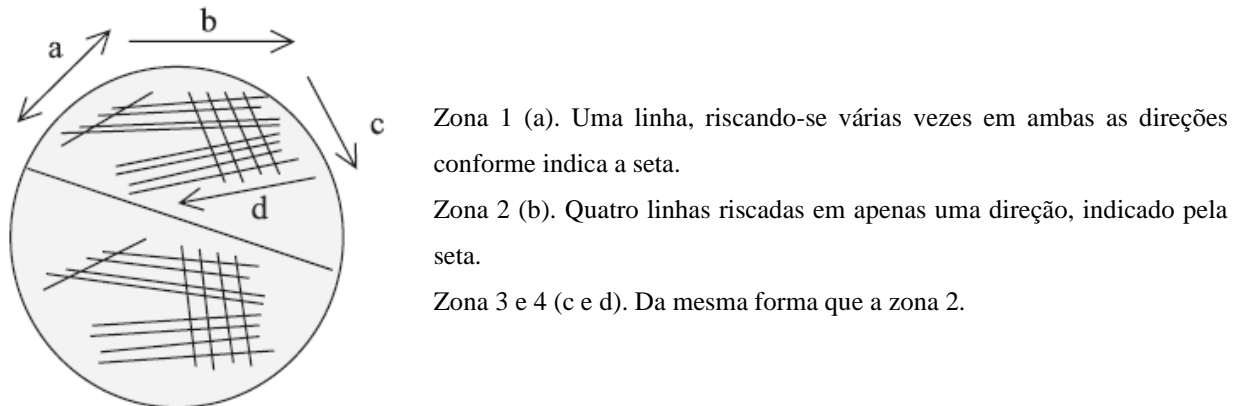
## 2.3 Coloração de Gram

Os isolados foram caracterizados pelo teste de coloração de Gram para identificá-los como Gram-positivos ou Gram-negativos. Para isso, uma única colônia isolada foi retirada com o auxílio de uma alça, e realizou-se o esfregaço em lâmina de vidro; o esfregaço foi coberto com violeta-de-metila por aproximadamente 15 segundos; adicionou-se água por 45 segundos; lugol diluído (1/20) por um minuto; novamente adicionou-se água corrente; álcool etílico (99,5° GL), água corrente; safranina por 30 segundos; e por fim, foi lavada e seca ao ar livre. Para a visualização foi utilizado óleo de imersão e microscópio com objetiva de 100x.

## 2.4 Teste de tolerância ao manganês (Mn)

Também foi realizado um teste de tolerância ao Mn, no qual o meio de cultura ágar nutriente foi preparado juntamente com sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>) em 6 concentrações diferentes: 0, 20, 40, 80, 120 e 320 µM. Os isolados foram repicados de acordo com o método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) (Figura 2).

**Figura 2.** Ilustração do método de riscagem.

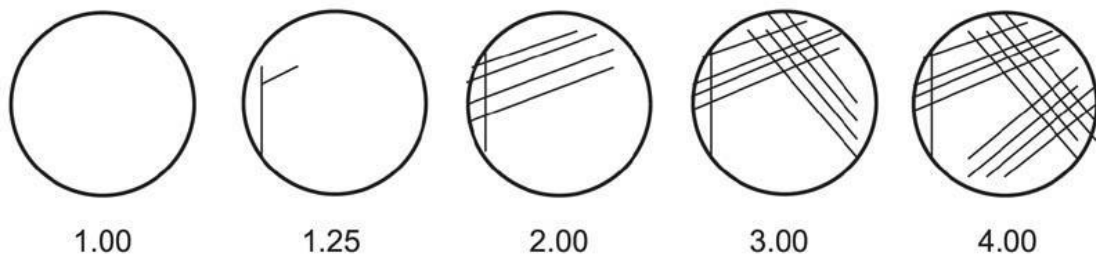


Fonte: Oliveira e Magalhães (1999).

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 3 repetições, sendo que cada placa de Petri constituiu 1 unidade experimental.

A avaliação foi efetuada ao sexto dia, onde o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa de Petri foi observado e foram dados os valores para o crescimento de cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível na placa) a 4 (máximo crescimento em todas as zonas), seguindo a escala apresentada por Oliveira e Magalhães (1999) (Figura 3).

**Figura 3.** Escala para avaliação de tolerância.



Fonte: Oliveira e Magalhães (1999).

### 3. Resultados e Discussão

Nas condições estudadas, observou-se que 2 isolados mostraram tolerância ao manganês quando submetidos ao experimento laboratorial utilizando o método de riscagem.

Na Tabela 2 está apresentada a caracterização dos isolados pelo teste de coloração de Gram. Observa-se que os isolados BRM1 e BRM2 foram classificados como Gram-negativos e o BRM3 e BRM4 como Gram-positivos.

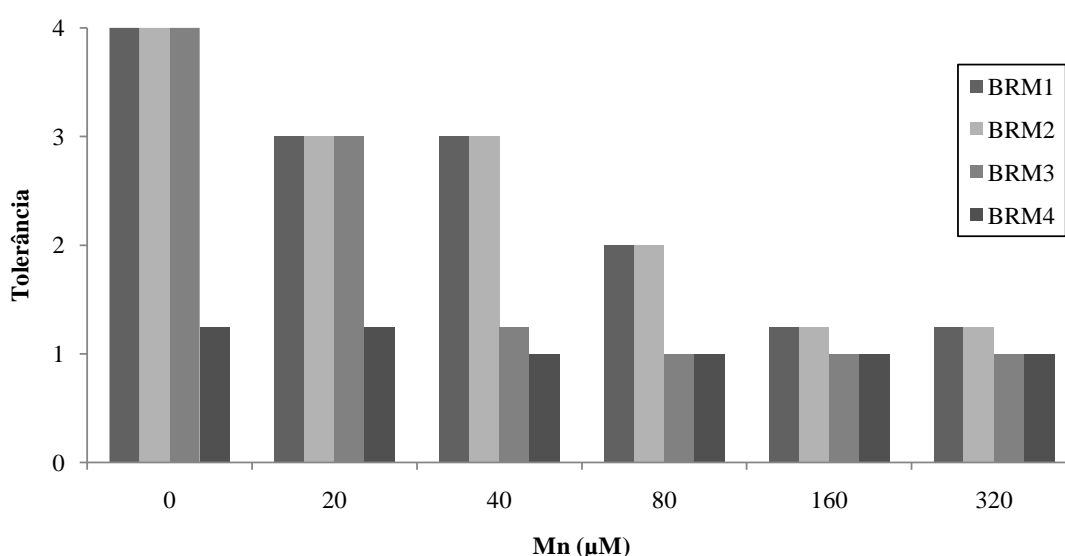
**Tabela 2.** Caracterização dos isolados pelo teste de coloração de Gram.

Isolados	Gram
BRM1	-
BRM2	-
BRM3	+
BRM4	+

(+): positivo; (-): negativo. Fonte: Autores.

Analisando a tolerância dos isolados em meio de cultura preparado com diferentes concentrações de Mn, verificaram-se que os isolados BRM1 e BRM2 demonstraram maior tolerância (Figura 4).

**Figura 4.** Tolerância dos isolados replicadas em meio de cultura preparado com diferentes concentrações de manganês (Mn).



Fonte: Autores (2022).

O padrão de crescimento de todos os isolados testados foi reduzido com o aumento da concentração de Mn no meio de cultura. Os isolados BRM1 e BRM2 apresentaram o mesmo modelo de desenvolvimento de colônia nas diferentes concentrações e toleraram até 320 μM de Mn. O isolado BRM3 teve tolerância máxima a concentração de 40 μM e o BRM4 tolerou apenas até 20 μM, sendo, portanto, o mais sensível ao Mn.

A literatura relata que a aquisição de íons metálicos é essencial para a sobrevivência dos microrganismos no ambiente. Entretanto, é imprescindível que a captação e a disponibilidade do metal estejam de acordo com as necessidades da bactéria (Porcheron et al., 2013). O Mn exerce papel fundamental em diversos processos celulares e contribui como constituinte e ativador de enzimas (Kehres & Maguire, 2003; Kirkby & Römheld, 2007), contudo, quando emanado em altas concentrações pode causar efeito deletério aos microrganismos, ambiente e à saúde (Porcheron et al., 2013; Paganini et al., 2015; Rigueti et al., 2015).

A tolerância apresentada pelos isolados BRM1 e BRM2 demonstra grande importância prática, visto que há uma crescente busca por técnicas de remediação de áreas contaminadas por metais pesados. Diversos autores têm verificado potencial de biorremediação por bactérias (Chaer et al., 2011; Wei et al., 2014; Abreu et al., 2021).

Quanto à caracterização pelo teste de coloração de Gram, verifica-se que os isolados mais tolerantes ao Mn foram classificados como Gram-negativos. Sabe-se que os organismos Gram-negativos possuem uma parede celular mais fina que é

envolvida por uma membrana externa (Neidhardt et al., 1990). No entanto, Porcheron et al. (2013) citam que a captação de Mn através da membrana externa ainda não é bem definida em bactérias Gram-negativas.

É fundamental que se faça estudos preliminares “*in vitro*” para auxiliar na escolha de isolados mais eficientes para estudos em campo.

#### 4. Conclusão

Os isolados BRM1 e BRM2 foram os mais tolerantes ao manganês, apresentando boas perspectivas de aplicação em áreas contaminadas por esse metal.

Estudos posteriores devem ser realizados visando avaliar o desempenho desses isolados em campo.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

#### Referências

- Abreu, M. G. P., Mendes Filho, P. F., Leite, H. M. F., Araújo, M. L., Santos, T. A., Tavella, L. B., Albuquerque, G. H. S. & Araújo, J. M. (2021). Tolerância e eficiência de rizóbios nativos de área de mineração de manganês no desenvolvimento de *Vigna unguiculata* L. (Walp.). *Brazilian Journal of Development*, 7 (4), 40354-40375.
- Andrade G. F., Paniz F. P., A. C. Martins A. C. Rocha B. A., Lobato A. K. S., Rodrigues J. L., Gustavson P. C., Masuda H. P. & Batista B. L. (2018). Agricultural use of Samarco's spilled mud assessed by rice cultivation: A promising residue use? *Chemosphere*, 193, 892-902.
- Apolinário, M. F., Meireles, L. M., Silva, D. J. & Santana, H. F. (2018). Evaluation of removal of iron and water manganesides using hydrogen peroxide as oxidizing agent. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4 (4), 0412-0419.
- Chaer, G. M., Resende, A. S., Campello, E. F. C., de Faria, S. M., & Boddey, R. M. (2011). Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. *Tree Physiology*, 31 (2), 139-149.
- Gaylard, C. C., Bellinaso, M. L. & Manfio, G. P. (2005). Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília*, 8 (34), 36-43.
- Gaia. Grupo Independente para Avaliação do Impacto Ambiental. (2016). Relatório Técnico: *Determinação de metais na bacia do Rio Doce*.
- Kapahi, M. & Sachdeva, S. (2019). Bioremediation options for heavy metal pollution. *Journal of Health and Pollution*, 9 (24), 191-203.
- Kehres, D. G. & Maguire, M. E. (2003). Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (3), 263–290.
- Kirkby, E. A. & Römheld, V. (2007). Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Informações agrônomicas*, 118(2), 1-24.
- Lopes, L. M. N. (2016). Orompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais. *Sinapse múltipla*, 5(1), 1-14.
- Mehrotra, T. Dev, S., Banerjee, A., Chatterjee, A., Singh, R., & Aggarwal, S. (2021). Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (5), 105920.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Schaecuter, M. (1990). *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Massachusetts: Sinauer, 506p.
- Oliveira, L. A. & Magalhães, H. P. (1999). Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Rev. Microbiol.*, 30, 203-208.
- Paganini, É. R., Manzini, F. F. & De Almeida, P. L. M. (2015). Comportamento da concentração do metal manganês no solo de acordo com a sazonalidade. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, 11 (8).
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., & Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 90.
- Queiroz, P. S., Barboza, N. R., Cordeiro, M. M., Leão, V. A. & Guerra-Sá, R. (2018). Rich growth medium promotes an increased Mn (II) removal and manganese oxide production by *Serratia marcescens* strains isolates from wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 140, 148-156.
- Raij, B. V., Andrade, J. C., Cantarella, H. & Quaggio, J. A. (2001). *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Instituto Agrônomo, Campinas. 285p.
- Riguetti, P. F., Cardoso, C. A. L., Cavalheiro, A. A., Lenzi, E., Fiorucci, A. R., & Silva, M. S. D. (2015). Manganês, zinco, cádmio, chumbo, mercúrio e cromo no chorume de aterro sanitário em Dourados, MS, Brasil. *Revista Ambiente & Água*, 10 (1), 153-163.

Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., & Batista, B. L. (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813-825.

Silva, A. O., da Silva, A. P. V., Barbosa, M. V., Batista, É. R., Bastos, R. S., Santiago, F. L. A., & Carneiro, M. A. C. (2021). Serviços ecossistêmicos em áreas afetadas pela deposição de rejeito da mineração de ferro. *Dia D do Rio Doce*, 11.

Vasconcellos, C. D. O., da Costa, A. S. V., Rodrigues, J. L., Campos, R. S. F., Santos, M. S., de Carvalho Hott, R., & Neto, W. D. (2021). Análise do manganês em solos de áreas ciliares do Parque Estadual do Rio Doce após o rompimento da barragem de Fundão em Mariana/MG. *Research, Society and Development*, 10 (1), e39410111720-e39410111720.

Wei, Y., Hou, H., ShangGuan, Y., Li, J. & Li, F., (2014). Genetic diversity of endophytic bacteria of the manganese-hyperaccumulating plant *Phytolaccaamericana* growing at a manganese mine. *Eur. J. Soil Biol.* 62, 15–21.