

ALEX SILVA SANTOS

**INFLUÊNCIA DE MICRORGANISMOS E MATÉRIA
ORGÂNICA NA DISSOLUÇÃO REDUTIVA DE FERRO
E MANGANÊS NOS RIOS DOCE E GUALAXO DO
NORTE**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2019**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Carolina Neumann Keim.

FICHA CATALOGRÁFICA

S194i Santos, Alex Silva

Influência de microrganismos e matéria orgânica na dissolução redutiva de ferro e manganês nos rios Doce e Gualaxo do Norte / Alex Silva Santos. -- Rio de Janeiro: UFRJ, 2019.

xi, 53 f. : il ; 30cm

Orientadora: Carolina Neumann Keim.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2019.

Bibliografia: f. 47-53.

1.Rio Doce. 2.Redução dissimilatória de ferro. 3. Metais pesados. 4. Ferro. 5. Manganês. I. Keim, Carolina Neumann II. UFRJ. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. III. Influência de microrganismos e matéria orgânica na dissolução redutiva de ferro e manganês nos rios Doce e Gualaxo do Norte.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Alex Silva Santos**
 DRE: 116058305

BANCA EXAMINADORA: Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicious (Presidente)
 Dr. Jefferson Bomfim Silva Cypriano
 MSc. Gabriel Oliveira de Carvalho
 Profa. Fernanda de Ávila Abreu (Suplente)

Título da Monografia: **“INFLUÊNCIA DE MICRORGANISMOS E MATÉRIA
 ORGÂNICA NA DISSOLUÇÃO REDUTIVA DE FERRO E MANGANÊS
 NOS RIOS DOCE E GUALAXO DO NORTE”**

Local: **Sala 10-59/ IMPPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **05 de dezembro de 2019 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 05 de12..... de 2019.

NOTA

10,0

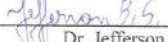
10,0

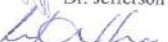
10,0

Banca Examinadora:


 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicious


 Dr. Jefferson Bomfim Silva Cypriano


 MSc. Gabriel Oliveira de Carvalho


 Profa. Fernanda de Ávila Abreu

Aluno:


 Alex Silva Santos

Orientador:


 Profa. Carolina Neumann Keim

Coordenador
 de TCC


 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todos os esforços para garantir meus estudos e pelos ensinamentos de vida, custeio financeiro para morar e estudar em outro estado e apoio emocional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carolina Neumann Keim, pela orientação e apoio para a realização desse trabalho, incluindo auxílio desde os primeiros meses de orientação no desenvolvimento de aptidão para aplicação de metodologias, correções extensivas de relatórios, pôsteres e apresentações e auxílio teórico. Apesar das dificuldades, sempre tentamos lidar com as inconsistências da melhor forma.

Ao Pedro e Ana por me ajudarem nas incessantes baterias de quantificação por ferrozina e na preparação de reagentes, além da companhia no laboratório.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Leveduras, por permitir utilização dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Farina, pelo apoio cedendo equipamentos e reagentes.

Aos integrantes do Laboratório de Desenvolvimento Analítico-UFRJ, pela realização das análises em ICP-OES.

À Mirian, Carol e Dani por se disponibilizarem a me ensinar as metodologias de quantificação de biopolímeros prontamente na UFF.

À equipe do CENABIO pelo auxílio na obtenção das imagens de microscopia.

À Consuela, Úrsula e Michel por desde o início estarem juntos comigo na graduação e no cafezinho, compartilhando alegrias, surtos, trancamentos e desesperos, sempre com um sorriso no fim do dia.

Menção honrosa para Larissinha, Isadora e Day (não guardo rancor), que apesar de não estarem próximas, de certa forma me ajudaram a se estabelecer no RJ ou a tornar tudo mais fácil.

Thaís, apesar do estresse que você me fez passar durante o ano, também rendeu bons risos que foram combustíveis para escrever isso aqui.

Ao Vini e Stefany, meus melhores amigos, que apesar da distância de centenas de quilômetros, sempre senti a presença de certa forma, mesmo não conseguindo corresponder.

À Nina, por aguentar com um pouco de resistência algum tempo sem atenção exclusiva para que eu pudesse escrever este trabalho.

Aos Membros da banca por disponibilizarem tempo e conhecimento para avaliar este trabalho.

Feliz é a sorte da inocente dorsal?
Esquecendo o mundo e o mundo a esqueceu.
O brilho eterno da mente sem lembranças.
Aceita todas as preces e abre mão de todos os desejos.

Brilho Eterno de uma Mente Sem Lembranças

RESUMO

ALEX SILVA SANTOS

INFLUÊNCIA DE MICRORGANISMOS E MATÉRIA ORGÂNICA NA DISSOLUÇÃO REDUTIVA DE FERRO E MANGANÊS NOS RIOS DOCE E GUALAXO DO NORTE

O ciclo biogeoquímico do ferro (Fe) envolve a alternância entre Fe(II) e Fe(III), sendo Fe(II) mais solúvel e Fe(III) menos solúvel. Nos ambientes aeróbios, Fe(II) é oxidado a Fe(III) pelo O₂, seguido de precipitação. Nos ambientes anaeróbios, o Fe(III) pode ser reduzido por microrganismos quimio-organotróficos, gerando Fe(II). O manganês (Mn) comporta-se de modo similar, onde Mn(II) é mais solúvel e Mn(IV) menos solúvel, sendo a forma intermediária Mn(III) instável. O aporte de rejeito de mineração de Fe ao Rio Doce e afluentes a partir de 2015, quando ocorreu o rompimento da barragem do Fundão em Mariana-MG, pode ter diversas consequências a longo prazo, dentre elas a dissolução redutiva de minerais de Fe contidos no rejeito, acoplada a oxidação de matéria orgânica. Além de Fe e Mn, outros elementos presentes em baixas concentrações poderiam ser mobilizados. O objetivo deste trabalho é avaliar a influência de microrganismos nativos e da matéria orgânica sobre a dissolução redutiva do Fe(III) a Fe(II) e de Mn(VI) a Mn(II,III) nos sedimentos do Rio Doce e afluentes, e sobre a liberação de outros elementos químicos para a fase aquosa. Para isto, coletamos amostras de água e sedimentos nos rios Doce e Gualaxo do Norte, e preparamos culturas de enriquecimento e microcosmos anaeróbios com adição ou não de substratos orgânicos. As concentrações de Fe(II) e Mn(II,III) foram medidas utilizando métodos colorimétricos. A concentração dos outros elementos foi quantificada em ICP-OES. Os minerais foram identificados por difração de raios X e caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão. Nas culturas de enriquecimento, houve aumento nas concentrações de Fe(II) em relação aos controles, e o óxido de ferro utilizado como fonte de Fe(III) foi convertido em magnetita ($\text{Fe}^{2+}\text{O}\cdot\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_3$), indicando que microrganismos que fazem a redução dissimilatória de ferro estão presentes e ativos no Rio Gualaxo do Norte. Experimentos com adição de substratos orgânicos a microcosmos mostraram concentrações de Fe(II) e Mn(II) maiores que os controles, mostrando a importância da matéria orgânica na dissolução redutiva do Fe e do Mn. A adição de glicose levou a concentrações de Fe(II) até 30.000 vezes maiores que o preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005 para Fe(solúvel), e 110 vezes maiores que o limite superior para Mn(total) na fase líquida dos microcosmos. As concentrações de Fe(II) e Mn(II,III) nos microcosmos se mostraram dependentes das concentrações de substrato orgânico. Al, Ba e Zn apresentaram concentrações acima do preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005. Nossos resultados indicam que a oxidação de matéria orgânica em anaerobiose pode ser acoplada a redução de Fe(III) e/ou Mn(IV) por microrganismos nativos, levando a dissolução de minerais, e liberação de Fe, Mn, Al, Ba e Zn para a água do Rio Doce e afluentes atingidos por rejeito de mineração de ferro. Em anaerobiose, o Fe(II) pode permanecer solúvel, ou precipitar em minerais secundários, como a magnetita. Desta forma, o controle do aporte de matéria orgânica seria importante para controlar a dissolução redutiva de Fe e Mn e as concentrações de Al, Ba e Zn, e melhorar a qualidade química da água do Rio Doce e afluentes.

Palavras-chave: Rio Doce. Redução dissimilatória de ferro. Metais pesados. Ferro. Manganês.

ABSTRACT

ALEX SILVA SANTOS

INFLUENCE OF MICROORGANISMS AND ORGANIC MATTER IN REDUCTIVE DISSOLUTION OF IRON AND MANGANESE IN DOCE AND GUALAXO DO NORTE RIVERS

The biogeochemical cycle of iron (Fe) involves alternancy of Fe(II) and Fe(III), being Fe(II) the most soluble and Fe(III) least soluble. In aerobic environments, Fe(III) can be reduced by chemo-organotrophic microorganisms, producing Fe(II). Manganese (Mn) behave in a similar way, since Mn(II) is most soluble and Mn(IV) least soluble, being the intermediate Mn(III) unstable. The delivery of Fe mining tailings to Doce River and tributaries from 2015 on, when Fundão Dam failure occurred in Mariana-Mg, can have several consequences in the long term, such as reductive dissolution of Fe minerals from the tailings, coupled to oxidation of organic matter. Besides Fe and Mn, other elements present in low concentrations could be mobilized. The objective of this work is to evaluate the influence of native microorganisms and organic matter on reductive dissolution of Fe(III) to Fe(II) and Mn(IV) to Mn(II,III) in the sediments of Doce River and tributaries, and on the release of other chemical elements to the aqueous phase. For this, we collected samples of water and sediments in Doce and Gualaxo do Norte Rivers, and prepare anaerobic enrichment cultures and microcosms with or without organic substrates. The concentrations of Fe(II) and Mn(II,III) were evaluated by colorimetric methods. The concentrations of the other elements were quantified by ICP-OES. Minerals were identified by X-ray diffraction, and characterized by transmission electron microscopy. In enrichment cultures, there were increase in Fe(II) concentrations relatively to controls and the iron oxide used as Fe(III) source was converted into magnetite ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_3\text{O}_4$), indicating that microorganisms that perform dissimilatory iron reduction are present and active in Gualaxo do Norte River. Experiments with addition of organic substrates to microcosms showed Fe(II) and Mn(II,III) concentrations larger than controls, showing the importance of organic matter in reductive dissolution of Fe and Mn. Glucose addition led to Fe(II) concentrations up to 30000 times larger than the maximum level on CONAMA Resolution 357/2005 for Fe(soluble), and 110 times higher than the maximum value for Mn(total) in the liquid phase of microcosms. The concentrations of Fe(II) and Mn(II,III) in microcosms turned out to be dependent on the concentrations of organic substrates. Al, Ba and Zn showed concentrations above the limits of CONAMA Resolution 357/2005. Our results indicate that the anaerobic oxidation of organic matter can be coupled to Fe(III) and Mn(IV) reduction by native microorganisms, leading to mineral dissolution, releasing Fe, Mn, Al, Ba e Zn to the water of Doce River and tributaries affected by iron mining tailings. In anaerobiosis, Fe(II) can either remain soluble, or precipitate in secondary minerals, as magnetite. In this way, the control of organic matter delivery would be important for controlling reductive dissolution of Fe and Mn and the concentrations of Al, Ba and Zn, and increase chemical water quality of Doce River and tributaries.

Keywords: Doce River; dissimilatory iron reduction; heavy metals; iron; manganese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrando mecanismos de transferência de elétrons por bactérias que realizam a redução dissimilatória de ferro.....	4
Figura 2: Mapa político da bacia hidrográfica do Rio Doce. Adaptado de Portal de Acompanhamento das Ações dos Comitês da Bacia do Rio Doce.....	6
Figura 3. Elementos do patrimônio natural e cultural danificados pelo rompimento da barragem de rejeitos do Fundão.....	12
Figura 4: Locais de coleta.....	17
Figura 5: Concentrações de biopolímeros em amostras de sedimento do G1, G2 e GV.....	25
Figura 6: Evolução da fase sólida das culturas de enriquecimento.....	26
Figura 7: Difração de raios-X da fase sólida de culturas de enriquecimento de microrganismos que realizam redução dissimilatória de ferro no Rio Gualaxo do Norte.....	27
Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão da fase sólida de culturas de enriquecimento de microrganismos que realizam a redução dissimilatória de ferro no Rio Gualaxo do Norte.....	28
Figura 9: Concentrações de Fe(II) na fase líquida de microcosmos construídos com sedimentos e água coletados nos pontos G1, G2 e GV.....	30
Figura 10: Quantificação de Mn(II,III) na fase líquida de microcosmos após 63 dias de incubação.....	33
Figura 11: Análise quantitativa de elementos de interesse na fase líquida de microcosmos por ICP-OES.....	34
Figura 12: Quantificação de Fe(II) em microcosmos construídos a partir de água e sedimentos coletados no ponto GV, adicionados de glicose a 15 g/L.....	35
Figura 13: Quantificação de Fe(II) na fase líquida de microcosmos construídos com sedimentos e água coletados no ponto GV contendo concentrações crescentes de glicose....	36
Figura 14: Quantificação de Fe(II) e Mn(II, III) em microcosmos construídos a partir de água e sedimentos coletados no ponto GV, adicionados de ácidos orgânicos.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de metais explorados através de atividade mineradora no Brasil até o ano de 2018.....	7
Tabela 2: Maiores desastres envolvendo rompimento de barragens de mineração ao longo do tempo.....	11
Tabela 3: Coordenadas dos pontos de coleta.....	17
Tabela 4: Razão entre biopolímeros nos pontos de coleta.....	25
Tabela 5: Valores de P obtidos pelo teste t de Student a partir da comparação dos dados de concentração de Fe(II) de microcosmos experimentais e controles construídos com amostras obtidas no ponto G1.....	31
Tabela 6: Valores de P obtidos pelo teste t de Student a partir da comparação dos dados de concentração de Fe(II) de microcosmos experimentais e controles construídos com amostras obtidas no ponto G2.....	31
Tabela 7: Valores de P obtidos pelo teste t de Student a partir da comparação dos dados de concentração de Fe(II) de microcosmos experimentais e controles construídos com amostras obtidas no ponto GV.....	32
Tabela 8: Medidas de pH após 21 dias de incubação dos microcosmos.....	33
Tabela 9: Teste t de Student de microcosmos com produtos de fermentação como substratos orgânicos do ponto GV para Fe.....	38
Tabela 10: Teste t de Student de microcosmos com produtos de fermentação como substratos orgânicos do ponto GV (Mn).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC: Acetato

ATC: Controle com glicose 15 g/L autoclavado

ANA: Agência nacional de águas

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPRM: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais

DNPM: Departamento Nacional de Produção Mineral

EL: Extrato de leveduras

FCR: Reagente de Folin-Ciocalteu

G1: Ponto de coleta no Rio Gualaxo do Norte a montante do rejeito de mineração da SAMARCO

G2: Ponto de coleta no Rio Gualaxo do Norte a jusante do rejeito de mineração da SAMARCO

Gli: Glicose

GV: Ponto de coleta no Rio Doce em Governador Valadares

IBGE: Instituto brasileiro de geografia e estatística

SUPRAM: Superintendência Regional de Meio Ambiente

VV: Controle vivo

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Presença de metais no ambiente.....	1
1.2. Ciclo biogeoquímico do ferro (Fe) em ambientes aquáticos.....	1
1.3. Ciclo biogeoquímico do manganês (Mn) em ambientes aquáticos.....	2
1.4. Redução dissimilatória de ferro e manganês por microrganismos.....	3
1.4.1. Redução de ferro e manganês por microrganismos fermentadores.....	4
1.5. Rio Doce e Afluentes.....	5
1.6. Mineração.....	7
1.7. A SAMARCO mineração S.A.....	9
1.8. Rompimento de barragens de rejeito de mineração no mundo.....	10
1.8.1. Rompimento de barragem da SAMARCO mineração no município de Mariana-MG.....	10
1.8.2. Composição do rejeito de mineração de ferro da SAMARCO S.A.....	12
1.9. Associação de poluentes inorgânicos aos óxidos de ferro e manganês.....	13
1.10. Riscos à saúde mediante exposição a metais.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Coleta das amostras.....	16
4.2. Quantificação de biopolímeros.....	18
4.2.1. Carboidratos.....	18
4.2.2. Proteínas.....	18
4.2.3. Lipídeos.....	19
4.3. Preparação de culturas de enriquecimento com meio FWA.....	19
4.4. Caracterização microestrutural dos óxidos de ferro.....	20
4.5. Observação dos óxidos de Fe em microscópio eletrônico de transmissão.....	20
4.6. Preparação de microcosmos contendo diferentes substratos orgânicos.....	20
4.7. Quantificação de elementos dissolvidos em amostras de água.....	21
4.8. Detalhamento da Curva de crescimento das concentrações de Fe(II) na fase líquida	22
4.9. Glicose em diferentes concentrações.....	22
4.10. Redução de Fe(III) a Fe(II) utilizando produtos de fermentação como substratos orgânicos.....	22
4.11. Determinação das concentrações de Fe (II) em amostras de água.....	23
4.12. Determinação das concentrações de Mn (II, III) em amostras de água.....	23
4.13. Análise estatística.....	24

5. RESULTADOS.....	24
5.1. Análise de temperatura e pH dos pontos de coleta.....	24
5.2. Quantificação de biopolímeros nos sedimentos.....	24
5.3. Avaliação da redução dissimilatória de ferro e da produção de magnetita em culturas de enriquecimento.....	26
5.4. Avaliação das concentrações de Fe(II), Mn(II,III), e outros elementos na fase líquida de microcosmos utilizando substratos orgânicos não fermentável (acetato), simples fermentável (glicose), e complexo fermentável (extrato de leveduras).....	29
5.5. Avaliação detalhada das concentrações de Fe(II) ao longo do tempo em microcosmos utilizando a glicose a 15 g/L como substrato orgânico.....	35
5.6. Avaliação das concentrações de Fe(II) na fase líquida de microcosmos contendo concentrações crescentes de glicose.....	35
5.7. Acoplamento do consumo de ácidos orgânicos a redução de Fe(III) a Fe(II) e de Mn(IV) a Mn(II,III).....	36
6. DISCUSSÃO.....	38
6.1. Caracterização da matéria orgânica dos sedimentos dos rios Doce e Gualaxo do Norte.....	38
6.2. Culturas de enriquecimento de bactérias ferro-redutoras e a produção de magnetita.	39
6.3. Utilização de substratos orgânicos fermentáveis e não fermentável por microrganismos nativos e a redução de Fe (II) a Fe(III).....	40
7. CONCLUSÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Presença de metais no ambiente

Os metais podem ser definidos como elementos químicos que apresentam boa condutividade elétrica. Na forma pura, os metais se caracterizam por agrupamentos de cátions envoltos por nuvens de elétrons deslocalizados, levando a propriedades específicas e ligações entre eles distintas das ligações iônicas e covalentes (Gonçalves, 2003; Sciencedaily, 2019). Atualmente alguns metais possuem potencial de aplicação econômica em diversas áreas, devido a propriedades como rigidez, durabilidade, brilho e aparência.

Os metais compreendem em torno de 25% da composição total da crosta terrestre (Marshall, 2018). Estão dispostos pela superfície em padrões distintos, localizados majoritariamente em rochas e minerais, com distribuição pelo planeta influenciadas por metamorfização de rochas e minerais, interação com magma e perfis de erosão (Klee e Graedel, 2004; Sandatlas, 2019).

O intemperismo e erosão de rochas naturalmente ocasionam a introdução de metais na hidrosfera, associando-se ao corpo d'água ou sedimento (Zerfass e Anjos-Zerfass, 2016). Outras vias de introdução de metais a ambientes aquáticos são antrópicas, principalmente relacionadas a atividades de mineração, industriais, agricultura e disposição de águas residuais (Zouboulis *et al.*, 2004; Blázquez, Conde e Conde 2005).

1.2. Ciclo biogeoquímico do ferro (Fe) em ambientes aquáticos

Em nosso planeta, o Fe é ubíquo na hidrosfera, litosfera, biosfera e atmosfera (Halbach 1976; Schwertmann, Carson e Murad, 1987; Koschinsky e Halbach 1995; Banerjee *et al.* 1999; Belzile, Chen e Grenier, 2001; Palumbo, Horowitz e Prabhaker, 2001; Cornu *et al.*, 2005). Ele comumente é encontrado em dois estados de oxidação: ferro férrico ou Fe(III), e ferro ferroso ou Fe(II). Um terceiro estado de oxidação, Fe(0), é resultado da fundição de minérios de ferro, originando ferro metálico. O Fe(III) é altamente insolúvel e ocorre predominantemente em minerais, como óxidos e hidróxidos, enquanto que o Fe(II) é mais solúvel, podendo ocorrer na forma solúvel ou em minerais. Em ambientes aquáticos, o ciclo biogeoquímico do Fe é caracterizado por transformações redox mediadas por processos químicos ou microbianos em condições óxicas ou anóxicas, que envolvem eventos de dissolução e precipitação de minerais (Melton *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2016).

Em anaerobiose, o Fe(III) pode ser reduzido quimicamente ou microbiologicamente a Fe(II), que é mais solúvel, levando a dissolução dos minerais. A redução química pode ocorrer por reação com H₂S ou ácidos húmicos e fúlvicos ou catalisada por luz ultravioleta, enquanto que a redução microbiológica é catalisada por microrganismos heterotróficos, que podem ser tanto fermentadores quanto os que realizam a redução dissimilatória de ferro(III) (Lovley, 1987; Melton *et al.*, 2014). Na forma dissolvida, o Fe(II) pode se difundir para a coluna d'água ou permanecer precipitado. Quando o Fe(II) chega a regiões com presença de O₂ e pH neutro a alcalino, é rapidamente oxidado quimicamente a Fe(III), podendo também ser oxidado microbiologicamente, porém em menor escala (Kappler e Straub, 2005; Melton *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2016). O Fe(III) resultante precipita rapidamente formando minerais, como por exemplo ferrihidrita (5Fe₂O₃·9H₂O), lepidocrocita (γ-FeOOH), acaganeíta (β-FeO(OH,Cl)) e goethita (α-FeOOH) e tendem a sedimentar-se nos ambientes aquáticos. Em anaerobiose, o Fe(III) contido nestes minerais representam potenciais aceptores de elétrons para microrganismos quimio-organo-heterotróficos (Melton *et al.*, 2014).

1.3.Ciclo biogeoquímico do manganês (Mn) em ambientes aquáticos

O manganês, assim como o ferro, é um dos metais em transição mais abundantes da crosta terrestre (Tebo *et al.*, 2004), onde é encontrado em três estados de oxidação: Mn(II), Mn(III) e Mn(IV). O Mn(IV) é considerado insolúvel, ocorrendo principalmente em minerais, como MnO₂. Mn(III) é o estado de oxidação intermediário, sendo instável caso não esteja complexado. Mn(II) é o mais solúvel, e é relativamente estável em condições aeróbicas nos ambientes aquáticos, sendo oxidado pelo O₂ lentamente. Contudo, a oxidação de Mn(II) a Mn(III) e Mn(IV) por bactérias e fungos é cinco vezes mais rápida que a oxidação química, sendo assim os microrganismos são os principais mediadores na natureza (Tebo *et al.*, 2004). A oxidação seria vantajosa para microrganismos devido ao fato de que as formas de Mn oxidadas são altamente reativas, e protegeriam bactérias e fungos da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, poderiam oxidar matéria orgânica complexa, como os ácidos húmicos e fúlvicos, facilitando a assimilação desses compostos (Geszvain *et al.*, 2012). Óxidos e hidróxidos de Mn(III) e Mn(IV) são precipitados após oxidação, e tendem a sedimentar devido à alta densidade. Em condições anaeróbicas, podem ser reduzidos a Mn(II) por microrganismos quimio-organo-heterotróficos (Novotnik, *et al.*, 2019), e também por

íons comuns em ambientes anóxicos, como Fe^{2+} (Melton *et al.*, 2014; Findlay *et al.*, 2018) e S^{2-} (Findlay *et al.*, 2018).

1.4.Redução dissimilatória de ferro e manganês por microrganismos

Os microrganismos que são capazes de realizar redução dissimilatória de ferro e manganês associam a oxidação de matéria orgânica a redução de Fe(III) e Mn(IV) , reduzindo-os a Fe(II) e Mn(II) . Até o momento, são descritas quatro estratégias para a redução dissimilatória de ferro e manganês observadas em *G. metallireducens* e *S. putrefaciens* (Figura 1) (Kappler e Straub, 2005): (i), o contato direto entre a superfície da célula e os óxidos de ferro permite a entrega direta dos elétrons excedentes para a redução dissimilatória dos metais (Champine *et al.*, 2000; Nevin e Lovley, 2000; Magnuson *et al.*, 2001; Childers, Ciuffo e Lovley, 2002); (ii) a utilização de ligantes e/ou sideróforos presentes num complexo celular pode levar à dissolução de metais próximos ao biofilme bacteriano (Brutinel e Gralnick 2012); (iii) moléculas orgânicas solúveis são alternadamente reduzidas pelos microrganismos e oxidadas pelo Fe(III) ou Mn(IV) dos minerais, agindo como carreadores de elétrons extracelulares (electron shuttle) (Ross, Brantley e Tien, 2009); (iv) estruturas filamentosas extracelulares condutoras de eletricidade (píli ou nanowires) transferem elétrons da cadeia transportadora de elétrons da célula diretamente para os minerais de Fe(III) (Fitzgerald *et al.*, 2012). Como os óxidos de Fe(III) e de Mn(IV) são em geral bons condutores de eletricidade, não seria preciso reduzir cada átomo individualmente.

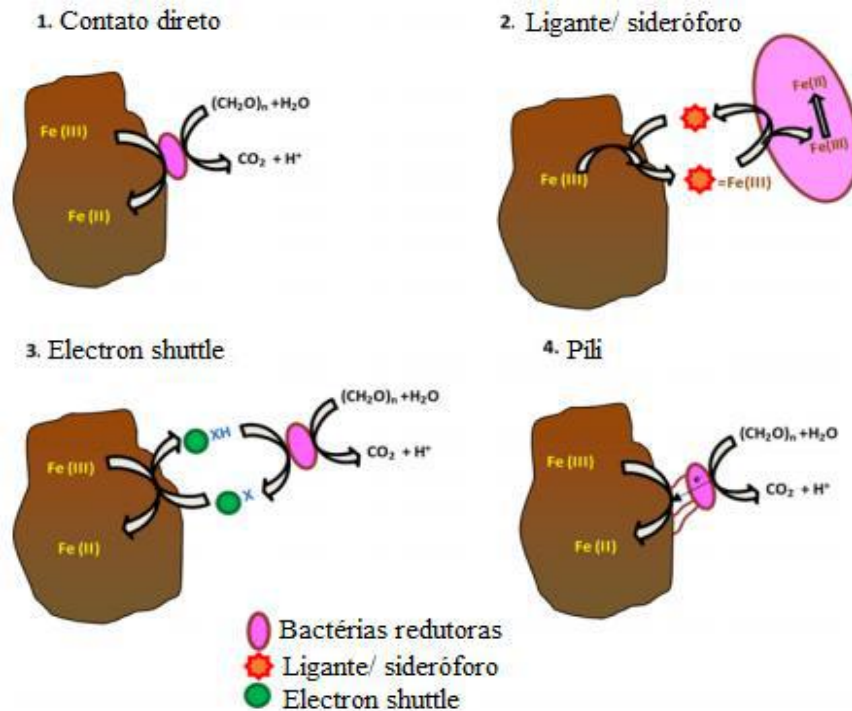


Figura 1: Esquema ilustrando mecanismos de transferência de elétrons por bactérias que realizam a redução dissimilatória de ferro (Esther *et al.*, 2015)

A bactéria *Shewanella putrefaciens* oxida parcialmente compostos orgânicos, como o formato, lactato ou H_2 , enquanto reduz óxidos de manganês (Nealson e Myers, 1992). Na presença de acetato e de $Fe(III)$ ou $Mn(IV)$ em minerais amorfos, em pH neutro, anaerobiose e temperaturas de incubação mesófilas, a bactéria gram negativa *Geobacter metallireducens* é capaz de realizar redução dissimilatória de $Fe(III)$ a $Fe(II)$ e de $Mn(IV)$ a $Mn(II)$, mediante oxidação de acetato a CO_2 . Também já foi descrita a oxidação completa de benzoato, tolueno, fenol e p-cresol a CO_2 por *G. metallireducens* utilizando $Fe(III)$ como acceptor final de elétrons (Lovley e Phillips, 1988).

1.4.1. Redução de ferro e manganês por microrganismos fermentadores

A dissolução redutiva de $Fe(III)$ e $Mn(IV)$ por microrganismos fermentadores foi descrita por Lovley e Phillips (1988) como uma via em duas etapas, onde a oxidação de substratos fermentáveis em anaerobiose, originaria produtos de fermentação que poderiam ser utilizados por microrganismos que utilizariam $Fe(III)$ e $Mn(IV)$ como aceptores finais de elétrons para respiração anaeróbia (figura 1), enquanto que a redução direta por microrganismos fermentadores seria ínfima e ocorreria através do direcionamento de elétrons

via ácidos húmicos (Straub, Benz e Schink, 2001). Desta forma, os protagonistas na redução de Fe e Mn no ambiente seriam microrganismos de metabolismo respiratório. Entretanto, Gounou *et al.*, (2010) mostrou a atividade fermentativa de *Clostridium* na presença de glicose em amostras de sedimento nos Rios Marne e Sena, relacionada à redução dissimilatória de Fe(III) e Mn(IV) e biodisponibilização de outros metais água do rio. A produção de lactato, acetato, propionato e butirato a partir da glicose, em anaerobiose, indica que nestes dois ambientes, comunidades de bactérias fermentadoras parecem desempenhar o papel de redutoras de ferro e manganês mais eficientemente que bactérias ferro-redutoras clássicas (Gounou *et al.*, 2010).

Também já foi mostrado que espécies de bactérias como *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus cereus*, encontradas em amostras de sistemas de distribuição de água para consumo da Virginia e Carolina do Norte (EUA) e de Honduras são capazes de realizar dissolução redutiva de Mn(IV) a Mn(II) e a oxidação de Mn(II) a Mn(III) e Mn(IV) em anaerobiose e aerobiose (Cerrato *et al.*, 2010). *Bacillus sphaericus* e *Pseudomonas saccharophila* são capazes de realizar a dissolução redutiva de Mn(IV) em anaerobiose (Cerrato *et al.*, 2010). Na presença de substrato fermentável e condições mesofílicas, a bactéria *Pelosinus fermentans* é capaz de realizar a redução de Fe(III) a Fe(II) (Shelobolina *et al.*, 2007). *Geoglobus acetivorans* acopla a oxidação de acetato, formato, piruvato, fumarato, malato, propionato, butirato e succinato a redução dissimilatória de Fe(III), tanto na forma sólida (óxidos de ferro) quanto solúvel (citrato férrico) (Slobodkina *et al.*, 2009). *Geoalkalibacter subterraneus* utiliza formato, acetato, malonato, propionato, piruvato, lactato, butirato, isobutirato, succinato, fumarato e valerato como doadores de elétrons para realizar a redução Fe(III), Mn(IV) e nitrato (Greene, Patel e Yacob, 2009).

1.5. Rio Doce e Afluentes

A Bacia do Rio Doce localiza-se na Região Sudeste, englobando 229 municípios, sendo 203 no estado de Minas Gerais e 26 no Espírito Santo (Figura 2). Sua nascente é localizada na Serra do Espinhaço, em Minas Gerais, de onde o rio percorre 850 km até chegar a sua foz no Oceano Atlântico (ANA, 2016).

Mais especificamente, a nascente do Rio Doce é localizada no Quadrilátero Ferrífero, região em Minas Gerais que possui aproximadamente 7000 km² e é caracterizada pela grande concentração de minérios de ferro, ouro e manganês (CPRM, 2019).

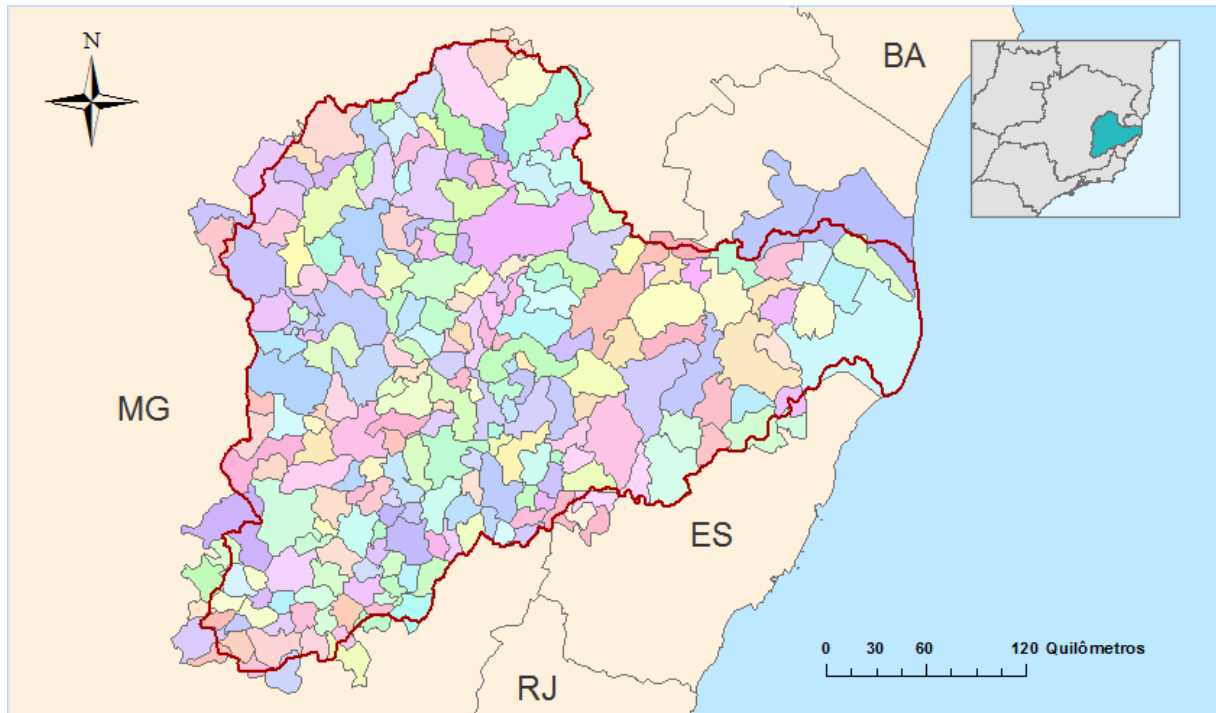


Figura 2: Mapa político da bacia hidrográfica do Rio Doce. Adaptado de Portal de Acompanhamento das Ações dos Comitês da Bacia do Rio Doce. Fonte: CBH-Doce (2019).

Na Bacia há a prevalência de 2 períodos pluviométricos bem delimitados: o período chuvoso, que se estende de outubro a março, no qual o índice pluviométrico varia de 800 a 1300 mm, e o período seco, que se estende de abril a setembro, com estiagem mais pronunciada e índice pluviométrico variando de 150 a 250 mm (ANA, 2016).

As atividades econômicas presentes na Bacia do Rio Doce são bem variadas, tendo destaque: a agropecuária; agroindústria sucroalcooleira; a mineração de ferro, ouro, bauxita, manganês, pedras preciosas e outros; a indústria de celulose, siderurgia e laticínios; comércio e serviços de apoio aos complexos industriais; e a geração de energia elétrica (ANA, 2016).

Os sedimentos de fundo e planícies inundáveis do Rio Doce e vários de seus afluentes tem sido submetidos a atividades mineradoras artesanais de ouro e prata (garimpo) desde o século XVII. No Rio Gualaxo do Norte, afluente do Rio Doce, as atividades de garimpo de ouro resultaram em assoreamento e revolvimento dos sedimentos dos rios, modificando a distribuição do arsênio. Com a introdução da amalgamação com mercúrio para extração do ouro, houve introdução de mercúrio, alterando o perfil sedimentar do Rio Gualaxo do Norte,

que já possuía altas concentrações de As e Fe nos sedimentos (Rodrigues *et al.*, 2013). Em regiões próximas a atividades de mineração, as concentrações principalmente de As, Fe e Mn são maiores, indicando influência da mineração na alteração do perfil sedimentar do Rio Gualaxo do Norte (Costa *et al.*, 2003).

No sedimento do Córrego Natividade, foram encontradas altas concentrações de Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, e Ti, mostrando as anomalias pontuais da região, acentuadas por 200 anos de atividades de garimpo e mineração de ouro, manganês e ferro (Costa *et al.*, 2003).

1.6. Mineração

O processo de mineração é definido pela pesquisa, exploração, extração e beneficiamento de minérios oriundos de rochas, solos e sedimentos (Sousa, 2019). A extração de minérios envolve processos físicos e químicos para separação dos minerais e metais de interesse.

No Brasil, a estrutura geológica continental permitiu a viabilidade econômica da mineração de Ferro-Fe, Manganês-Mn, Alumínio-Al, Estanho-Sn e Nióbio-Nb, entre outros (Melfi *et al.*, 2016). Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM, 2017), em 2017 haviam 155 minas cadastradas com produção de minerais de médio a grande porte que, além de abastecer a demanda nacional, exportavam minério beneficiado (Tabela 1). No caso da produção de amianto, bauxita, ferro, grafita, manganês, nióbio e tântalo, estas são encontradas nas posições mais altas nos rankings mundiais de fontes para estes minérios.

Tabela 1: Perfil de metais explorados através de atividade mineradora no Brasil até o ano de 2018.

Minério	Reserva (em 1000t)	Produção (t/ano)	% global	Situação	Principais minas
Amianto	10.515	304.321	15,2	Grande exportador (Player mundial, 4º)	Cana Brava (GO)
Bauxita	590.000	33.260.000	12,7	Grande exportador (Player mundial, 2º)	São Lourenço (MG), Juriti (PA), Oriximiná (PA), Paragominas (PA), Itamarati de Minas(MG).

Estanho	341.033	13.667.000	5,94	Exportador	Bom Futuro (RO), Massangana (RO), São Lourenço (RO)
Ferro	19.948.00	400.822.000	13,4	Grande exportador (Player mundial, 2°)	33 no Quadrilátero Ferrífero (MG), N4, N5 e S11 (PA)
Grafita	39.805	88.000	8	Grande exportador (Player mundial, 3°)	Tijuco Preto (MG), Imidia (BA), da Paca (MG), Zé Crioulo (MG)
Magnesita	239.342	479.000	7,4	Exportador	Brumado (BA)
Manganês	53.500	1.118.000	6,6	Exportador (Player mundial, 2°)	Azul (PA), Lucas (MG), Urucum (MS), Comin (MS), Buritirama (PA), Morro da Mina (MG)
Nióbio	10.565	82.214	93,52	Grande exportador (Player mundial, 1°)	Barreiro (MG), Boa Vista (GO).
Níquel	8.658	139.531	6,2	Exportador	Santa Rita (BA), Buriti (GO), Barro Alto (GO), Niquelândia (GO), Onça-Puma (PA)
Ouro	2,6	67	2,5	Exportador	Fazenda Nova (GO), Aurizona (MA), Jacobina (BA), Morro do Ouro (GO), Pedra Branca do Amapari (AP), Crixás (GO), São Vicente (MT), São Francisco (MT), Santa Bárbara (MG), Sabará (MG), Cocais (MG), Caeté (MG).
Tântalo	35	118	16,8	Grande exportador (Player mundial, 2°)	Garimpos

Fonte: Anuário mineral brasileiro, DNPM, 2017.

1.7. A SAMARCO mineração S.A.

Atualmente a exploração mineral é representada nacionalmente principalmente pela Vale S.A., com produção de minério de ferro, zinco, manganês, carvão mineral e cobre (Vale, 2017), pela SAMARCO tendo atuação na produção de minério de ferro (SAMARCO, 2019) e a CBMM com exploração de nióbio (CBMM, 2019).

A SAMARCO S.A. é uma empresa que atua no segmento de mineração de ferro, com mercado de exportação para países dos continentes americano, asiático e europeu, sendo a segunda mineradora com maior valor de venda em território nacional (SAMARCO, 2019). Foi fundada em 1977, e atualmente é controlada em conjunto pela Vale S.A. e BHP Billiton. A empresa possui duas unidades de caráter operacional: Unidade Germano, localizada entre Mariana e Ouro Preto-MG, onde ocorre a extração e processamento inicial do minério, e a Unidade Ubu, localizada em Anchieta-ES, onde ocorre a pelotização do minério (SAMARCO^a, 2016). As atividades operacionais da SAMARCO S.A. estão interrompidas desde o rompimento da Barragem do Fundão, em Mariana-MG (Mansur, 2019).

O processo produtivo da SAMARCO S.A. compreendia etapas de lavragem, britagem, moagem e flotação para obtenção de um concentrado para produção de pelotas de ferro beneficiado com teor de 67,5% de ferro a partir do minério com 46% de pureza (SAMARCO, 2011). As etapas de moagem e britagem tinham como objetivo reduzir as dimensões das partículas para aumentar a superfície de contato para as etapas posteriores. A etapa de flotação é definida por um processo onde partículas sólidas de caráter heterogêneo podem ser separadas de acordo com características das superfícies em diferentes fases, num sistema aquoso utilizando uma fonte gasosa para auxiliar na separação (Totou, 2010). O processo de flotação realizado pela SAMARCO S.A. utilizava amido de milho, devido a propriedade química das moléculas de amido que tendem a formar grãos associados a fase de hematita do minério na porção inferior do flotador, ocorrendo a separação da porção de quartzo na porção superior do flotador. Para maximizar a atividade, era utilizado NaOH para aumentar o pH e melhorar a capacidade de separação da hematita (Fouchee *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019), e eteraminas, moléculas aminadas que atuam como bons coletores catiônicos para obtenção da hematita durante o processamento, utilizando uma mistura de monoaminas e diaminas (Papini, Brandão e Peres, 2001), permitindo uma maior pureza da polpa.

1.8. Rompimento de barragens de rejeito de mineração no mundo

Até o ano 2000, haviam 18.000 minas em operação no mundo, havendo uma taxa de rompimento de barragens de 1,2% (ICOLD, 2001). Na tabela 2 são ranqueados desastres relacionados ao rompimento de barragens de mineração de acordo com as dimensões de rejeitos liberados.

Até o momento, o desastre com maior lançamento de rejeitos de mineração no mundo ocorreu no município de Mariana, Minas Gerais, na Mina de Germano, gerenciada pela SAMARCO mineração S.A, levando ao aporte de 32,6 milhões de m³ de rejeitos de mineração de ferro (SAMARCO^b, 2016) (tabela 2), seguido do desastre em Mount Polley, o maior desastre ambiental do Canadá desde que existem registros históricos, que afetou lagos e a floresta local através de um rejeito rico em arsênio, chumbo, mercúrio, selênio, fósforo e outras substâncias (Marshall, 2018).

Tabela 2: Maiores desastres envolvendo rompimento de barragens de mineração ao longo do tempo.

Localidade	Data	Atividade	Despejo
Mina de Germano, Bento Rodrigues, distrito de Mariana, Região Central, Minas Gerais, Brasil	5/11/2015	Minério de ferro	32,6 milhões de m ³
Mina de Mount Polley (British Columbia, Canadá)	4/08/2014	Minério de cobre e ouro	7,3 milhões de m ³ de rejeitos, 10,6 milhões de m ³ de água e 6,5 milhões de m ³ de água intersticial
Mina do Córrego de Feijão, Brumadinho, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil	25/01/2019	Minério de ferro	12 milhões de m ³
Mina de Padcal, Itogon, Província Benguet, Filipinas	1/08/2012	Minério de cobre e ouro	20 milhões de toneladas
Fort Meade, Florida, EUA	3/12/1971	Extração de fosfato	9 milhões de m ³
Omai, Guiana	19/08/1995	Minério de ouro	4,2 milhões de m ³ de rejeito de cianeto

Fonte: WISE, 2019

1.8.1. Rompimento de barragem da SAMARCO mineração no município de Mariana-MG

Em cinco de novembro de 2015, houve o rompimento da estrutura da Barragem do Fundão, no município de Mariana-MG, que levou ao aporte de 32,6 milhões de m³ de rejeito oriundo do processo de mineração de ferro (Fe) da SAMARCO S.A (SAMARCO^b, 2016). A barragem continha 56 milhões de m³ de rejeito de mineração em novembro de 2015 (IBRAM, 2015). Após o rompimento, o rejeito de mineração atingiu a Barragem de Santarém, que foi danificada, e seguiu pelo córrego do Fundão, atingindo o Rio Gualaxo do Norte e o Rio do Carmo, até chegar ao Rio Doce, percorrendo toda a sua extensão de 668 km, até a foz em Regência (Linhares, ES) em 21 de novembro de 2015. Mais de 90% do rejeito de mineração ficou retido nos primeiros 120 km após a Barragem do Fundão (SAMARCO^a, 2016).

A Barragem do Fundão tinha capacidade anual de reserva de 23 milhões de toneladas/ano de rejeito de ferro (SAMARCO, 2013), tendo sua operação iniciada em 2008, com capacidade projetada de 79,6 milhões de m³ de rejeito de ferro (SUPRAM, 2008).

Uma inspeção em 2012 sobre a possibilidade de alterações não autorizadas na barragem de Fundão identificou uma ruptura parcial que apresentava severo risco estrutural e exigia mais reparos do que os que haviam sido feitos, orientação essa que não foi seguida (Marshall, 2018).

O rompimento da barragem levou à morte de 19 pessoas, sendo o nono caso envolvendo acidentes com rejeito de mineração em questão de mortes no último século (Carmo *et al.*, 2017) e desabrigou 1500 pessoas. Destruiu a vila de Bento Rodrigues, edificações em outras comunidades, atingiu o patrimônio histórico, uma aldeia indígena, atividades agropastoris, interrompeu a pesca, atividades industriais, atividades turísticas, e a geração de energia hidroelétrica em três usinas ao longo do Rio Doce. O abastecimento de água em várias cidades ao longo dos rios atingidos foi interrompido, deixando cerca de 400.000 pessoas sem acesso a água potável por até 4 semanas. A onda de rejeito chegou a 19m de altura, destruindo a mata ciliar e a biota aquática. O Rio Doce, Rio do Carmo, e o Rio Gualaxo do Norte permanecem assoreados pelo acúmulo de rejeito de mineração nos respectivos leitos (Carmo *et al.*, 2017).

A vegetação ciliar e o leito dos rios Gualaxo, Carmo e Doce foram os patrimônios naturais mais afetados (figura 3) pela onda de rejeito, que também atingiu patrimônios

históricos e as usinas hidrelétricas Risoleta Neves e PCH Bicas, que foi completamente destruída e encerrou as atividades (ANEEL, 2016; Carmo *et al.*, 2017; PCH, 2016)

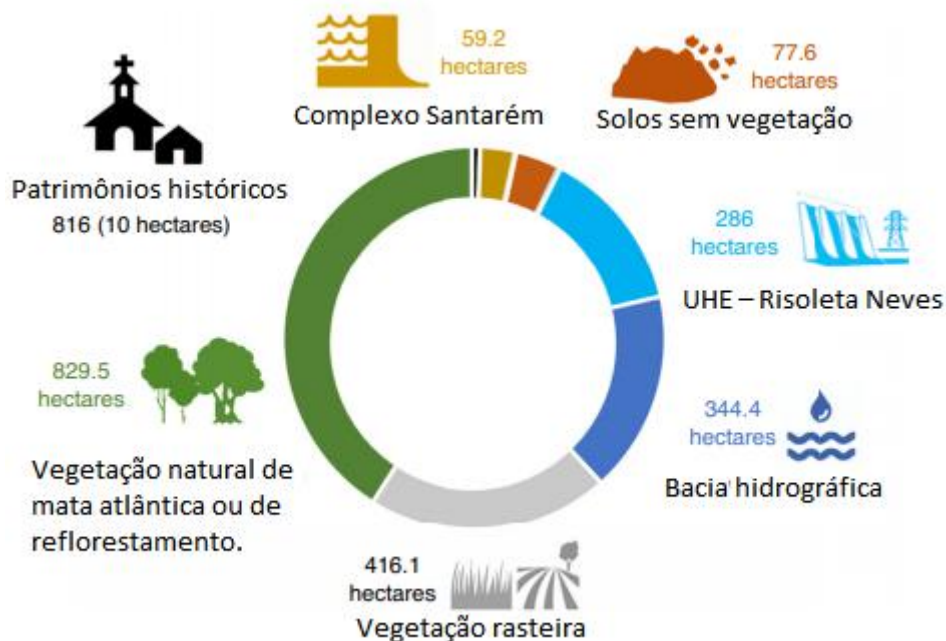


Figura 3: Elementos do patrimônio natural e cultural danificados pelo rompimento da barragem de rejeitos do Fundão. Adaptado de Carmo *et al.* (2017).

1.8.2. Composição do rejeito de mineração de ferro da SAMARCO S.A.

Rejeito de mineração pode ser definido como subprodutos indesejados resultantes do processo de mineração de caráter indistinto. No caso do resíduo da Barragem do Fundão, é composto majoritariamente por quartzo (SiO_2), hematita (Fe_2O_3), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$), caulinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$), ilita ($\text{KA}_2\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$) e mica (Almeida *et al.*, 2018). A prevalência desses minerais é condizente com o perfil encontrado em rejeitos de mineração de ferro (Silva *et al.*, 2017).

Após o rompimento da Barragem do Fundão, observou-se concentrações de alumínio (Al) arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e níquel (Ni), acima dos limites máximos preconizados pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas de Classe 2 (IGAM, 2015), que compreende águas que requerem tratamento convencional para consumo humano, e também podem ser utilizadas

para recreação, irrigação, aquicultura, pesca e proteção das comunidades aquáticas (Resolução CONAMA 357, 2005). Dentre estes elementos, Fe e Mn permaneceram alterados oito meses após a passagem da onda de rejeito de mineração (Carvalho *et al.*, 2018).

1.9. Associação de poluentes inorgânicos aos óxidos de ferro e manganês

Os óxidos de Fe e Mn possuem a capacidade de adsorver outros elementos químicos, incluindo metais tóxicos para animais, plantas e microrganismos (McKenzie, 1989). Concentrações de ferro mostram relação linear com vanádio (V), cromo (Cr), arsênio (As), selênio (Se), molibdênio (Mo) e chumbo (Pb) (Gasparatos, 2013).

Elementos componentes de carbonatos e complexos de hidróxido se ligam preferencialmente às fases FeOOH levemente carregadas (Childs e Leslie 1977; Palumbo *et al.* 2001).

Apesar de óxidos de Mn não representarem uma porção considerável da matriz mineralógica da crosta terrestre, sua alta capacidade de se adsorver a outros metais como o Pb, Cu, Co, Zn e Ni o classifica como um controle primário da presença de metais no solo (McKenzie, 1989). Nos estágios iniciais de formação de óxidos de manganês, há a presença de vários espaços vazios (Saratovsky *et al.*, 2006; Petkov *et al.*, 2009) que podem servir de sítios primários para o Co adsorvido, podendo haver oxidação a Co(III) e incorporação aos minerais (Manceau *et al.*, 1997). A correlação entre As, Ba, Co, Sb, Ti e óxidos de manganês, no Rio Gualaxo do Norte próximo a região de Antônio Pereira, sugere que os óxidos de Mn têm função de carreadores de outros elementos nos sedimentos (Costa *et al.*, 2003). Quando há dissolução de Cu, Ni, Zn, and Pb, íons adsorvidos ou incorporados são dissolvidos, tornando-se biodisponíveis (Vodyanitskii & Plekhanova, 2014).

1.10. Riscos à saúde mediante exposição a metais

Apesar de alguns metais serem essenciais para a manutenção das funções celulares em seres vivos, a exposição a concentrações não fisiológicas através do contato físico, inalação ou ingestão está relacionado ao acometimento a longo prazo de vários órgãos, alterando os processos bioquímicos, organelas e membranas celulares (Salgado, 1996).

A ingestão de alumínio pode ocasionar o desenvolvimento da síndrome do intestino irritável (SCI) devido ao desenvolvimento de hipersensibilidade, afetando também alterações em vias neuroimunes (Esquerre *et al.*, 2019). Segundo McLachlan (1991), a exposição ao alumínio está relacionada a maior incidência de deficiências cognitivas e ao desenvolvimento da doença de Alzheimer.

A presença de bário na corrente sanguínea leva ao risco de desenvolvimento de paralisia flácida, arritmia, parada respiratória e hipocalcemia grave, que é a presença insuficiente de cálcio no soro (Thomas, Bowie e Walker 2001).

O ferro em concentrações anormais em humanos, pode ocasionar sintomas no sistema gastrointestinal, como: dor abdominal, vômitos, diarreia, hematose e hematoquezia até o desenvolvimento de falência hepática, cardiomiopatia, coagulopatia e insuficiência renal (Ho-Wang *et al.*, 2016). O aparecimento dos sintomas relacionados a dor ocorre algumas horas após a exposição.

O manganês é um micronutriente essencial à saúde humana, fundamental para o desenvolvimento de cartilagens, tecidos conectivos, e crescimento ósseo em mamíferos (Hurley, 1981). Por outro lado, o aumento da biodisponibilidade e a ingestão de altas concentrações de Mn está associada a disfunções no sistema nervoso central, no sistema respiratório e no desenvolvimento de fetos, além do risco de desenvolver uma condição denominada manganismo, resultante da exposição crônica ao Mn, afetando regiões do cérebro associadas a mobilidade e cognição, dificultando ou até invalidando a resposta motora e psiquiátrica (ATSDR, 2008).

O zinco é componente de mais de 300 enzimas que atuam na divisão e crescimento celular (Vallee e Falchuk, 1993). A exposição ao zinco em excesso pode ocorrer via inalação, ingestão ou em contato com a pele (ATSDR, 2005) e em excesso pode levar à letargia, deficiência neuronal focal, desordem respiratória, náuseas, vômitos, dor epigástrica, alteração da função linfocitária e o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de próstata em homens (Plum, Rink e Haase, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O desastre da SAMARCO não se resume a fase aguda ocorrida em 2015, já que o

rejeito de mineração liberado pelo rompimento da barragem incorporou-se ao sedimento do Rio Doce e afluentes atingidos (Carmo *et al.*, 2017). A característica de diversas espécies químicas de elementos tóxicos de se associarem aos óxidos de Fe é preocupante, devido ao risco de que, em anaerobiose, microrganismos que realizam a redução dissimilatória de ferro poderiam reduzir o Fe, aumentando a solubilidade dos óxidos de ferro dos sedimentos, e liberando os elementos associados na coluna d'água, aumentando sua biodisponibilidade (Queiroz *et al.*, 2018).

Associado a isso, apenas 5 dos 230 municípios da região tratam o esgoto produzido de forma satisfatória. Numa região onde 70% da população é urbana (JUSBRASIL, 2011), a falta de tratamento resulta no aporte inadequado de esgoto “in natura” no Rio Doce e seus afluentes. Nas margens dos rios há atividades agropecuárias e lançamento de efluentes industriais, que também possibilitam o aporte de matéria orgânica em excesso nos rios. Isto poderia ser um agravante, já que os microrganismos que realizam a redução dissimilatória de ferro e manganês utilizam compostos orgânicos como doadores de elétrons e fontes de carbono.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Observar a influência dos microrganismos nativos e da matéria orgânica na dissolução redutiva do ferro e manganês no Rio Doce e afluentes atingidos pelo rejeito de mineração de ferro da SAMARCO S.A. utilizando culturas de enriquecimento e microcosmos.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a matéria orgânica dos sedimentos dos rios Doce e Gualaxo do Norte através da quantificação de carboidratos, lipídios e proteínas.
- Verificar a presença de bactérias que fazem a redução dissimilatória de ferro utilizando culturas de enriquecimento em meio definido.
- Analisar o destino do ferro nas culturas de enriquecimento.

- Avaliar a influência de substratos orgânicos não-fermentáveis e fermentáveis, simples e complexo, na dissolução redutiva de ferro e manganês ao longo do tempo.
- Avaliar o efeito de produtos de fermentação da glicose (acetato, propionato, lactato e butirato) na dissolução redutiva de ferro e manganês em microcosmos ao longo do tempo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta das Amostras

Amostras de água e sedimentos foram coletadas com frascos de plástico em três pontos distintos (figura 4a): Dois pontos de coleta no Rio Gualaxo do Norte, um deles num ponto a montante, onde o rejeito de mineração da SAMARCO não chegou (G1) (figura 4b e tabela 3), outro a jusante da passagem do rejeito (G2) (figura 4c e tabela 3), ambos em 14-11-2016 e 30-04-2018, e outro ponto no Rio Doce afetado pelo rejeito na altura de Governador Valadares (GV) (figura 4d e tabela 3) em 29-07-2017. Após coleta, as amostras foram conservadas em temperatura ambiente até a chegada no laboratório de Geomicrobiologia, UFRJ. Durante a coleta, foi medida a temperatura da água e, no laboratório, medimos o pH.

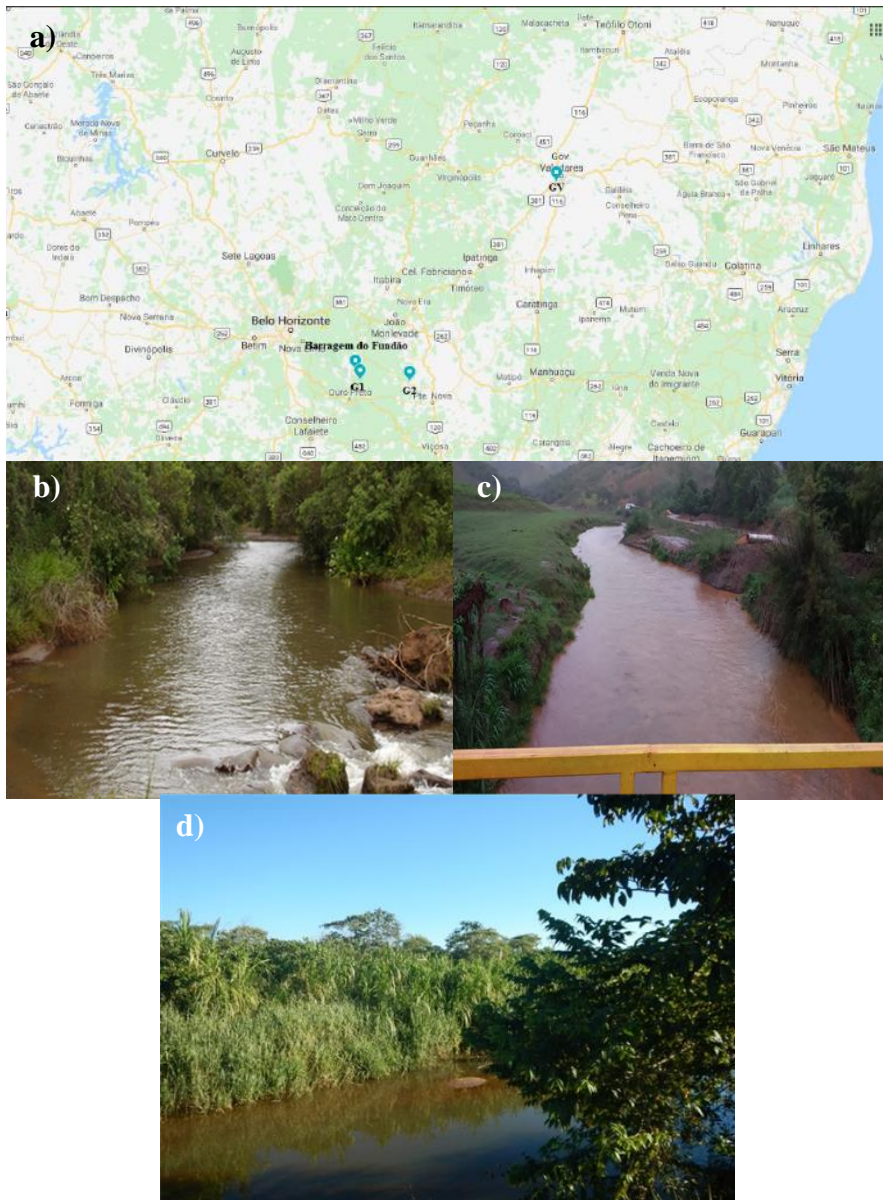


Figura 4: Locais de coleta. a) Mapa mostrando os pontos de coleta (Google maps, 2019). b) Ponto de coleta no Rio Gualaxo do Norte, a montante dos locais atingidos pelo rejeito de mineração da SAMARCO (G1). c) Ponto de coleta no Rio Gualaxo do Norte a jusante da barragem rompida (G2). d) Ponto de coleta no Rio Doce em Governador Valadares, também a jusante (GV).

Tabela 3: Coordenadas dos pontos de coleta.

Ponto	Coordenadas
G1	-20.276547, -43.431717
G2	-20.286188, -43.065850
GV	-18.915537, -41.995915

4.2. Quantificação de biopolímeros

As concentrações de biopolímeros totais (carboidratos, lipídios e proteínas) foram determinadas em triplicatas, utilizando 0,5 g de sedimento. Todas as determinações foram feitas por métodos espectrofotométricos.

4.2.1. Carboidratos

Os carboidratos foram quantificados usando o método adaptado estabelecido por Dubois *et al.* (1956) e Gerchacov e Hatcher (1972). A tubos de ensaio contendo 0,5 g de sedimento, adicionamos 1 ml de H₂O e 1 ml. de fenol a 5%. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex. Após 10 minutos, adicionamos 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram novamente agitados em vórtex e então centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos em centrífuga (LS-3 da CELM). A absorbância foi medida em 485 nm em espectrofotômetro (Spectronic 20D Milton Roy). Todos experimentos foram realizados em triplicata. O branco foi preparado substituindo a amostra por água destilada. A concentração de carboidratos pode então ser determinada por referência a uma curva padrão previamente construída, utilizando glicose como padrão.

4.2.2. Proteínas

As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Lowry *et al.* (1951) e modificado por Hartree (1972). Para isto, 0,5 g de amostra de sedimento foi colocado em tubo de ensaio, onde foram adicionados 1 ml de H₂O e 1 ml de NaOH 0,2M. Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos em repouso por 30 minutos. Então foram adicionados 2,2 ml de H₂O e 0,2 ml de solução contendo CuSO₄ 1% e KNaC₄H₄O₆·4H₂O 2%, e os tubos foram novamente agitados em vórtex. Após 15 minutos de repouso, foram adicionados 0,1 ml de solução contendo H₂O e o reagente de Folin-Ciocalteu (FCR) na proporção H₂O 2:1 FCR, seguido de agitação dos tubos e repouso de 30 minutos. Então os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos em centrífuga (LS-3 da CELM) e lidos em absorbância a 650 nm em espectrofotômetro (Spectronic 20D Milton Roy). Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O branco foi preparado substituindo a amostra por água destilada. A concentração de proteínas pode então ser determinada por referência a uma curva padrão previamente construída com Albumina bovina, fração V (Sigma).

4.2.3. Lipídios

Os lipídios foram extraídos e quantificados de acordo com protocolo estabelecido por Marsh e Wenstein (1966). A 0,5 g de sedimento, foram adicionados 1 ml de água destilada, 2,5 ml de CH₃OH e 1,25 ml de CHCl₃. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e mantidos em repouso a 4°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,25 ml de H₂O destilada, seguido de centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos em centrífuga (LS-3 da CELM) para separação da fase orgânica, contendo lipídios, da fase aquosa e da fase sólida. A fase orgânica foi transferida para outros tubos utilizando pipeta Pasteur e foram submetidos a secagem em banho de areia à 80-100°C. Após a secagem, 2 ml de H₂SO₄ foram adicionados lentamente aos tubos, seguido de banho de areia a 180°C por 15 minutos. Após o tempo de espera, foi realizado um banho em H₂O em temperatura ambiente seguido de banho de gelo por 5 minutos. Foram adicionados 3 ml de H₂O destilada foram adicionados aos tubos após o tempo de espera. Por fim, os tubos foram agitados em vortex, centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos em centrífuga (LS-3 da CELM), e lidos em absorbância a 375 nm em espectrofotômetro (Spectronic 20D, Milton Roy). Todos experimentos foram realizados em triplicata. O branco foi preparado substituindo amostra por água destilada. A concentração de lipídios pode então ser determinada por referência a uma curva padrão previamente construída com Tripalmitina (Sigma).

4.3. Preparação de culturas de enriquecimento com meio FWA-Fe(III)

Para obtenção de culturas de enriquecimento de bactérias redutoras de ferro, o meio FWA-Fe(III) foi preparado de acordo com o protocolo de Lovley e Phillips (1988). O meio continha NaHCO₃ 2.5 g/L; CaCl₂ 0.755 g/L; KCl 0.1 g/L; NH₄Cl 1.5 g/l; NaH₂PO₄ 0.74g/L; NaCH₃COO 6.8 g/L, e 1% solução de vitaminas filtrada em filtro 0,22 µm (Wolin, Wolin e Wolfe, 1963). Não foi utilizada solução de minerais de Wolfe. O óxido de Fe(III) sintético foi preparado através da alcalinização de uma suspensão de FeCl₃ utilizando NaOH, seguida de vários ciclos de decantação e lavagem com água destilada, conforme McLaughlin e Brown (1981).

Nas culturas de enriquecimento, utilizamos meio FWA-Fe(III) contendo cerca de 35,7 mM/L de Fe(III). O meio foi borbulhado com N₂ livre de O₂, colocado em frascos de penicilina de 50 mL, que foram fechados com rolha de borracha e travados com tampa de

alumínio, e autoclavados. Depois de esfriar, cada frasco foi inoculado com 4 mL de sedimento de rio. As culturas controle foram autoclavadas logo após a inoculação. Todos os frascos foram incubados a 25°C no escuro.

4.4. Caracterização microestrutural dos óxidos de ferro

Os padrões de difração de raios-X foram gerados no equipamento D8 Advance Eco (Bruker-AXS, Karlsruhe, Alemanha), sob as seguintes condições operacionais: tubo selado com Cu K α ($\lambda = 0,154056$ nm) operado a 40 kV e 25 mA, medido de 4 a 105° 2 θ a 0,01° e submetido ao LynxEye XE energy-discriminant position sensitive detector. A identificação de todos os minerais foi realizada com o software Diffrac.EVA 4.0 ou 4.1 da Bruker-AXS e o banco de dados com o PDF04 + (ICDD, 2017).

O background foi modelado pelo polinômio de 6ª ordem e as cinco linhas de emissão de Cu K α (Berger, 1986) com uma linha adicional de K β (Hölzer, 1997) ajustada; a contribuição deste último refinada para contabilizar K β menor não eliminada pelo detector. Outros parâmetros instrumentais ajustados foram o deslocamento e absorção da amostra. Estes experimentos foram realizados em colaboração com Reiner Neumann, do CETEM (Centro de Tecnologia Mineral).

4.5. Observação dos óxidos de Fe em microscópio eletrônico de transmissão

Amostras da fase sólida das culturas de enriquecimento de tempo longo foram colocadas com auxílio de pipeta pasteur em grades de níquel para microscopia eletrônica de transmissão cobertas com filme de FORMVAR, e observadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1200 EX.

4.6. Preparação de microcosmos contendo diferentes substratos orgânicos

Nestes experimentos, pretendemos avaliar o papel de diferentes tipos de matéria orgânica sobre a dissolução reductiva de minerais de ferro dos sedimentos dos Rios Doce (GV) e Gualaxo do Norte (G1 e G2), em áreas atingidas ou não pelos rejeitos de mineração

da SAMARCO. Para isto, incubamos sedimento e água (1:4) dos três pontos de coleta, em anaerobiose, no escuro, a 25°C, em tubos de ensaio de 9 mL preenchidos até o topo e fechados com tampa de rosca ou rolhas de silicone. Antes de construir os microcosmos, adicionamos os seguintes substratos a água de rio: acetato a 6,8 g/L ou 34 g/L, glicose a 3 ou 15 g/L, extrato de leveduras a 4 ou 20 g/L. Para o controle vivo, não houve adição de matéria orgânica, e para o controle morto, sedimento e água contendo glicose 15 g/L foram autoclavados.

A escolha de acetato como substrato orgânico ocorreu devido ao conhecimento prévio na literatura de que ferrobactérias utilizam de forma satisfatória o acetato como doador de elétrons para a redução dissimilatória do Fe(III) a Fe(II) e em alguns casos de Mn(IV) a Mn(II) (Lovley e Phillips, 1988). O extrato de leveduras foi utilizado devido a sua composição de matriz microbiológica, com o objetivo de mimetizar o aporte de esgoto na Bacia do Rio Doce, e a utilização da glicose teve como princípio o fato de ser um substrato fermentável de fácil assimilação por microrganismos fermentadores.

Os microcosmos foram incubados em anaerobiose por até 63 dias em sextuplicata para os pontos G1 e G2 e até 28 dias para o ponto GV. Semanalmente, amostras da fase líquida foram acidificadas a 1 Mol/L HCl, para avaliação das concentrações de Fe(II). Microcosmos de 63 dias foram submetidos a quantificação de Mn.

4.7. Quantificação de elementos dissolvidos em amostras de água

Para a determinação das concentrações dos elementos nas amostras com 35 dias de incubação, as mesmas foram previamente diluídas, e foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), sequencial, com visão radial, marca Horiba Jobin Yvon, modelo Ultima 2 (Longjumeau, França), equipado com câmara de nebulização ciclônica, nebulizador do tipo MiraMist (Mira Mist CE, Burgener Research Inc., Ontario, Canadá), amostrador automático modelo AS 421 e software operacional Analyst 5.4 para aquisição dos dados. A quantificação foi realizada por interpolação utilizando curva analítica com quatro soluções-padrão para a calibração. As soluções de calibração foram geradas a partir de diluição de solução-padrão estoque SpecSol de concentração 1.000 ou 10.000 mg L⁻¹ (Quimlab Química & Metrologia®, Jardim Califórnia, Jacareí, São Paulo, Brasil até obtenção das concentrações desejadas utilizando

assemelhamo de matriz e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q®, modelo Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). Foram quantificados Ag, Al, Au, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, In, Mg, Ni, Pb, Pt, Sn, Sr, Ti, Tl, W, Zn. Estes experimentos foram realizados em colaboração com Ricardo Erthal Santelli e Bernardo Ferreira Braz, do Instituto de Química da UFRJ.

4.8. Detalhamento da Curva de crescimento das concentrações de Fe(II) na fase líquida

Para observar a curva de crescimento da taxa de dissolução redutiva de Fe (II) em mais detalhes, foi construído microcosmos em sextuplicata contendo glicose 15 g/L. Após incubação em anaerobiose por 1, 2, 4, 7, 14, 21, e 28 dias, alíquotas da fase líquida foram acidificadas a HCl 1Mol/L, para medir as concentrações de Fe(II).

4.9. Glicose em diferentes concentrações

Com objetivo de avaliar o efeito da concentração de substrato sobre a dissolução redutiva do ferro, foi adicionado aos tubos 3; 15; 50 ou 100 g/L de glicose, onde cada concentração foi feita em sextuplicata. Os tubos foram incubados por 15 dias, em anaerobiose, no escuro a 25°C. Após isso foram acidificados em HCl 1M, e depois medida a respectiva concentração de Fe (II).

4.10. Redução de Fe(III) a Fe(II) utilizando produtos de fermentação como substratos orgânicos

Para avaliar os efeitos de produtos de fermentação sobre a dissolução redutiva do ferro em amostras de água e sedimento do Rio Doce (GV), foram adicionados aos microcosmos acetato 50 mM/L, propionato 33 mM/L, lactato 33 mM/L e butirato 25 mM/L, além de glicose 16,6 mM/L para comparação. Estes microcosmos foram incubados por 7, 14, 21, 28 e 35 dias em anaerobiose. Durante este tempo, amostras da fase líquida foram coletadas e acidificadas a 1 M HCl para quantificação de Fe e Mn a partir de métodos colorimétricos.

4.11. Determinação das concentrações de Fe (II) e Fe(total) em amostras de água

As amostras acidificadas foram submetidas ao protocolo para quantificação da concentração de Fe(II) baseado no trabalho de Viollier *et al.* (2000). Ele é baseado na formação de um composto colorido que é lido em espectrofotômetro, para isto foi utilizado a ferrozina que é complexada a Fe(II) gerando a cor magenta.

Para determinação de Fe(II), foram adicionados a tubos de ensaio 200 μL de ferrozina 10^{-2} Mol/L, preparada em solução de acetato de amônio 10^{-1} Mol/L; 1000 μL de amostra; 500 μL de tampão acetato de amônio 5 Mol/L com pH ajustado para 9,5 utilizando hidróxido de amônio, e 300 μL de água destilada. Para construção de curva padrão, foram utilizadas soluções de FeSO_4 a 5, 10, 100 e 200 $\mu\text{Mol/L}$ em HCl a 1 Mol/L. O branco foi feito com a substituição da amostra por água.

4.12. Determinação das concentrações de Mn (II, III) em amostras de água

Para medir as concentrações de Mn(II,III) na fase líquida das amostras, foi utilizado o protocolo estabelecido por (Charbonnier e Anschutz, 2019) que utiliza o 4,4',4'',4'''-(porphine-5, 10, 15, 20-tetra-yl) tetrakis (TCPP) para reagir com o Mn(II,III) solúvel e formar um complexo de cor verde.

Para isto, uma solução de TCPP a 190 mg/L foi preparada dissolvendo 38 mg de TCPP em 10 mL de hidróxido de sódio 0.1 Mol/L. A solução foi diluída até 200 ml com água destilada. Para tamponar a reação, utilizamos solução de tetraborato de sódio ($\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 0,025 Mol/L, ácido clorídrico (HCl) 0,1 Mol/L e imidazol $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ 0,6 Mol/L, que foram misturadas na proporção 10:4:5 e teve o pH ajustado para 8 com HCl a 1 Mol/L, adicionando 50 ml de $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 20 ml de HCl e 25 ml de $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ completando o volume com água destilada até 100 ml. Uma solução de cloreto de cádmio (CdCl_2) a 220 mg/L foi preparada dissolvendo 22 mg CdCl_2 em 100 ml de água destilada. Para obter o reagente final, os três reagentes foram misturados na proporção 6:2:1. Além disso, uma solução de bicarbonato de sódio a 5g/L foi preparada.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 200 μL de amostra, 1500 μL de solução de bicarbonato de sódio, e 264 μL de reagente final. Para construção de curvas padrão, foram

utilizadas soluções de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{Mol/L}$ de MnCl_2 . O branco foi feito utilizando água destilada ao invés de amostra. Os experimentos foram colocados no escuro para evitar a oxidação e deixados em repouso por 1 hora para reagir. Os experimentos foram levados ao espectrofotômetro, que foi zerado com água destilada. A leitura foi realizada a 468 nm.

4.13. Análise estatística

Os dados foram analisados no software estatístico GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA utilizando o teste t de Student não-pareado, sendo utilizado um intervalo de confiança de 95%, ou seja, foram considerados significativos os dados que apresentaram o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise de temperatura e pH dos pontos de coleta.

A temperatura da água nos pontos de coleta variou entre 20-25°C, estando de acordo com o clima tropical da região que variou entre 28,3 e 31,4°C, (IGAM, 2015).

O pH é uma indicação sobre a condição de acidez, neutralidade ou alcalinidade da água em uma faixa de 0 a 14. Nos resultados obtidos dos pontos de coleta, os valores de pH encontraram-se entre 6 e 8 estando dentro da normalidade, isto é, sem apresentar violação dos limites estabelecidos na legislação (faixa de 6 a 9), que são valores adequados para a manutenção da vida aquática (Resolução CONAMA 357, 2005).

5.2. Quantificação de biopolímeros nos sedimentos

As concentrações de proteínas se mantiveram entre 0,04 e 0,31 mg/g nos três pontos de coleta (figura 5a), enquanto que as concentrações de carboidratos variaram entre 0,02 e 0,5 mg/g, (figura 5b), e as de lipídios permaneceram entre 0,08 e 0,35 mg/g (figura 5c).

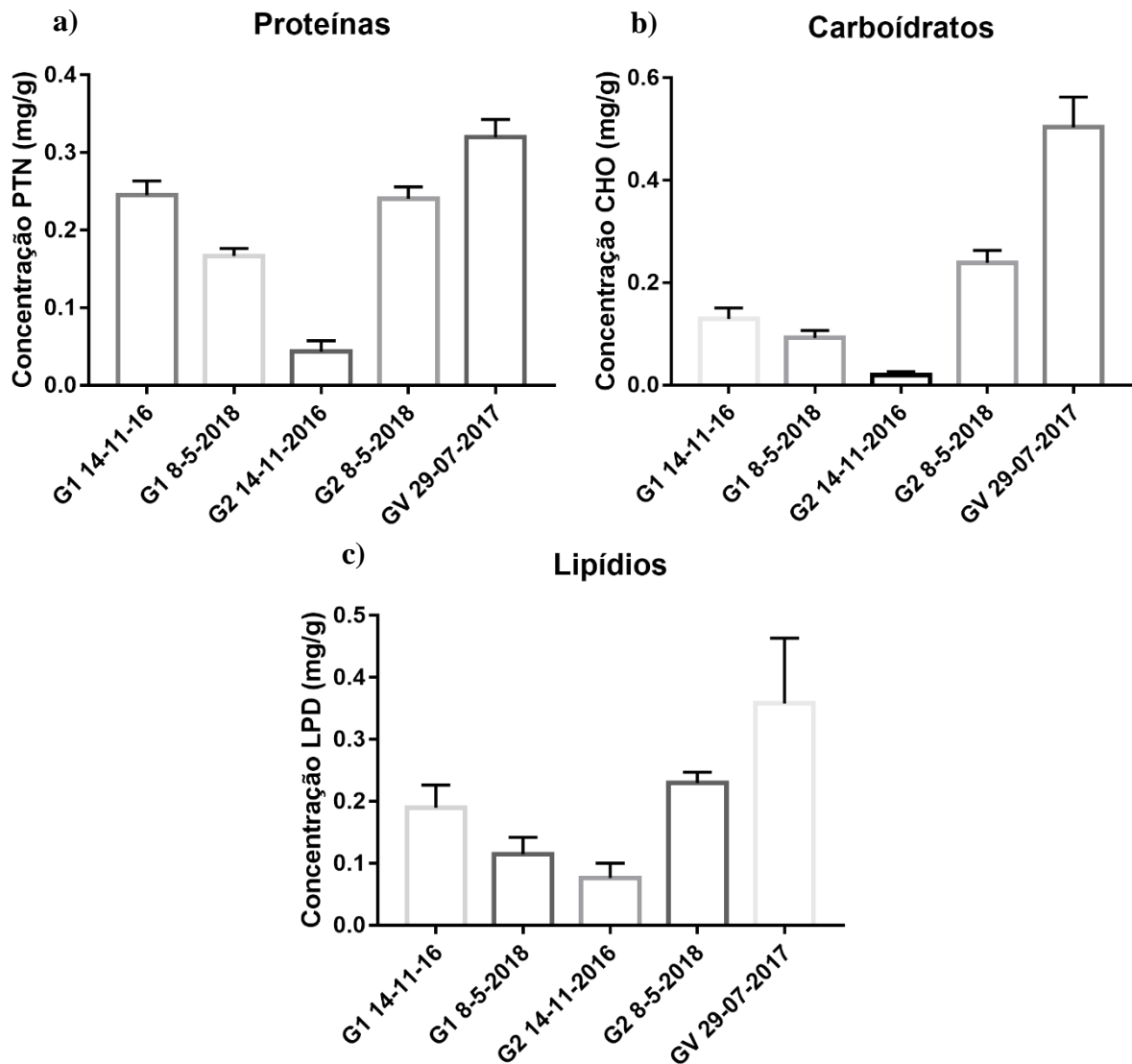


Figura 5: Concentrações de biopolímeros em amostras de sedimento do G1, G2 e GV. a) Proteínas, b) carboidratos, e c) lipídios. (n=3. Barras indicam o desvio padrão).

Tabela 4: Razão entre biopolímeros nos pontos de coleta

	Prt:Carb	Prt:Lip
G1 14-11-16	1,9	1,3
G1 8-5-2018	1,8	1,5
G2 14-11-2016	2,2	0,6
G2 8-5-2018	1,0	1,0
GV 29-07-2017	0,6	0,9

A razão entre os biopolímeros pode mostrar quais são as tendências de matriz orgânica que mais ocorrem nas amostras, relacionando-se com fonte natural ou externa. É possível observar razão menor que 1 para GV e maior que 1 para G1 (tabela 4).

5.3. Avaliação da redução dissimilatória de ferro e da produção de magnetita em culturas de enriquecimento

Em metade das nossas culturas de enriquecimento (3 de 6), a fase sólida tornou-se preta, e a proporção de partículas magnéticas aumentou consideravelmente (Figura 6). Na fase líquida destas culturas, as concentrações de Fe(II) permaneceram em $6,4 \pm 5,3$ mg/L (G1B), $7,0 \pm 1,6$ mg/L (G1C), e $2,2 \pm 2,4$ mg/L (G2A) ($n = 4$) entre 28 e 170 dias, enquanto que nos controles as concentrações de Fe(II) permaneceram entre $0,61 \pm 0,18$ e $0,41 \pm 0,16$ mg/L (G2) e $0,40 \pm 0,15$. O limite de detecção foi de $0,28$ mg/L (G1).

Difração de raios-X do óxido de ferro sintético utilizado como fonte de Fe(III) para culturas de enriquecimento (figura 7a) mostrou predominância de fases amorfas, bem como alguns picos de acaganeita (β -FeOOH) e goethita (α -FeOOH). Por outro lado, em culturas de enriquecimento com 170 dias de incubação (figura 7b), observamos principalmente magnetita ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$), bem como goetita, hematita, quartzo, muscovita e fluorapatita.

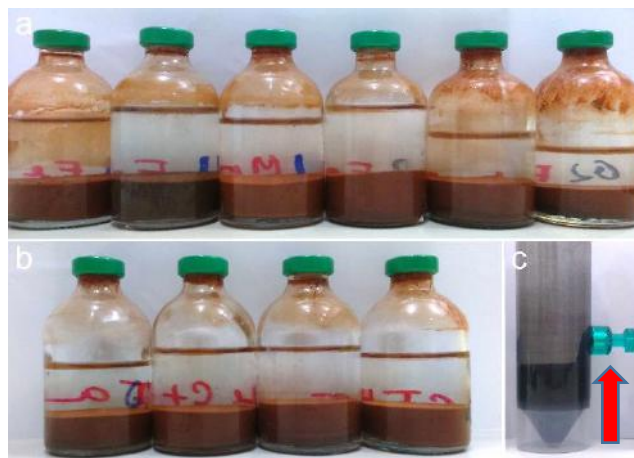


Figura 6: Evolução da fase sólida das culturas de enriquecimento. (a) Culturas aos 20 dias de incubação. Observe a coloração escura do segundo frasco. (b) Culturas controle (autoclavadas) aos 20 dias de incubação, onde a fase sólida mostra coloração uniforme. (c) Fase sólida obtida após 170 dias de incubação, mostrando minerais magnéticos atraídos por um ímã (seta) com magnetização de cerca de 3000 Gauss. A energia de interação magnética é suficiente para manter o ímã suspenso na parede do frasco.

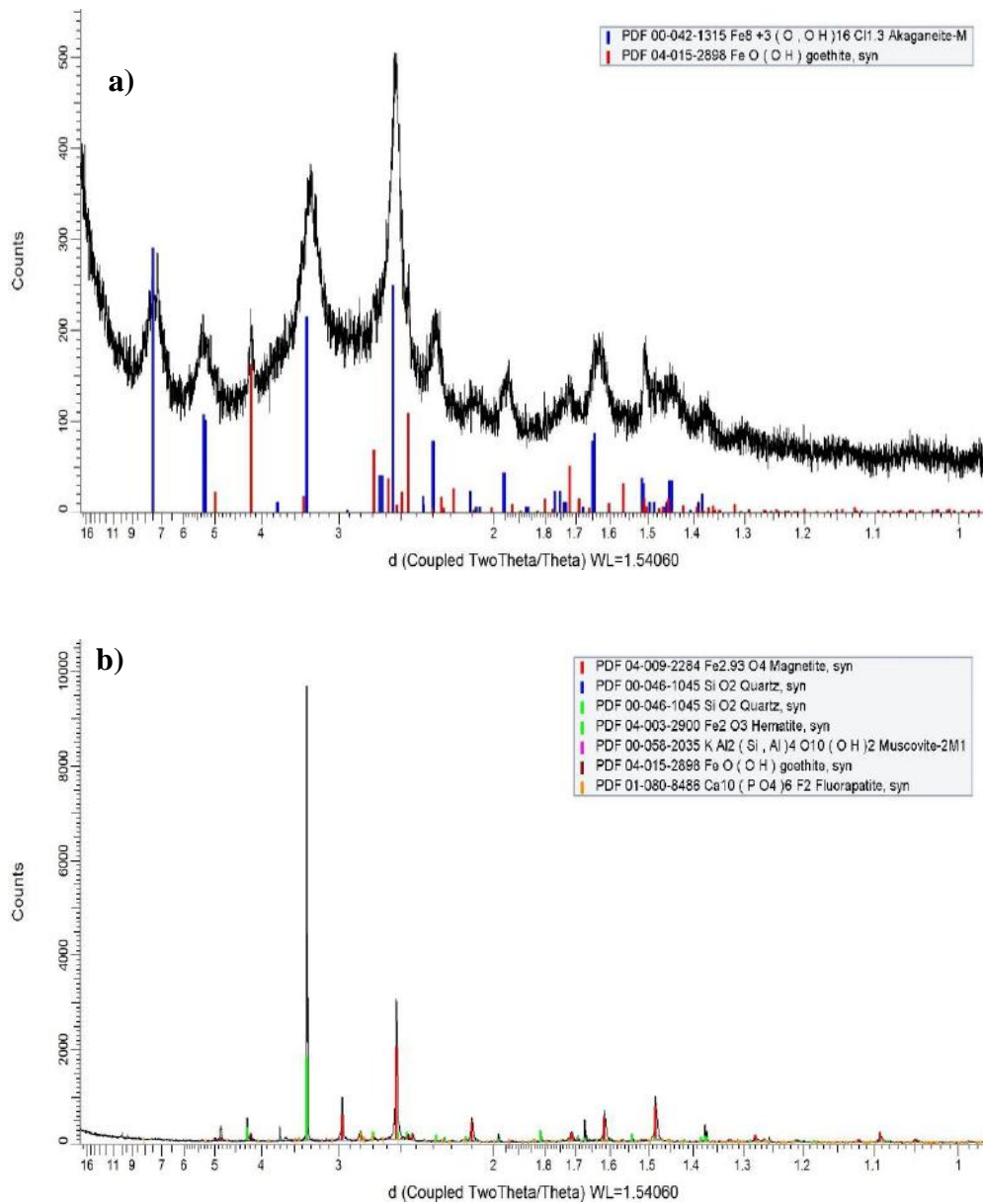


Figura 7: Difração de raios-X da fase sólida de culturas de enriquecimento de microrganismos que realizam redução dissimilatória de ferro no Rio Gualaxo do Norte. (a) Óxido de ferro sintético utilizado como fonte de Fe(III). (b) Fase sólida de culturas após 170 dias de incubação, mostrando picos consistentes com os minerais magnetita, quartzo, hematita, muscovita, goethita e fluorapatita.

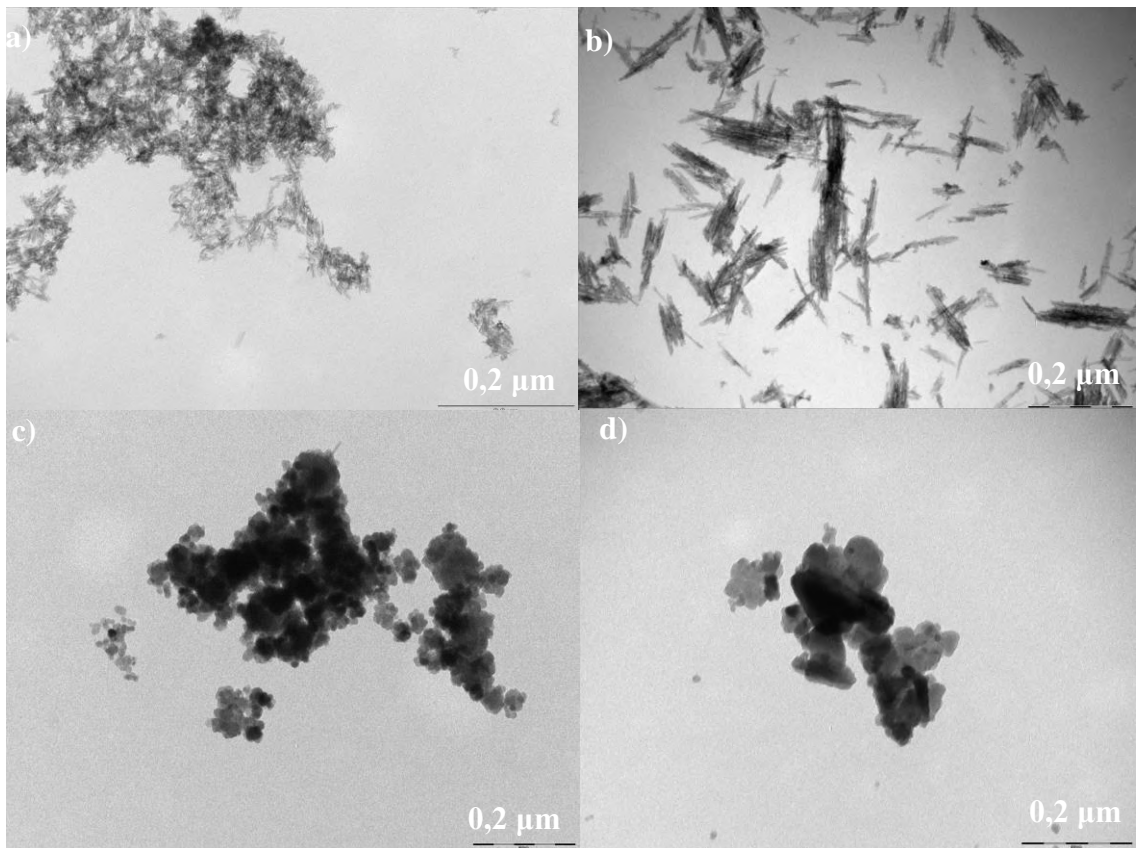


Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão da fase sólida de culturas de enriquecimento de microrganismos que realizam a redução dissimilatória de ferro no Rio Gualaxo do Norte. (a-b) Nano-partículas alongadas de culturas controle (autoclavadas). (c-d) Nano-partículas isométricas de culturas experimentais, de tamanho maior do que as de culturas controle.

Microscopia eletrônica de transmissão mostrou nano-partículas nos controles autoclavados das culturas de enriquecimento de bactérias ferro-redutoras após 170 dias. A ausência de contraste de difração indica predominância de partículas amorfas, em conformidade com a difração de raios X da fonte de Fe(III) (figura 8a-b). Em contraponto, nas culturas de enriquecimento experimentais (figura 8c-d) há a presença principalmente de nanocristais maiores e isométricos, com morfologias compatíveis com a magnetita identificada pela difração de raios-X (figura 7b).

5.4. Avaliação das concentrações de Fe(II), Mn(II,III), e outros elementos na fase líquida de microcosmos utilizando substratos orgânicos não fermentável (acetato), simples fermentável (glicose), e complexo fermentável (extrato de leveduras)

A figura 9 mostra a evolução das concentrações de Fe(II) na fase líquida de microcosmos construídos a partir de sedimentos e água coletados nos rios Gualaxo do Norte e Doce, adicionados de acetato, extrato de leveduras e glicose. Os controles incluem microcosmos sem adição de substrato orgânico, e também controles autoclavados com adição de glicose a 15g/L. Para análise estatística, foi utilizado o teste T de Student (tabelas 5-7).

Nos microcosmos G1 adicionados de acetato (figura 9a), as concentrações de Fe(II) não se destacam dos controles vivo e autoclavado com glicose, ao contrário dos microcosmos G2 e GV (figura 9b e 9c). A comparação entre G1, G2 e GV mostra que as maiores concentrações foram observadas nos microcosmos construídos com água e sedimentos coletados no ponto G2. Para microcosmos utilizando acetato, as concentrações de Fe(II), independentemente da concentração utilizada, apresentaram diferença significativa apenas em alguns pontos (em relação aos controles vivo e controle autoclavado com glicose 15 g/L para G1 e G2 (e em relação ao controle vivo para GV (Tabelas 5-7).

Por outro lado, na presença de extrato de leveduras, as taxas de dissolução reductiva são maiores do que na presença de acetato, e do que os controles vivos e autoclavados (figura 9d-f). Comparação entre as concentrações médias observadas para extrato de leveduras mostram que maiores concentrações de Fe(II) são encontradas nos pontos G1 e G2 (figuras 9d e 9e). Análise estatística mostrou que as concentrações de Fe(II) de todos os experimentos utilizando extrato de leveduras era significativamente diferente dos controles em todos os tempos analisados (tabelas 5-7).

Na presença de glicose, as concentrações de Fe(II) aumentaram em relação aos controles, e também em relação aos microcosmos contendo acetato e extrato de leveduras (Figura 9g-i). As tabelas 5-7 mostram que as concentrações de Fe(II) nos microcosmos contendo glicose são estatisticamente distintas dos controles vivo e autoclavado. Nos microcosmos contendo glicose, as concentrações de Fe(II) atingiram níveis mais altos naqueles construídos a partir de sedimentos e água do ponto G2, e níveis mais baixos nos construídos com amostras do ponto GV (figura 9).

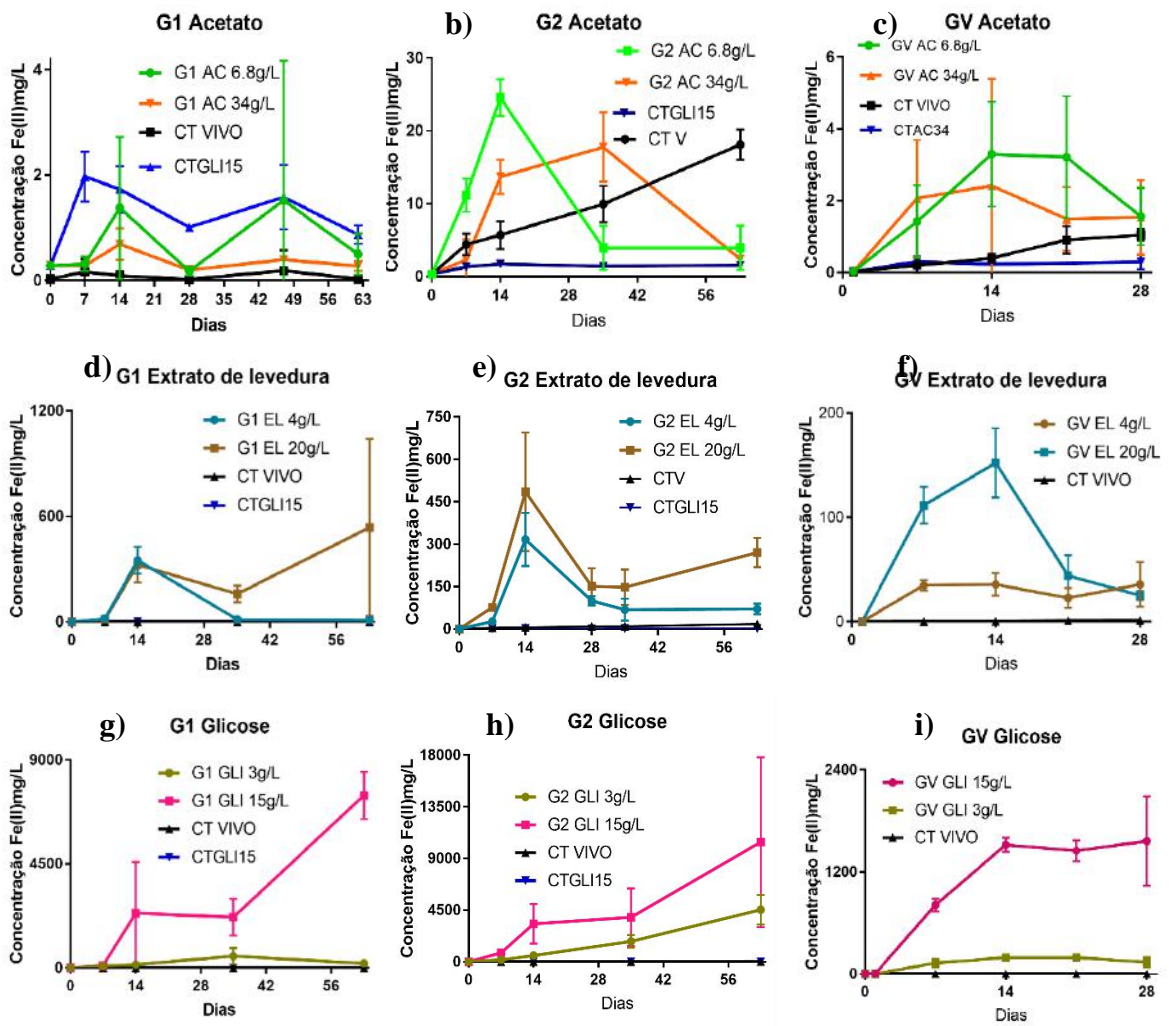


Figura 9: Concentrações de Fe(II) na fase líquida de microcosmos construídos com sedimentos e água coletados nos pontos G1 (a, d, g), G2 (b, d, h) e GV (c, f, i). Os substratos utilizados foram (a-c) acetato de sódio (AC), (d-f) extrato de leveduras (EL), ou (g-i) glicose (GLI). Os controles incluem microcosmos sem adição de substrato orgânico (CT VIVO), microcosmos adicionados de glicose a 15 g/L autoclavados (CTGLI15), e microcosmos adicionados de acetato a 34 g/L (CTAC34). (n=6. Barras correspondem ao desvio padrão).

Tabela 5: Valores de P obtidos pelo teste t de Student a partir da comparação dos dados de concentração de Fe(II) de microcosmos experimentais e controles construídos com amostras obtidas no ponto G1. Os substratos orgânicos incluem acetato (AC), extrato de leveduras (EL) e glicose (GLI). “CTV” indica os valores de “P” em relação ao controle vivo, e “CTGLI15” indica os valores de “P” em relação ao controle autoclavado contendo glicose a 15g/L. Valores significativamente distinto ao nível de confiança de 95% são indicados em negrito.

Dias	G1 AC 6.8g/L		G1 AC 34g/L		G1 EL 4g/L		G1 EL 20g/L		G1 GLI 3g/L		G1 GLI 15g/L	
	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15
7	0,135	<0,0001	0,445	<0,0001	0,0019	<0,0001	0,0006	<0,0001	0,0087	<0,0001	0,0071	<0,0001
14	0,131	0,5592	0,1871	0,0008	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0257	0,0258
35	0,4456	0,9596	0,0191	0,001	0,0005	0,0008	<0,0001	<0,0001	0,0052	0,0053	<0,0001	<0,0001
63	0,1055	0,0601	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0261	0,0261	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabela 6: Valores de P obtidos pelo teste t de Student a partir da comparação dos dados de concentração de Fe(II) de microcosmos experimentais e controles construídos com amostras obtidas no ponto G2. “CTV” indica os valores de “P” em relação ao controle vivo, e “CTGLI15” indica os valores de “P” em relação ao controle autoclavado contendo glicose a 15g/L. Valores significativamente distinto ao nível de confiança de 95% são indicados em negrito.

Dias	G2 AC 6.8g/L		G2 AC 34g/L		G2 EL 4g/L		G2 EL 20g/L		G2 GLI 3g/L		G2 GLI 15g/L	
	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15	CTV	CTGLI 15
7	0,0001	<0,0001	0,0422	0,224	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
14	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0004
35	0,0058	0,0677	0,0053	<0,0001	0,0041	0,0017	0,0003	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,0037	0,0037
63	<0,0001	0,0809	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0055	0,0055

Tabela 7: Valores de P obtidos pelo teste t de Student a partir da comparação dos dados de concentração de Fe(II) de microcosmos experimentais e controles construídos com amostras obtidas no ponto GV. Os substratos orgânicos incluem acetato (AC), extrato de leveduras (EL) e glicose (GLI). “CTV” indica os valores de “P” em relação ao controle vivo. Valores significativamente distinto ao nível de confiança de 95% são indicados em negrito.

	GV AC 6.8g/L	GV AC 34g/L	GV EL 4g/L	GV EL 20g/L	GV GLI 3g/L	GV GLI 15g/L
Dias	CTV	CTV	CTV	CTV	CTV	CTV
7	0,0172	0,0199	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
14	0,0048	0,2233	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
21	0,0086	0,1741	0,0003	0,0003	<0,0001	<0,0001
28	0,2032	0,33	0,0058	<0,0001	0,0007	0,0001

As medidas de Mn(II,III) após 63 dias nos microcosmos experimentais dos pontos G1 e G2 (figura 10a) utilizando extrato de leveduras a 20 g/L e glicose a 3 g/L e 15 g/L mostraram aumento significativo das concentrações de Mn(II,III) em relação ao controle vivo e ao controle autoclavado com glicose a 15 g/L. Para microcosmos com adição de acetato em ambos pontos, estes não apresentaram diferença significativa em relação aos controles. Além disto, microcosmos contendo glicose e extrato de leveduras levam a concentrações de Mn(II,III) entre 5 e 7 vezes maiores que microcosmos contendo acetato (figura 10a).

Após 21 dias, o pH da fase líquida dos microcosmos dos pontos G1, G2 e GV foi medido (tabela 8). O pH do controle vivo variou entre 6 e 7 e o do controle autoclavado permaneceu em 5. Nos microcosmos experimentais, o pH varia de 7 a 8.2 para acetato, de 5 a 6 para glicose e de 7.3 a 8.8 para extrato de leveduras.

Tabela 8: Medidas de pH após 21 dias de incubação dos microcosmos

	G1	G2	GV
Controle vivo	6.0	6.0	7
Controle Glicose 15g/L	5.0	5.0	-
Acetato 6.8g/L	8.2	7.5	7
Acetato 34g/L	7,6	7.5	7
Glicose 3 g/L	5.0	5.0	6
Glicose 15 g/L	5.3	5.2	5
Ext. lev. 4g/L	8.8	7.7	7,5
Ext. lev. 20g/L	7.5	7.3	8,5

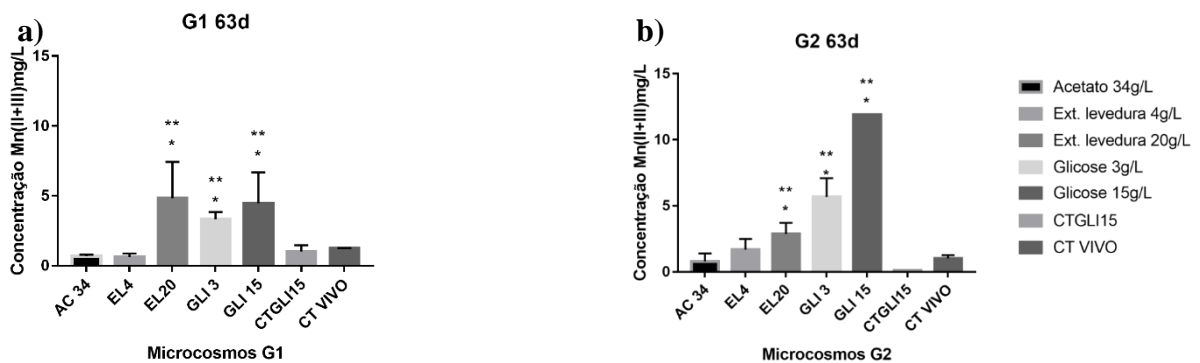


Figura 10: Quantificação de Mn(II,III) na fase líquida de microcosmos após 63 dias de incubação. (a) Microcosmos construídos a partir de água e sedimentos do ponto G1. (b) Microcosmos construídos com água e sedimentos do ponto G2. * $p < 0,05$ em relação ao controle vivo e ** $p < 0,05$ em relação ao controle autoclavado contendo glicose a 15g/L. (n=6. Barras correspondem ao desvio padrão)

Os resultados obtidos com ICP-OES relacionados aos microcosmos do ponto de coleta G1 mostraram as maiores concentrações de Ca e Mg em microcosmos adicionados de glicose a 3 e 15 g/L e extrato de leveduras a 20 g/L, apresentando diferença significativa em

comparação aos controles (figura 11a). A maior concentração de alumínio foi encontrada nos microcosmos adicionados de extrato de levedura a 20 g/L, as maiores concentrações de Ba foram mostradas em microcosmos com adição de glicose, sendo significativamente distintas dos controles, enquanto que as maiores concentrações de Zn foram encontradas em microcosmos com adição das maiores concentrações de glicose e extrato de leveduras (figura 11b).

Em microcosmos do ponto de coleta G2, as maiores concentrações de Ca e Mg foram observadas em glicose e extrato de leveduras a 20 g/L, significativamente maiores em relação aos controles (figura 11c). As concentrações de Al foram maiores em microcosmos com as maiores concentrações de glicose e extrato de leveduras, as maiores concentrações para Ba foram encontradas em microcosmos adicionados de glicose (nas duas concentrações) e de acetato a 34 g/L, e a maior concentração de Zn foi encontrada nos microcosmos com adição de glicose a 3 g/L (figura 11d).

As concentrações de Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, In, Ni, Pb, Pt, Sn, Sr, Ti, Tl e W apresentaram valores abaixo do limite de detecção.

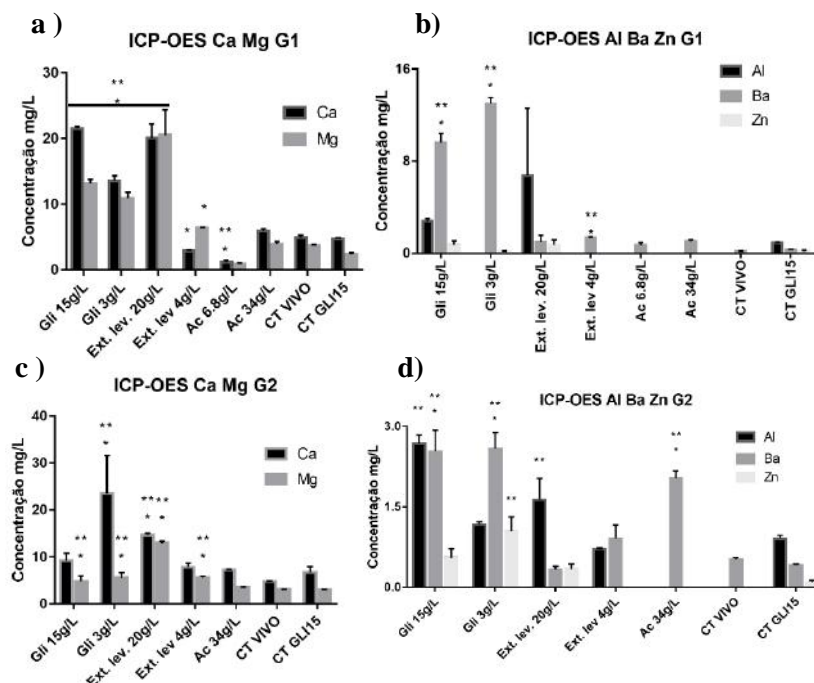


Figura 11: Análise quantitativa de elementos de interesse na fase líquida de microcosmos por ICP-OES. (a-b) Microcosmos construídos a partir de amostras de água e sedimentos coletadas no ponto G1. a) Quantificação de Ca e Mg. b) Quantificação de Al, Ba e Zn. (c-d) Microcosmos construídos a partir de amostras coletadas no ponto G2. c) Quantificação de Ca e Mg. d) Quantificação de Al, Ba e Zn. * $p < 0,05$ em relação ao controle vivo e ** $p < 0,05$ em relação ao controle glicose 15g/L. (n=3. Barras correspondem ao desvio padrão).

5.5. Avaliação detalhada das concentrações de Fe(II) ao longo do tempo em microcosmos utilizando a glicose 15 g/L como substrato orgânico

Nos microcosmos construídos com amostras do Rio Doce com escalas menores de tempo (Figura 12), observa-se um rápido crescimento das concentrações de Fe(II) em microcosmos utilizando glicose em comparação ao controle sem adição de substrato orgânico, que permaneceu em valores basais, apresentando estaticamente uma diferença significativa.

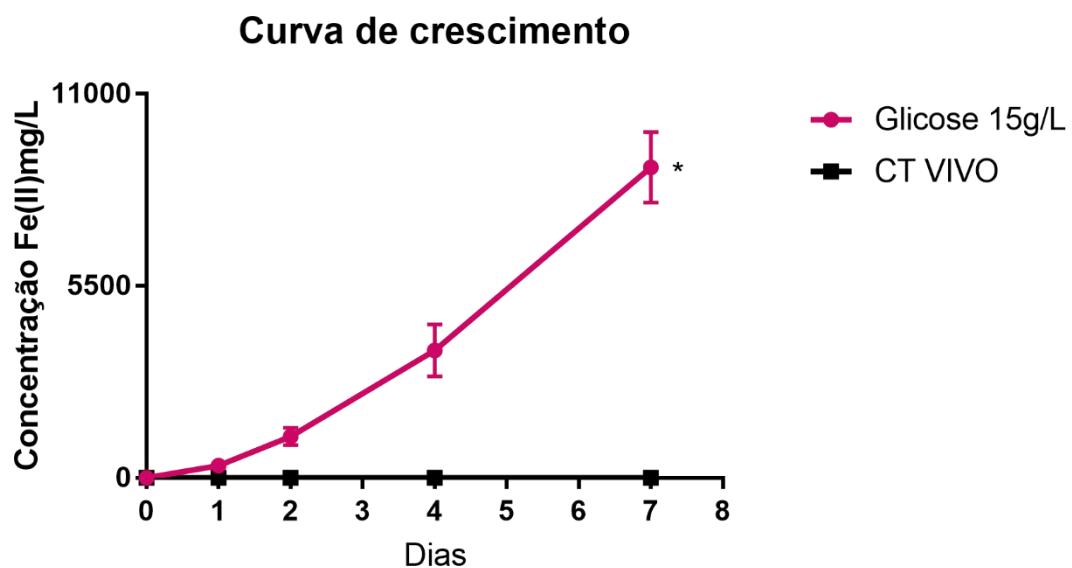


Figura 12: Quantificação de Fe(II) em microcosmos construídos a partir de água e sedimentos coletados no ponto GV, adicionados de glicose a 15 g/L. * $p < 0,05$ utilizando o teste t de Student em relação ao controle vivo. (n=6. Barras indicam desvio padrão).

5.6. Avaliação das concentrações de Fe(II) na fase líquida de microcosmos contendo concentrações crescentes de glicose

Nos microcosmos contendo adição de diferentes concentrações de glicose (Figura 13), é possível observar o aumento da concentração de Fe(II) para todos microcosmos experimentais com adição de glicose em comparação ao controle vivo sem adição de substrato orgânico, havendo estatisticamente uma diferença significativa entre 15 g/L, 50 g/L e 100 g/L em relação ao controle. Observamos também que as concentrações de Fe(II) aumentam com as concentrações de glicose até 15 g/L, quando parece haver saturação da taxa de dissolução reductiva, considerando o desvio padrão.

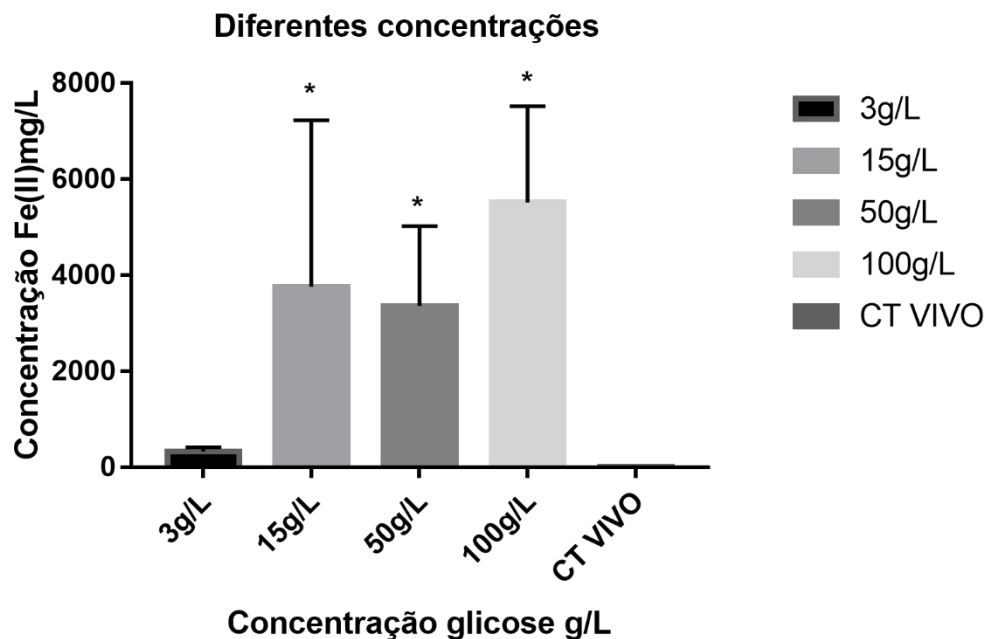


Figura 13: Quantificação de Fe(II) na fase líquida de microcosmos construídos com sedimentos e água coletados no ponto GV contendo concentrações crescentes de glicose. * $p < 0,05$ utilizando Teste t de Student em relação ao controle vivo. (n=6. Barras indicam desvio padrão).

5.7. Acoplamento do consumo de ácidos orgânicos a redução de Fe(III) a Fe(II) e de Mn(IV) a Mn(II,III)

Nos microcosmos do Rio Doce com adição de ácidos orgânicos (Figura 14), é possível observar que todos, exceto o com adição de propionato em 21 dias (figura 14c), apresentam concentrações de Fe(II) maiores em comparação ao controle sem adição de substrato orgânico. Acetato, propionato e lactato (14a, c, e) apresentam menores concentrações de Fe(II) em comparação ao butirato (14g) e este apresenta as maiores taxas de dissolução reductiva de Fe(II) deste experimento.

Em relação ao valor de p (tabela 9), observou-se que na maior parte dos pontos há diferença significativa no nível de confiança de 95% em relação aos controles.

De modo similar ao ferro, as concentrações de Mn(II,III) nos microcosmos experimentais com adição de ácidos orgânicos e glicose permanecem acima do controle sem adição de substrato orgânico (figura 14b, d, f, h), e as maiores concentrações foram encontradas quando há adição de butirato chegando a concentrações em torno de 6 mg/L

(figura 14h). Quando há adição de acetato, propionato e lactato, as concentrações de Mn(II,III) alcançam em torno de 1-2 mg/L (figura 14b, d, f).

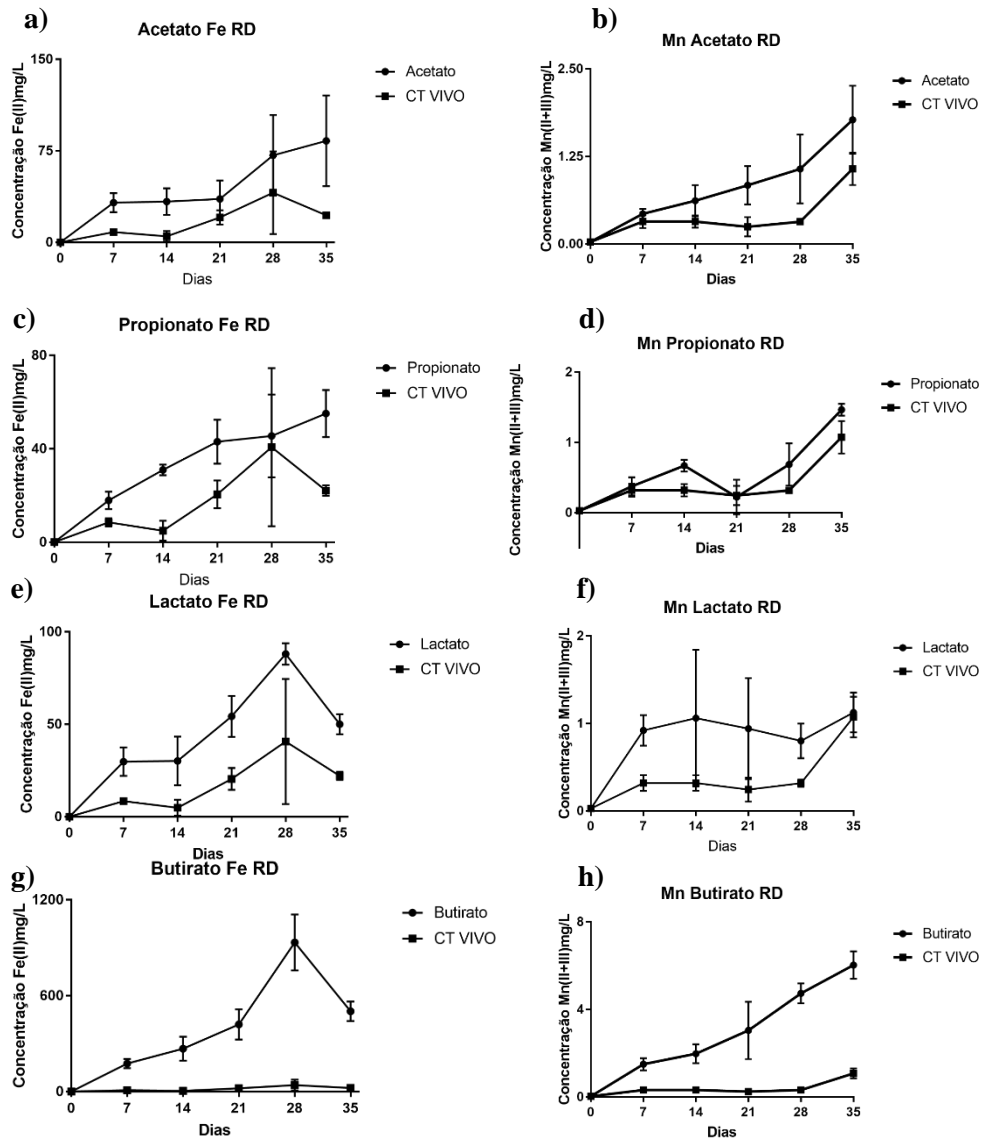


Figura 14: Quantificação de Fe(II) (a, c, e, g, i) e Mn(II, III) (b, d, f, h, j) em microcosmos construídos a partir de água e sedimentos coletados no ponto GV, adicionados de ácidos orgânicos. (a-b) Acetato 50 mMol/L. (c-d) Propionato a 33 mMol/L. (e-f) Lactato a 33 mMol/L. (g-h) Butirato a 25 mMol/L.

Em relação a significância estatística (tabela 10), observou-se que na maior parte dos resultados experimentais há diferença significativa no nível de confiança de 95% em relação aos controles, exceto para o acetato.

Comparação entre os resultados obtidos para as concentrações de Fe(II) e Mn(II,III) mostra comportamento similar entre os dois metais, o que indica processos semelhantes de dissolução redutiva.

Tabela 9: Teste t de Student de microcosmos com produtos de fermentação como substratos orgânicos do ponto GV para Fe. “CTV” indica os valores de “P” em relação ao controle vivo. Valores significativamente distinto ao nível de confiança de 95% são indicados em negrito.

	Acetato 50 mMol/L	Propionato 33 mMol/L	Lactato 33 mMol/L	Butirato 25 mMol/L	Glicose 16,6 mMol/L
Dias	CTV	CTV	CTV	CTV	CTV
7	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001
14	0,0001	<0,0001	0,0012	<0,0001	<0,0001
21	0,0483	0,0006	<0,0001	<0,0001	0,001
28	0,1445	0,7659	0,0071	<0,0001	<0,0001
35	0,0029	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabela 10: Teste t de Student de microcosmos com produtos de fermentação como substratos orgânicos do ponto GV (Mn). “CTV” indica os valores de “P” em relação ao controle vivo. Valores significativamente distinto ao nível de confiança de 95% são indicados em negrito.

	Acetato 50 mMol/L	Propionato 33 mMol/L	Lactato 33 mMol/L	Butirato 25 mMol/L	Glicose 16,6 mMol/L
Dias	CTV	CTV	CTV	CTV	CTV
7	0,1301	0,553	0,0135	0,002	0,0005
14	0,0378	0,0005	0,1016	<0,0001	<0,0001
21	0,0095	0,8828	0,0279	<0,0001	0,0011
28	0,0171	0,0472	0,0015	0,0023	<0,0001
35	0,0119	0,0061	0,7067	<0,0001	<0,0001

6. DISCUSSÃO

6.1. Caracterização da matéria orgânica dos sedimentos dos rios Doce e Gualaxo do Norte

A partir da análise da concentração de carboidratos (figura 14b), poder-se-ia inferir que os ambientes nos pontos de coleta G1, G2 e GV não apresentam características de ambientes eutrofizados ou hipertrofizados, por possuírem concentrações de carboidratos

abaixo de 5 mg/g no sedimento (Dell'Anno *et al.* 2002; Pusceddu *et al.* 2003; Sabadini-Santos *et al.*, 2014). Por outro lado, os sedimentos analisados estão enriquecidos por rejeito de mineração de ferro da SAMARCO, o que teria aumentado a fração mineral dos sedimentos, levando a diminuição da concentração de matéria orgânica, incluindo carboidratos, nos sedimentos. Exceto para G1 e G2, em GV matéria orgânica sedimentar é dominada por carboidratos e lipídios mais do que por proteínas, conforme indicado pelas razões proteínas: carboidratos e proteínas: lipídios (figura 14c) menores que 1 (Tabela 4). De acordo com Dell'Anno *et al.* (2002) e Díaz *et al.* (2007), essa matéria orgânica consiste em uma origem alóctone (vinda de fora da bacia), sendo confirmativo para o lançamento de esgotos devido a sua matriz lipídica. Dado que nosso ponto de coleta se localiza a montante da cidade de Governador Valadares, este esgoto poderia ser oriundo de localidades a montante. Várias delas, como Caratinga, Coronel Fabriciano, Itabira, João Monlevade, Mariana, Ouro Preto, Ponte Nova, Timóteo, Viçosa, Ipatinga, Belo Oriente, Santana do Paraíso, etc. englobando cerca de 1.200.000 habitantes (IBGE, 2019), localizam-se a montante e não tratam todo o esgoto gerado, lançando aproximadamente 27 milhões de m³/ano de esgotos no Rio Doce e afluentes (ANA, 2016). Por outro lado, as razões maiores que 1 para G1 e G2 indicam origem autóctone. De fato, há poucas localidades a montante de G1 e G2, como Antônio Pereira, Gesteira e Paracatu de Baixo, todos com menos de 5000 habitantes e, portanto, geração de baixos volumes de esgotos.

6.2.Culturas de enriquecimento de bactérias ferro-redutoras e a produção de magnetita

O aumento das concentrações de Fe(II) nas culturas de enriquecimento em relação aos controles autoclavados indica que existem microrganismos que realizam a redução dissimilatória de ferro no Rio Gualaxo do Norte, e que eles estão ativos e podem crescer em cultura. Além disso, na presença de microrganismos, os óxidos de Fe amorfos utilizados como fonte de Fe(III) foram convertidos em magnetita (FeO·Fe₂O₃). Esta conversão teria ocorrido pela redução de parte do Fe(III) a Fe(II), catalisada pelos microrganismos nativos, associada a dissolução de Fe(III) dos minerais amorfos e reprecipitação juntamente com o Fe(II) na forma de magnetita. Magnetita, vivianita (Fe₂(PO₄)₃·8H₂O), siderita (FeCO₃) e ferrugem verde (green rust, Fe₆(OH)₁₂CO₃·3H₂O) já foram observadas em culturas de microrganismos que fazem a redução dissimilatória de ferro (Lovley e Phillips, 1987;

Friedrickson *et al.*, 1998). Enquanto a magnetita provavelmente resulta da conversão dos óxidos de ferro sintéticos utilizados como fonte de Fe(III), a hematita, o quartzo, a muscovita e a fluorapatita seriam provenientes dos sedimentos de rio utilizados como inóculos (Almeida *et al.*, 2018). Desta forma, a conversão de óxidos de Fe(III) amorfos em magnetita nas culturas de enriquecimento indica que há microrganismos que fazem a redução dissimilatória de ferro nos sedimentos do Rio Gualaxo do Norte, tanto no ponto G1 quanto no G2.

A magnetita microbiana tem potencial biotecnológico, seja como material adsorvedor de metais pesados de ambientes (Ortiz, 2000), material magnético em ferrofluidos (Ghasemian *et al.*, 2015), em bio-separação (Qin *et al.*, 2015), em catálise (Veisi *et al.*, 2015) e em dispositivos magnéticos (Ge *et al.*, 2013).

6.3. Utilização de substratos orgânicos fermentáveis e não fermentável por microrganismos nativos e a redução de Fe(II) a Fe(III)

Nos microcosmos contendo diferentes substratos orgânicos e representando os três locais de coleta (figura 9), as concentrações de Fe(II) na fase líquida foram maiores naqueles adicionados de glicose em relação aqueles adicionados de extrato de levedura, e menores naqueles adicionados de acetato. Quando comparado ao valor máximo de concentração preconizado para Fe(dissolvido) pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas doces de Classe 2, todos microcosmos experimentais adicionados de glicose ou extrato de leveduras ficaram acima de 0,3 mg/L, mostrando a influência de substratos fermentáveis tanto simples quanto complexo na elevação do parâmetro Fe(solúvel) atingindo valores de até 5000 vezes maior nos microcosmos representando GV, 25.000 vezes naqueles representando G1, e 30.000 vezes naqueles representando G2. Mesmo dentre os microcosmos contendo acetato a 6,8 e 34 g/L, alguns controles vivos sem adição de substrato orgânico, e todos os controles autoclavados contendo glicose a 15g/L, as concentrações de Fe(II) atingiram valores acima dos permitidos. No conjunto, nossos resultados mostram que microrganismos nativos podem utilizar glicose ou matéria orgânica complexa (exemplificada pelo extrato de leveduras) para reduzir e solubilizar o ferro presente nos minerais dos sedimentos, elevando as concentrações de Fe(II) em milhares de vezes o máximo permitido pela legislação brasileira.

Se os microrganismos que respiram anaerobicamente e reduzem o ferro, como *Geobacter* spp. e *Shewanella* spp., fossem os principais responsáveis pela dissolução reductiva

do ferro, seria esperado que nos microcosmos contendo acetato (substrato não fermentável), as concentrações de Fe(II) seriam equivalentes aqueles contendo glicose ou extrato de levedura (substratos fermentáveis) (Lovley e Phillips, 1988), já que a quantidade de carbono e energia adicionada foi equivalente para os três substratos. No entanto, ocorreu o oposto, sugerindo que microrganismos que realizam a redução dissimilatória do ferro estão utilizando como substrato produtos de fermentação derivados da glicose e do extrato de levedura diferentes de acetato, e/ou que bactérias fermentadoras estão reduzindo intensivamente o ferro para eliminação de elétrons excedentes.

Em nosso desenho experimental inicial, o ponto G1 foi escolhido por não ter sido atingido pelo rejeito de mineração da Barragem de Fundão. No entanto, as concentrações de Fe(II) dos experimentos com microcosmos adicionados de extrato de leveduras e glicose a 15 g/L representando o ponto G1 foram equivalentes aos do ponto G2 ($p > 0,05$, dados de 14 dias), indicando que há muito Fe(III) passível de ser reduzido também no ponto G1. Apesar de não ter sido atingido pelo rejeito da SAMARCO, o ponto 1 do Rio Gualaxo do Norte situa-se a jusante da Mina Timbopeba, mina de ferro operada pela Vale S.A, e há registros de impacto ambiental pelas atividades de mineração de ferro, principalmente na forma de aporte de rejeito (Rodrigues *et al.*, 2013). Além disso, observamos valores para Fe dissolvido acima do preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas de Classe 2, onde se enquadram os rios Doce e Gualaxo do Norte, em todos os experimentos, incluindo alguns controles sem adição de substrato orgânico e controles autoclavados contendo glicose a 15 g/L.

A análise do pH dos microcosmos (tabela 8) mostrou que o pH não é responsável pelo aumento das concentrações de Fe(II) na fase líquida, já que o pH observado nos experimentos utilizando acetato e extrato de leveduras era similar, mas as concentrações de Fe(II) eram muito maiores nos experimentos utilizando extrato de leveduras. De fato, já foi mostrado que para haver a dissolução de minerais de ferro é necessário pH abaixo de 4,15 (Vuković, 1996) e nos microcosmos o pH variou entre 5 e 8,8. No caso do acetato, além de elevar os valores de pH, o próprio substrato orgânico poderia estar causando toxicidade para os microrganismos responsáveis pela dissolução reductiva de ferro nos sedimentos dos rios Doce e Gualaxo do Norte, como observado por Sallam (2007) para populações aeróbias e psicrófilas de *Pseudomonas spp.*, bactérias produtoras de H₂S, bactérias do ácido láctico e *Enterobacteriaceae*.

A quantificação de Mn(II,III) nos microcosmos representando os pontos G1 e G2 mostrou que em todos microcosmos, inclusive nos controles, as concentrações de Mn(II,III) ficaram acima de 0,1 mg/L, valor máximo preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas de Classe 2. Substratos fermentáveis levam a taxas de dissolução reductiva maiores de manganês, de modo similar ao ferro. Estas altas concentrações de Mn(II,III) poderiam ser explicadas pela alta concentração de Mn encontrada na composição mineralógica do Quadrilátero Ferrífero (Costa *et al.*, 2003), mobilizada pela dissolução reductiva do manganês catalisada direta ou indiretamente por microrganismos. A redução do manganês poderia ocorrer diretamente por catálise microbiana em mecanismo de redução dissimilatória/respiração anaeróbia (Lovley e Phillips, 1988), ou indiretamente, através da redução de Mn(IV) a Mn(II,III) acoplado a oxidação de Fe(II) gerado por microrganismos (Melton *et al.*, 2014).

As diferenças observadas nas concentrações de Ca e Mg entre os microcosmos contendo substratos orgânicos fermentáveis mostram que grande parte destes elementos foi remobilizada do sedimento para a fase líquida pelas atividades microbianas. O aumento das concentrações de Ca e Mg tanto nos microcosmos contendo glicose, quanto naqueles contendo extrato de leveduras em relação aos controles indica que a diminuição de pH causada pela fermentação da glicose não é responsável pelo aumento das concentrações de Ca e Mg. Em comparação com medidas anteriores, as concentrações de Ca e Mg na água de diversos pontos ao longo da Bacia do Rio Doce atingidos pelo rejeito de mineração da SAMARCO foram maiores do que as observadas neste trabalho, variando entre 172 e 429 mg/L para Ca, e entre 11 e 22 mg/L para Mg (Santos *et al.*, 2019). A Formação Gandarela, rica em rochas calcárias, está presente no Quadrilátero Ferrífero e, em particular, na bacia de drenagem do Rio Gualaxo do Norte, e seria uma possível fonte de Ca e Mg para os sedimentos e a água do rio.

A análise das concentrações de Al nos pontos G1 (figura 11c) e G2 (figura 11e) mostra que a presença de substratos fermentáveis leva a valores acima de 0,1 mg/L, valor máximo para Al(dissolvido) preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005. Mesmo o controle autoclavado apresentou concentrações de Al acima deste valor, indicando que a presença de glicose a 15 g/L é suficiente para dissolver o Al. É interessante notar que, nos controles autoclavados, os valores observados para concentração de Al eram muito similares nos dois pontos, indicando similaridade na forma em que o Al ocorreria nos pontos G1 e G2.

Por outro lado, as concentrações de Al aumentam consideravelmente nos microcosmos contendo microrganismos vivos e glicose a 15 g/L ou extrato de leveduras a 20 g/L, indicando um papel importante da microbiota na dissolução do Al. Comparação entre microcosmos representando G1 e G2 mostra que os microcosmos G1 tendem a apresentar concentrações de Al maiores em relação ao G2, o que poderia indicar a existência de populações microbianas mais aptas para biodisponibilização do Al em G1. Já foi mostrado que, na presença de substrato fermentável, *Clostridium butyricum* é capaz de dissolver óxidos de Fe e disponibilizar Al, que tem tendência a associar-se a goetita (Dominik *et al.*, 2002), que é um dos minerais predominantes no rejeito da SAMARCO. Relacionando com as concentrações de Fe(II) observadas nos mesmos experimentos, observa-se que as maiores concentrações de Al coincidem com as maiores concentrações de Fe(II), o que poderia indicar que a biodisponibilização do Al ocorre devido a dissolução redutiva do Fe.

Em relação ao Ba, com exceção dos controles e dos microcosmos representando o ponto G2 contendo extrato de leveduras a 20 g/L e acetato a 6,8 g/L, todos outros microcosmos apresentam valores acima de 0,7 mg/L, preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005 como máximo permitido para águas de Classe 2. Como observado para o Al, as maiores concentrações de Ba são encontradas no ponto G1 (figura 11b, d).

Para o Zn, os pontos G1 e G2 apresentam concentrações semelhantes de 0,5-1 mg/L em microcosmos com substratos orgânicos fermentáveis. O valor preconizado para águas de Classe 2 pela Resolução CONAMA 357/2005 para Zn é 0,18 mg/L, portanto há valores acima desta concentração nos microcosmos representando G1 contendo glicose a 15 g/L e extrato de leveduras a 20 g/L, e nos microcosmos representando G2 contendo glicose a 3 e a 15 g/L e extrato de leveduras a 20 g/L. De modo semelhante ao alumínio, nossos resultados sugerem que a dissolução redutiva do ferro leva a dissolução de Ba e Zn.

Em outro estudo por Keim *et al.* (2015), foi observado que biofilmes crescidos em microcosmos contendo água e sedimentos do Rio Gualaxo do Norte, incluindo amostras do ponto G1 e de um afluente a montante, foram observados minerais associados a microrganismos procariotos e microalgas, contendo principalmente manganês, e traços de Al, Ba e Ca, consistindo provavelmente em óxidos de manganês (Keim *et al.*, 2015). A composição destes biominerais é consistente com os elementos mobilizados pelos microrganismos nos microcosmos, o que poderia indicar que eles seriam comuns no Rio Gualaxo do Norte, sendo dissolvidos por ação microbiana nos nossos microcosmos. De fato,

Keim *et al.* (2015) observaram biominerais semelhantes aos observados nos microcosmos em grãos de sedimento superficial coletados no rio.

Em microcosmos utilizando glicose em diferentes concentrações, é possível observar que a dissolução redutiva é modulada de forma dose-dependente, havendo saturação das taxas de dissolução redutiva em concentrações de glicose acima de 15 g/L. É interessante notar que essa saturação ocorre na mesma ordem de grandeza que vários minerais de Fe(II), o que indicaria que o Fe(II) gerado poderia estar sendo precipitado na forma de minerais, sendo incorporado a fase sólida. Desta forma, é possível que concentrações maiores de glicose levem a redução de maiores quantidades de Fe(III) a Fe(II), porém o Fe(II) excedente não é medido pois está localizado na fração sólida.

Nos microcosmos do ponto GV com adição de ácidos orgânicos e glicose do ponto GV, todas as concentrações de Fe ao longo tempo permaneceram acima do preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005. Ao contrário do esperado (Lovley e Phillips, 1988), acetato e lactato não se mostraram os doadores de elétrons mais efetivos para a dissolução redutiva de Fe(III), porém as maiores concentrações de Fe(II) foram encontradas nos microcosmos contendo glicose e butirato. Há a possibilidade de a glicose ser convertida em butirato através de fermentação, que seria utilizada por microrganismos não fermentadores como doadores de elétrons para a redução dissimilatória de Fe(III) a Fe(II), semelhante ao observado por Gounou *et al.* (2010).

As concentrações de Mn(II,III) nos microcosmos mostraram a mesma dinâmica observada para Fe(II), com valores entre 5-6 mg/L representando as maiores concentrações de Mn(II,III) na fase líquida dos microcosmos adicionados de glicose e butirato, em comparação com microcosmos contendo acetato, propionato e lactato, que mostraram concentrações máximas de Mn(II,III) em torno de 1-2 mg/L. Não obstante, as concentrações de Mn dissolvido para todos microcosmos ficaram acima do preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005, inclusive nos controles, o que indicaria que o manganês estaria numa forma acessível para a dissolução redutiva, mesmo na presença de pequenas quantidades de substratos orgânicos, como ilustrado pelos resultados de quantificação de proteínas, carboidratos e lipídios (Queiroz, 2018).

A heterogeneidade microbiana devido ao caráter de amostras ambientais, é responsável pela presença de desvios-padrão altos encontrados na maioria dos experimentos realizados, mesmo realizando triplicatas ou sextuplicatas das amostras.

O fato das concentrações de Mn(II,III) continuarem subindo em 35 dias, enquanto que as de Fe(II) em geral caem entre 28 e 35 dias indica que o Fe(II) está deixando a fase líquida, o que poderia ocorrer devido a (i) síntese de magnetita (Lovley e Phillips, 1988), (ii) oxidação do Fe(II) a Fe(III) acoplado a redução do Mn(IV) a Mn(II, III) (Kappler e Straub, 2005), e/ou (iii) oxidação do Fe(II) a Fe(III) por O₂ que poderia se difundir pela tampa dos frascos a partir do momento em que o substrato orgânico adicionado estivesse esgotado.

As concentrações de Fe(II) e Mn(II,III) em microcosmos com adição de extrato de leveduras demonstram o risco trazido pelo lançamento de esgotos in natura nos rios da Bacia do Rio Doce, levando a solubilização extensa do ferro, manganês, alumínio, bário e zinco, tornando-os solúveis e, portanto, biodisponíveis.

7. CONCLUSÕES

- A presença de magnetita (FeO·Fe₂O₃) nas culturas de enriquecimento mostra que há a presença de bactérias que realizam a dissolução redutiva do Fe(III) a Fe(II) no Rio Gualaxo do Norte, e que elas estão ativas e são capazes de crescer no meio FWA. Como as nanopartículas de óxido de ferro sintético não foram observadas após 170 dias, podemos supor que os microrganismos em metade das culturas de enriquecimento reduziram cerca de 1/3 do Fe(III) a Fe(II) e levou a dissolução dos minerais amorfos presentes no meio e precipitação de magnetita (Fe²⁺O·Fe³⁺₂O₃).
- A adição de substratos orgânicos leva ao aumento das concentrações de Fe(II) e Mn(II,III). O Fe(II) gerado pode permanecer em solução, ou reprecipitar na forma de minerais como a magnetita.
- A quantificação de Fe e Mn fase líquida dos microcosmos mostrou no ponto no Rio Gualaxo do Norte a jusante da barragem de Fundão (G2) apresentou maiores concentrações de Fe(II) e Mn(II,III) em relação ao Rio Gualaxo do Norte não atingido pelo rejeito de mineração da SAMARCO (G1) e ao Rio Doce em Governador Valadares (GV).
- Apesar de o ponto de coleta no Rio Gualaxo do Norte a montante (G1) não ter sido atingido pelo rejeito de mineração de ferro da SAMARCO, nossos resultados mostraram extensa dissolução redutiva de ferro e manganês também nos microcosmos G1. Isto poderia ser explicado pelo fato de que antes do desastre em nov/2015 o rio já apresentava altas concentrações de Fe e Mn devido a geologia local

e a mineração de ferro. As principais nascentes do Rio Gualaxo do Norte estão localizadas nas dependências da Mina de Timbopeba, mina de ferro operada pela Vale S.A., e essa mina poderia ser uma fonte de ferro e manganês para o rio.

- A glicose leva a concentrações maiores de Fe(II) e Mn(II,III) em comparação ao extrato de leveduras e acetato nos microcosmos, indicando que os microrganismos que realizam a dissolução redutiva do Fe e Mn utilizam a glicose, substrato fermentável, como doador de elétrons, ou que microrganismos fermentadores estejam utilizando a glicose, disponibilizando produtos de fermentação que possam ser utilizados por microrganismos que realizam a dissolução redutiva. O fato de que o butirato, mostrou-se tão efetivo quanto a glicose na dissolução redutiva de Fe e Mn indica que os microrganismos que estão reduzindo estes metais estariam utilizando como substrato o butirato gerado pela fermentação da glicose.
- A análise de elementos químicos após 35 dias mostra concentrações acima do preconizado pela Resolução CONAMA 357/2005 para Al, Ba, e Zn, tanto nos microcosmos G1, quanto nos G2. A dissolução destes elementos indica que eles ocorrem em frações minerais mobilizáveis por microrganismos, provavelmente óxidos de manganês biogênicos, pelo menos no caso de Mn, Ba e Al. De fato, os maiores valores de Al, Ba, Mn e Zn foram encontrados nos microcosmos G1 que não sofreu aporte de rejeito de mineração da SAMARCO, o que mostra que estas frações já estavam presentes no Rio Gualaxo do Norte anteriormente ao rompimento da Barragem de Fundão.
- Nossos resultados sugerem que o aporte de matéria orgânica no Rio Doce e afluentes afetados por rejeito de mineração de ferro da SAMARCO e outras mineradoras pode levar a redução de ferro e manganês nos sedimentos, levando a dissolução de minerais e ao aumento significativo das concentrações de ferro, manganês, alumínio, bário e zinco na água do rio, diminuindo a qualidade da água e dificultando o tratamento desta água para consumo humano. Por outro lado, processos químicos e/ou microbiológicos podem levar a oxidação do Fe(II) e Mn(II,III) em excesso, resultando na precipitação de minerais secundários que podem capturar íons metálicos dissolvidos na água, como Al^{3+} , Ba^{2+} e Zn^{2+} . No entanto, os minerais secundários são em geral menos cristalinos e de menor tamanho, o que faz com que sejam mais fáceis de dissolver.
- Nossos resultados indicam a necessidade de tratamento de esgotos, além de controle do lançamento de matéria orgânica em geral na Bacia do Rio Doce, para evitar a

dissolução redutiva de óxidos de ferro e manganês em excesso e a liberação de Fe, Mn, Al, Ba e Zn em níveis potencialmente tóxicos para a biota e os seres humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C. A., Oliveira, A. F., Pacheco, A. A., Lopes, R. P., Neves, A. A. e Queiroz, M. E. L. R. (2018). Characterization and evaluation of sorption potential of the iron mine waste after SAMARCO dam disaster in Doce River basin - Brazil. *Chemosphere* 209, 411-420.
- ANA (2016). Agência Nacional de Águas. Sala de situação do Rio Doce. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/sala-de-situacao/rio-doce/rio-doce-saiba-mais>>.
- ANEEL (2016). Agência Nacional de Energia Elétrica. Processo ANEEL 48500.005550/2001-74. Consultado em 12 de novembro de 2019.
- ATSDR (2005). Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine. Toxicological Profile for Zinc. 21-114.
- ATSDR (2008). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Statement. Manganese.p. 1-10.
- Banerjee, R., Roy, S., Dasgupta, S., Mukhopadhyay, S. e Miura, H. (1999). Petrogenesis of ferromanganese nodules from east of the Chagos Archipelago, Central Indian Basin, Indian Ocean. *Marine Geology* 157, 145-158.
- Belzile, N., Chen, Y. W. e Grenier, M. (2001) Freshwater metallic concretions from an acidic lake characterized by X-ray energy dispersive spectrometry. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* 46, 145-151.
- Berger, H. (1986). Study of the $K\alpha$ emission spectrum of copper. *X-ray Spectrometry* 15, 241-243.
- Blázquez, J. S., Conde, C. F. e Conde A. (2005). Non-isothermal approach to isokinetic crystallization processes: Application to the nanocrystallization of HITPERM alloys. *Acta Materialia* 53, 2305-2311.
- Brutinel, E. D., e Gralnick, J. A. (2012). Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 41-48.
- Carmo, F.F., Kamino, L.H.Y, Júnior, R.T., Campos, I.C., Carmo, Fe.F., Silvino, G., Castro, K.J.S.X., Mauro, M.L., Rodrigues, N.U.A., Miranda, M.P.S. e Pinto, C.E.F. (2017). Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in Ecology and Conservation* 15, 145-151.
- Carvalho, G.O., Pinheiro, A.A., Sousa, D.M., Padilha, J.A., Souza, J.S., Galvão, P.M., Paiva, T.C., Freire, A.S., Santelli, R.E., Malm, O. e Torres, J.P.M.(2018). Metals and Arsenic in Water Supply for Riverine Communities Affected by the Largest Environmental Disaster in Brazil: The Dam Collapse on Doce River. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* 10, 299-307.
- CBH-DOCE (2019). Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Doce. Portal de Acompanhamento das Ações dos Comitês da Bacia do Rio Doce. Disponível em: <http://cbhdoce.org.br/portal/>. Acesso em: 14 nov. 2019.
- CBMM. Conhecer a CBMM. Disponível em: <https://www.cbmm.com/pt/Partner-with-CBMM/Our-Company>. Acesso em: 16 dez 2019.
- Cerrato, J. M., Falkinham, J. O., Dietrich, A. M., Knocke, W. R., McKinney, C. W., Pruden, A. (2010). Manganese-oxidizing and reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Research* 44, 3935-3945.
- Champine, J. E., Underhill, B., Johnston, J. M., Lilly, W. W. e Goodwin, S. (2000). Electron transfer in the dissimilatory iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*. *Anaerobe* 6, 187-196.
- Charbonnier, C. e Anschutz, P.(2019). Spectrophotometric determination of manganese in acidified matrices from (pore)waters and from sequential leaching of sediments. *Talanta journal* 195, 778-784.

- Childs, C. W., Leslie, D. M. (1977) Interelement relationships in iron-manganese concretions from a catenary sequence of yellow-grey earth soils in loess. *Soil Science*. 123, 369–376.
- Childers, S. E., Ciuffo, S. e Lovley, D. R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* 416, 767-769.
- CONAMA (2005). Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.
- Cornu, S., Deschatrettes, V., Salvador-Blanes, S., Clozel, B., Hardy, M., Branchut, S., LeForestier, L. (2005). Trace element accumulation in Mn-Fe-oxide nodules of a planosolic horizon. *Geoderma* 125, 11–24.
- Costa, A. T., Nalini Jr. H. A., Lena, J. C., Friese, K. e Mages, M. (2003). Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Environmental Geology*. 45, 226-235.
- CPRM (2019). Serviço Geológico do Brasil. Geoparque Quadrilátero Ferrífero. Disponível em: <http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/17149/quadrilatero.pdf?sequence=1>. Acesso em 28 out. 2019.
- Dell'Anno, A., Mei, M. L., Pusceddu, A., e Danovaro, R. (2002). Assessing the trophic state and eutrophication of coastal marine systems. A new approach based on the biochemical composition of sediment organic matter. *Marine Pollution Bulletin* 44, 611–622.
- Díaz, E., Valencia, V., e Villate, F. (2007). Size-fractionated seston abundance and biochemical composition, over the anchovy spawning period in the Basque shelf (Bay of Biscay), during years 2000 and 2001. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 341, 45–59.
- DNPM (2017). Departamento Nacional de Produção Mineral. Anuário Mineral Brasileiro. Disponível em: http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-brasileiro/amb_metalicos2017. Acesso em: 2 out. 2019.
- Dominik, P. P., Heiko B., Noureddine B., Jacques K., Martin. (2002). Limitations to the reductive dissolution of Al-substituted goethites by *Clostridium butyricum*. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1147-1155.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., e Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Esquerre, N., Basso, L., Dubuquoy, C., Djouina, M., Chappard, D., Blanpied, C., Desreumaux, P., Vergnolle, N., Vignal, C., Body-Malapel, M. (2019). Aluminum Ingestion Promotes Colorectal Hypersensitivity in Rodents. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7, 185-196.
- Esther, J., Sukla, L. B., Pradhan, N. e Panda, S. (2015). Fe (III) reduction strategies of dissimilatory iron reducing bacteria. *Korean Journal of Chemical Engineering* 32, 1-14.
- Findlay A. J., Estes E. R., Gartman A., Yücel M, Kamyshny Jr A. e Luther III G. W. Iron and sulfide nanoparticle formation and transport in nascent hydrothermal vent plumes (2018). *Nature Communications* 10, 1597.
- Fitzgerald, L. A., Petersen, E. R., Ray, R. I., Little, B. J., Cooper, C. J., Howard, E. C., Ringeisen, B. R., e Biffinger, J. C. (2012) *Shewanella oneidensis* MR-1 Msh pilin proteins are involved in extracellular electron transfer in microbial fuel cells. *Process Biochemistry* 47, 170-174
- Fouchee, A., Naudé N., Naik S. e Schommarz K. (2016). Optimization of flotation pH for the reverse flotation of an African lowgrade BIF haematite ore. *Journal of the Southern African Institute of Mining and Metallurgy* 116, 115–118.
- Friedrickson, J. K., Sachara, J. M., Kennedy, D. W., Dong, H., Onstott, T. C., Hinman, N. W., e Li, S-M. (1998). Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 3239-3257.
- Gasparatos, D. (2013). Sequestration of heavy metals from soil with Fe-Mn concretions and nodules. *Environmental Chemistry Letters* 11, 1-9.
- Gerchacov, S. M. e Hatcher, P. G. (1972). Improved technique for analysis of carbohydrates in sediment. *Limnology and Oceanography* 17, 938–943.

- Ge, X., Zhang, W., Lin, Y. e Du, D. (2013). Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 58, 486-491.
- Geszvain, K., Butterfield, C., Davis, R.E., Madison, A.S., Lee, S.W., Parker, D.L., Soldatova, A., Spiro, T.G., Luther, G.W. e Tebo, B.M. (2012). The molecular biogeochemistry of manganese(II) oxidation. *Biochemical Society Transactions* 40, 1244-1248.
- Ghasemian, M., Ashrafi, Z. N., Goharkhah, M. e Ashjaee, M. (2015). Heat transfer characteristics of Fe₃O₄ ferrofluid flowing in a mini channel under constant and alternating magnetic fields. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 381, 158-167.
- Gonçalves, J. C. (2003) Tabela Periódica Comentada. Editora Atômica, Curitiba, 120pp.
- Gounou, C., Bousserrhine, N., Varrault, G. e Mouchel, J. (2010). Influence of the Iron-Reducing Bacteria on the Release of Heavy Metals in Anaerobic River Sediment. *Water, Air, & Soil Pollution*. 212, 123–139.
- Greene, A. C., Patel, B. K. C. e Yacob, S. (2009). *Geoalkalibacter subterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe(III)- and Mn(IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family *Desulfuromonadaceae* and the genus *Geoalkalibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 781-785.
- Halbach, P. (1976). Mineralogical and geochemical investigations of Finnish lakes ore. *Bulletin of the Geological Society of Finland* 48, 33–42.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48, 422-427.
- Hölzer, G., Fritsch, M., Deutsch, M., Hartwig, J. e Forster, E. (1997). K alpha_{1,2} and K beta_{1,3} X-ray emission lines of the 3d transition metals. *Physical Review A* 51, 4554–4568.
- Hurley, L. S. (1981) Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. *Physiological Reviews* 61, 249–295.
- IBGE (2019). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados.html?view=municipio>. Acesso em: 18 dez 2019.
- IBRAM (2015). Instituto Brasileiro De Mineração. Informações Sobre A Economia Mineral Brasileira. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00005836.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2019.
- ICDD (2019). International Centre for Diffraction Data International Centre for Diffraction Data—PDF4+Relational Powder Diffraction File. Disponível em: <http://www.icdd.com/products/pdf4.htm> (acessado em 2 nov 2019)
- ICOLD (2001). International Commission on Large Dams. Tailings Dams—risk of dangerous occurrences, lessons learnt from practical experiences,” United Nations Environmental Programme (UNEP), Division of Technology, Industry and Economics (DTIE) and International Commission on Large Dams (ICOLD), Paris, France, Bulletin 121.
- IGAM (2015). Instituto Mineiro de Gestão de Águas. Monitoramento da qualidade das águas superficiais do rio doce no estado de minas gerais. Acompanhamento da Qualidade das Águas do Rio Doce Após o Rompimento da Barragem da SAMARCO no distrito de Bento Rodrigues – Mariana/MG. 15 de dez 2015.
- JUSBRASIL.(2011). Saneamento básico é desafio na Bacia do Rio Doce. Disponível em: <https://almg.jusbrasil.com.br/noticias/2812634/saneamento-basico-e-desafio-na-bacia-do-rio-doce>. Acesso em: 10/06/2019.
- Kappler, A., e Straub K.L. (2005). Geomicrobiological Cycling of Iron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 59, 85–108.
- Keim, C. N. ; Nalini, H. A. ; de Lena, J. C. (2015) . Manganese Oxide Biominerals from Freshwater Environments in Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Geomicrobiology Journal*. 32,549-559.
- Klee R.J. e Graedel T.E. (2004). ELEMENTAL CYCLES: A Status Report on Human or Natural Dominance. *Annual Review of Environment and Resources* 29, 69–107.
- Koschinsky, A., Halbach, P. (1995). Sequential leaching of marine ferromanganese precipitates. *Geochim Cosmochim Acta* 59, 5113–5132.

- Lovley, D. R. (1987). Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. *Geomicrobiol. J.* 5, 375-399.
- Lovley, D. R. e Phillips, E. J. P. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and environmental microbiology.* 6, 1472-80.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. e Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. e Stahl, D.A. (2016). *Microbiologia de Brock, In: Ecologia microbiana e microbiologia ambiental, In: Ciclo dos nutrientes.* 14ª eds. pg. 639-642.
- Magnuson, T. S., Isoyama, N., Myerson, A. L. H., Davidson, G., Maroney, M. J., Geesey, G. G., e Lovley, D. R. (2001). Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal* 359, 147-152.
- Manceau, A., Drits, V., Silvester, E., Bartoli, C., Lanson, B. (1997) Structural mechanism of Co²⁺oxidation by the phyllo-manganate buserite. *American Mineralogist* 82, 1150-1175.
- Mansur, R. (2019). SAMARCO recebe licença e poderá operar em Mariana após tragédia de 2015. *O Tempo, Minas Gerais.* 25 out. 2019. Disponível em: <https://www.otempo.com.br/economia/SAMARCO-recebe-licenca-e-podera-operar-em-mariana-apos-tragedia-de-2015-1.2254097>
- Marsh, B. J., e Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research* 7, 574-576.
- Marshall, J. (2018). Rompimentos de barragens de rejeito em Mount Polley e Mariana. Disponível em: https://www.policyalternatives.ca/sites/default/files/uploads/publications/BC%20Office/2018/08/CCPA_polley_report_summary_translation.pdf. Acesso em 7 out. 2019.
- McKenzie, R. M. (1989). Manganese oxides and hydroxides. In: Dixon JB, Weed SB (eds) *Minerals in soil environments*, 2ª edição, SSSA Book Series. 1. SSSA, Madison, 439-465.
- McLachlan, D. R., Kruck, T. P., Lukiw, W. J., Krishnan, S. S. (1991). Would decreased aluminum ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease?. *Canadian Medical Association Journal* 145, 793-804.
- McLaughlin, S. e Brown, J. (1981). Diffusion of Calcium Ions in Retinal Rods. *The Journal of General Physiology.* 77, 475-487.
- Melfi, A. J., Misi, A., Campos, D. de A., & Cordani, U. G. (2016). Recursos minerais no Brasil: problemas e desafios. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. Recuperado de <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-7006.pdf>.
- Melton E. D., Swanner E. D., Behrens S., Schmidt C. e Kappler A. (2014) The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nature Reviews | Microbiology* 12, 797-808.
- Nealson, K. H. e Myers, C. R. (1992). Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 439-443.
- Nevin, K. P., e Lovley, D. R. (2000). Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2294-2299.
- Novotnik B., Zorz J., Bryant S e Strous M. (2019). The Effect of Dissimilatory Manganese Reduction on Lactate Fermentation and Microbial Community Assembly. *Frontiers in Microbiology* 10, 1007.
- Ortiz, N. (2000). Estudo da utilização de magnetita como material adsorvedor dos metais Cu²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺ e Cd²⁺ em solução. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 176 f.
- Palumbo, J. C., Horowitz, A. R. e Prabhaker, N. (2001). Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection.* 20, 739-765.
- Papini, R. M., Brandão P. R. G., e Peres A. E. C. (2001). Cationic flotation of iron ores: Amine characterization and performance. *Minerals & Metallurgical Processing* 18, 5-9.

- PCH (2016). PCH atingida pela SAMARCO tem concessão extinta. 13 set. 2016. Disponível em: <<https://abrapch.org.br/2016/09/13/pch-atingida-pela-SAMARCO-tem-concessao-extinta/>>. Consultado em 15 de novembro de 2019
- Petkov, V., Ren, Y., Saratovsky, I., Pasten, P., Gurr, S., Hayward, M., Poeppelmeier, K. e Gaillard, J. F. (2009) Atomic-scale structure of biogenic materials by total x-ray diffraction: a study of bacterial and fungal MnO_x. ACS Nano 3, 441–445.
- Plum, L. M., Rink, L. e Haase, H. (2010). The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. International Journal Of Environmental Research And Public Health 7, 1342-1365.
- Pusceddu, A., Dell'Anno, A., Danovarto, R., Manini, E., Sara, G., e Fabiano, M. (2003). Enzymatically hydrolysable protein and carbohydrate sedimentary pools as indicators of the trophic state of detritus sink systems: a case study in a Mediterranean Coastal Lagoon. Estuaries 26, 641–650.
- Qin, H., Wang, C. M., Dong, Q. Q., Zhang, L., Zhang, X., Ma, Z. Y. e Han, Q. R. (2015). Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles loaded with isoniazid. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 381, 120-126.
- Queiroz, H. M., Nóbrega, G. N., Ferreira, T. O., Almeida, L. S., Romero, T. B., Santaella, S. T., Bernardino, A. F. e Otero, X. L. (2018). The SAMARCO mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination?. Science of the Total Environment. 637–638, 498–506.
- Rodrigues, A.S.L., Malafaia G., Costa A.T., Junior H.A.N. (2013). Evaluation of the mineral exploration influence on sediment composition in the Gualaxo do Norte River Basin (MG-Brazil) based on geochemical and stratigraphic data. Environmental Earth Sciences 68, 965–972.
- Ross, D. E., Brantley, S. L., e Tien, M. (2009). Kinetic characterization of OmcA and MtrC, terminal reductases involved in respiratory electron transfer for dissimilatory iron reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. Applied and Environmental Microbiology 75, 5218-5226.
- Sabadini-Santos, E., Silva, T. S., Lopes-Rosa, T. D., Mendonça-Filho, J. G., Santelli, R. E. e Crapez, M. A. C. (2014). Microbial Activities and Bioavailable Concentrations of Cu, Zn, and Pb in Sediments from a Tropic and Eutrothicated Bay. Water, Air, & Soil Pollution 225.
- Salgado, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo, 1996. cap. 3.2, p. 154-172.
- Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control 18, 566-575.
- SAMARCO (2011). Relatório Anual de Sustentabilidade. Disponível em: <<https://www.SAMARCO.com/wp-content/uploads/2016/08/2011-Relatorio-Anual-de-Sustentabilidade.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2019.
- SAMARCO (2013). Relatório da Administração e Demonstrações Financeiras. Disponível em: <https://www.SAMARCO.com/wp-content/uploads/2016/08/2013-Relatorio-da-Administra-o-e-Demonstra-es-Financeiras.pdf>. Acesso em: 31 out. 2019.
- SAMARCO^a (2016). Entenda o rompimento. SAMARCO, 2016. Disponível em: <<https://www.SAMARCO.com/rompimento-de-fundao/>>. Acesso em: 28 de mai. 2019.
- SAMARCO^b (2016). Relatório sobre as Causas Imediatas da Ruptura da Barragem de Fundão. Acesso em: 02/11/2019. Disponível em: <<http://fundaoinvestigation.com/wpcontent/uploads/general/PR/pt/FinalReport.pdf>>.
- SAMARCO (2019). SAMARCO e a economia. Disponível em: <https://www.samarco.com/samarco-e-a-economia/>. Acesso em: 16 dez. 2019.
- Sandatlas. (2019). Composition of the earths crust. Disponível em: <https://www.sandatlas.org/composition-of-the-earths-crust/>. Acesso em: 28 ago. 2019.
- Santos, O. S. H., Avellar, F. C., Alves, M., Trindade, R. C., Menezes, M. B., Ferreira, M. C., França, G. S., Cordeiro, J., Sobreira, F. G., Yoshida, I. M., Moura, P. M., Baptista, M. B. e Scotti, M. R. (2019). Understanding the Environmental Impact of a Mine Dam Rupture in Brazil: Prospects for Remediation. Journal of Environmental Quality 48, 439-449.

- Saratovsky, I., Wightman, P., Pasten, P., Gaillard, J. F., Poeppelmeier, K. (2006). Manganese oxides: parallels between abiotic and biotic structures. *Journal of the American Chemical Society* 128, 188–198.
- Schwertmann, U., Carlson, L., Murad, E. (1987) Properties of iron oxides in two Finnish lakes in relation to the environment of their formation. *Clay Minerals* 35, 297–304.
- Sciencedaily (2019). Metal. Disponível em: <<https://www.sciencedaily.com/terms/metal.htm>>. Acesso em: 3 nov. 2019.
- Shelobolina, E. S., Nevin, K. P., Blakeney-Hayward, J. D., Johnsen, C. V., Plaia, T. W., Krader, P., Woodard, T., Holmes, D. E., Vanpraagh C. G. e Lovley, D. R. (2007). *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 126-135.
- Silva, A.C., Cavalcante, L.C.D., Fabris, J.D., Júnior, R.F., Barral, U.M., de M. Farnezi, M.M., Viana, A.J.S., Ardisson, J.D., Fernandez-Outon, L.E., Lara, L.R.S., Stumpf, H.O., Barbosa, J.B.S. e da Silva, L.C. (2017). Características químicas, mineralógicas e físicas do material acumulado em terraços fluviais, originado do fluxo de lama proveniente do rompimento de barragem de rejeitos de mineração de ferro em Bento Rodrigues. *Revista Espinhaço* 9, 44-53.
- Slobodkina, G. B., Kolganova, T. V., Querellou, J., BonchOsmolovskaya E. A. e Slobodkin, A. I. (2009). *Deferribacter autotrophicussp. nov.*, an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1508-1512.
- Sousa, R. (2019) Mineração. Brasil Escola. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/geografia/mineracao.htm>>. Acesso em 16 out. 2019.
- Straub, K. L., Benz, M. e Schink B. (2001). Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology*. 34, 181–186.
- SUPRAM, 2008. Parecer Único SUPRAM-ZM. Indexado ao Processo N°: 00015/1984/066/2008, Disponível em: <http://200.198.22.171/reunioes/sistema/arquivos/material/SAMARCO Mineracao.pdf>.
- Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R. and Webb, S.M. (2004) Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 32, 287–328
- Thomas, M., Bowie, D., Walker, R. (1998). Acute barium intoxication following ingestion of ceramic glaze. *Postgraduate Medical Journal* 74, 545-546
- Totou, A. R. (2010). Efeito da dispersão da deslamagem e flotação de polpas de minérios hematíticos itabiríticos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas)-Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 96 f.
- Vale (2017). Mineração. Disponível em: <http://www.vale.com/brasil/PT/business/mining/Paginas/default.aspx>. Acesso em 16 dez. 2019.
- Vallee, B. L., Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews* 73, 79-118.
- Veisi, H., Gholami, J., Ueda, H., Mohammadi, P. e Noroozi, M. (2015). Magnetically palladium catalyst stabilized by diaminoglyoxime-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as active and reusable catalyst for Suzuki coupling reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 396, 216-223.
- Viollier, E., Inglett, P.W., Hunter, K., Roychoudhury, A.N. e Van Cappellen, P. (2000) The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural Waters. *Applied Geochemistry* 15, 785-790.
- Vodyanitskii, Y.N., Plekhanova, I.O. (2014). Biogeochemistry of Heavy Metals in Contaminated Excessively Moistened Soils (Analytical Review). *Eurasian Soil Science* 47, 153-16.
- Vuković, M. (1996). Influence of pH on the dissolution kinetics of iron in sulphuric acid solutions. *Hydrometallurgy* 43, 79-93.
- WISE (2019). Chronology of major tailings dam failures. 2 Out. 2019. Disponível em: <https://www.wise-uranium.org/mdaf.html>. Acesso em: 17 out. 2019.
- Wolin, E. A., Wolin, M. e Wolfe, R. S. (1963). Formation of methane by bacterial extracts. *Journal of Biological Chemistry*. 238, 2882-2886.

Yuen HW, Becker W. Iron Toxicity (2016). StatPearls Publishing.

Zerfass, H., Anjos-Zerfass, G. S. (2016). A sedimentação em uma abordagem sistêmica. Terra e Didática, 12, 148-171.

Zouboulis, A. I., Xiao-Li, Chai. e Katsoyiannis, I. A. (2004). The application of bioflocculant for the removal of humic acids from stabilized landfill leachates. Journal of Environmental Management 70, 35-41.