

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALESSANDRA GIORDANI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COMUNIDADES
MICROBIANAS SULFATO REDUTORAS PARA TRATAMENTO
DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA EM REATORES
SULFETOGENICOS EM ESCALA DE BANCADA**

Poços de Caldas/MG

2017

ALESSANDRA GIORDANI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COMUNIDADES
MICROBIANAS SULFATO REDUTORAS PARA TRATAMENTO
DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA EM REATORES
SULFETOGENICOS EM ESCALA DE BANCADA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pela Universidade Federal de Alfenas-*campus* Poços de Caldas. Área de Concentração: Tratamento de Águas Residuárias.

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha.

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno.

Poços de Caldas/MG

2017

G497a Giordani, Alessandra.

Avaliação do potencial de comunidades microbianas sulfato redutoras para tratamento de drenagem ácida de mina em reatores sulfetogênicos em escala de bancada / Alessandra Giordani. – Poços de Caldas, 2017.

107 f. –

Orientador: Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.
Bibliografia.

1. Engenharia sanitária. 2. Drenagem ácida de minas. 3. Águas residuais – Purificação – Tratamento biológico. 4. Biorremediação. 5. Bactérias anaeróbias. I. Brucha, Gunther. II. Título.

CDD: 628.16832

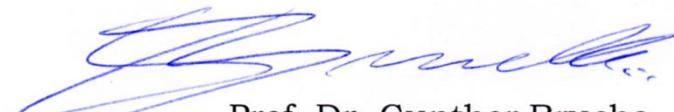
ALESSANDRA GIORDANI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COMUNIDADES
MICROBIANAS SULFATO REDUTORAS PARA TRATAMENTO
DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA EM REATORES
SULFETOGENICOS EM ESCALA DE BANCADA**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

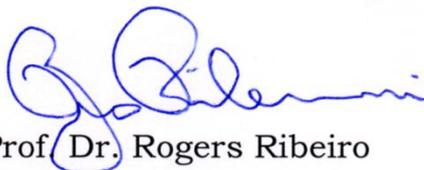
Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2017.



Prof. Dr. Gunther Brucha

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Prof. Dr. Rogers Ribeiro

Instituição: Universidade de São Paulo



Prof (a) Dr (a). Silvana de Queiroz Silva

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

*Dedico à minha maior saudade, meu avô, Paulo Giordani...
(In Memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado e por ser tão especial e presente em minha vida.

Aos meus pais, Marcinho e Cássia meu maior orgulho e exemplo. Obrigada por sempre acreditar em mim e por toda paciência e esforço. Tudo o que sou devo a vocês.

À minha avó Ana, por me ensinar o verdadeiro sentido de “mulher batalhadora”. À minha avó Tereza, por toda dedicação e paciência, você é única!

Ao meu amor, Gui, por me escutar discutindo assuntos do mestrado, mesmo não entendendo nada, por ter paciência com meus ataques nervosos e por sempre me apoiar! Essa conquista é nossa! Eu te amo muito!

Aos meus tios, tias e primos. Vocês são a melhor família do mundo! Em especial a minha querida prima/mãe Ana, por todo carinho, cuidado e atenção que sempre teve comigo. E claro, o meu tio e padrinho Edivino, por toda ajuda oferecida e dedicação aos seus sobrinhos...

Ao meu orientador, por estar presente mesmo estando longe, Gunther. Obrigada por todo ensinamento, paciência, comprometimento e por me mostrar a área maravilhosa que é a Microbiologia.

À professora Renata, por toda disponibilidade, dedicação e ajuda. Sempre me socorrendo nas horas que mais precisava. Você é um exemplo de professora!

À tão querida Elize, que me recebeu tão bem no laboratório de Microbiologia desde o primeiro dia e me ensinou tudo que pôde da melhor maneira e com toda paciência.

Ao meu coorientador Leonardo por todo ensinamento, ajuda e por aguentar minhas procuras constantes.

Aos professores do mestrado, Rafael, Rogers, Marcelo, Giselle, Marcos, por todo conhecimento partilhado e ajuda nesta caminhada. Giselle, obrigada por me acompanhar desde a graduação e sempre se preocupar comigo.

Aos meus colegas de laboratório, Josiel, Cláudio, Angélica, Marina, Luiz, Mauro, Bruna, Elaine, Letícia, Rafaela, obrigada por toda ajuda e compartilhamento de informações.

As melhores amigas que qualquer pessoa pode ter na vida, minhas irmãs de coração, Larissa, Erika, Carol, Marisa e Bela. Obrigada por sempre estarem presentes.

Aos amigos que morro de saudade, mas sei que mesmo de longe torcem por mim, obrigada por tudo, Anderson, Andrezza, Luara, Lucas e Matheus. Vocês fizeram falta todos esses dias na UNIFAL.

Aos melhores alunos do mundo e todos os companheiros na minha curta passagem na escola do Campestrinho, por me mostrarem o que eu realmente queria fazer da vida e como a carreira acadêmica é gratificante!

A todos os ótimos professores que eu tive na vida, que me ensinaram a amar o conhecimento e amar transmiti-lo também. Um carinho especial àqueles que me ensinaram a amar a área de exatas, Eunice, Sonia, Vespaziano, Luiz Fernando e Ricardo.

A secretária do PPGCEA Kênia, por toda a ajuda com minhas eternas dúvidas.

Aos técnicos do laboratório e as meninas da limpeza por estarem sempre dispostos a ajudar.

A FAPEMIG pelo financiamento do trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, deixo aqui meu Muito Obrigado.

A ti Javé, elevo a minha alma.

Em ti confio, meu Deus.

SALMO 25

RESUMO

A Drenagem Ácida de Minas (DAM) é um sério problema de contaminação ambiental presente nas indústrias de mineração devido ao baixo pH, alta concentração de sulfato e de metais dissolvidos encontrados nesta água residuária. O tratamento biológico da DAM tem sido empregado em substituição ao processo físico-químico tradicional devido à alta eficiência obtida nestes biorreatores, que realizam a redução dos íons sulfato em sulfeto, através das bactérias redutoras de sulfato (BRS), na presença matéria orgânica e condições anaeróbias. Uma alternativa para o tratamento biológico da DAM consiste na biorremediação utilizando BRS autóctones, que garante uma maior segurança ambiental, redução de custos e melhor adaptabilidade. Este trabalho estudou o potencial de BRS autóctones para remoção de sulfato em reatores tipo batelada anaeróbios comparando-se duas fontes de inóculo. Uma biomassa autóctone (AUT), derivada de cultura enriquecida de sedimento de DAM, e uma biomassa não autóctone (N-AUT), proveniente lodo pré-aclimatado de reator sulfetogênico estável e adaptado com lactato como fonte de carbono, foram testadas. A remoção de sulfato usando doadores de elétrons com custo efetivo (etanol e formiato) e a resistência à acidez da inóculo AUT também foi verificado. Os resultados mostraram uma remoção similar de sulfato de 57% para o reator AUT, e 62% para o reator N-AUT. O estudo filogenético do grupo das BRS usando o sequenciamento das bandas excisadas do gel de DGGE para o gene *dsrB* revelou a presença de espécies *Desulfotomaculum* na comunidade AUT, enquanto que *Desulfovibrio* foi o genus predominante encontrado na comunidade NON-AUT. Quando etanol foi utilizado como fonte de carbono, uma remoção de sulfato de 42% foi encontrada e 35% para o formiato, demonstrando que em condições de neutralidade, o etanol é fonte de carbono que apresenta maior viabilidade para o processo de enriquecimento. Foi observada remoção de sulfato em pH ácido para todas as fontes de carbono estudadas, indicando que estes microrganismos são resistentes a redução do pH. Entretanto, a eficiência de remoção foi reduzida para lactato (apenas 30% em pH próximo a 3) e etanol (apenas 18% em pH próximo a 5),

como doadores de elétron. Quando o formiato foi utilizado como fonte de carbono, a eficiência de remoção de sulfato foi mantida em aproximadamente 38% com a redução do pH para 3 e 4, e portanto, nestas condições, o formiato consiste na melhor fonte de carbono para realizar o enriquecimento das BRS. Conclui-se que a cultura AUT pode ser utilizada para o tratamento de DAM em substituição aos lodos provenientes de reatores sulfetogênicos.

Palavras-chave: Bactérias Redutoras de Sulfato. Remoção de sulfato. Autóctone. Biorremediação. Drenagem ácida de minas.

ABSTRACT

Acid Mine Drainage (AMD) is a serious environmental problem in mining industries because of the low pH, high levels of sulfate and dissolved metals present in this wastewater. Biological AMD treatment have been used instead of the traditional method, due to high efficiency obtained in these bioreactors, which promote the sulfate reduction into sulfide by sulfate reducing bacteria (SRB) in the presence of organic matter and anaerobic conditions. An alternative for the biological treatment of AMD consists on the bioremediation using autochthonous SRB that guarantees environmental safety, cost effective and better adaptability. This work studied the potential of autochthonous SRB to sulfate removal in batch anaerobic reactors comparing two inoculum sources. An autochthonous (AUT) biomass, derived from enrichment culture of AMD sediments and, a non-autochthonous (NON-AUT), from a pre-acclimated sludge from a stable sulfidogenic reactor adapted with lactate as carbon source, were tested. The sulfate reduction using cost effective electron donors (ethanol and formate) and the acidity resistance of AUT inoculum was also verified. Results showed a maximum sulfate removal of 57% for AUT and 62% for NON-AUT. Phylogenetic study of SRB group using sequencing of *dsrB* DGGE excised bands revealed the presence of *Desulfotomaculum*-related bacteria in AUT community, while *Desulfovibrio* was the predominant genus found in NON-AUT-derived community. When ethanol was used as carbon source, a sulfate reduction of 46% was found and 35% for formate, indicating that at neutral conditions, ethanol is the most viable alternative as carbon source for the enrichment process. At low pH, sulfate reduction still occurred, indicating that these microorganisms were resistant to acidic conditions. However the removal efficiency was reduced when lactate (only 30% on pH close to 3) and ethanol (only 18% on pH close to 5) were used as electron donors. When formate was the carbon source, the sulfate removal efficiency was maintained closely to 38% with pH reduction to 3 and 4, showing that at these conditions, formate is the best carbon source for SRB enrichment. Thus, AUT culture could be

used for local AMD decontamination in substitution of pre-acclimated sludge from sulfidogenic reactors.

Keywords: Sulfate Reducing Bacteria. Sulfate removal. Autochthonous. Bioremediation. Acid Mine Drainage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Etapa de degradação de matéria orgânica quando o sulfato está presente como receptor de elétrons	25
Figura 3.2	Curva de Crescimento típica de uma população bacteriana.....	32
Figura 4.1	Fluxograma explicativo das Fases experimentais deste trabalho.....	36
Figura 4.2	Fluxograma contendo os procedimentos experimentais durante a Fase 1 deste trabalho.....	37
Figura 4.3	Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados: a) Reator AUT 1 b) Reator N-AUT.....	39
Figura 4.4	Mina Osamu Utsumi (INB), Poços de Caldas, Brasil. Local de coleta do sedimento de mina de urânio contendo DAM utilizado no enriquecimento das BRS.....	39
Figura 4.5	Representação esquemática do reator diferencial utilizado: A) reator, B) tampa, C) O-ring, D) material suporte.....	41
Figura 4.6	Representação esquemática do Experimento: 1) Reator AUT 2, 2) Bomba peristáltica Gilson, 3) Reatores Diferenciais.....	42
Figura 4.7	Foto dos reatores diferenciais, em operação, instalados na estufa para controlar a temperatura.....	42
Figura 4.8	Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando a fonte de carbono: a) Reator LAC b) Reator ETA c) Reator FOR.....	45
Figura 4.9	Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando o pH para fonte de carbono etanol: Reator ETA 3 (a); ETA 4 (b); ETA 6 (c).....	46
Figura 4.10	Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando o pH para fonte de carbono lactato: Reator LAC 3 (a); LAC 4 (b).....	46
Figura 4.11	Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando o pH para fonte de carbono formiato: Reator FOR 3 (a); FOR 4 (b); FOR 5 (c); FOR 6 (d).....	46
Figura 5.1	Desempenho dos Reatores AUT (♦) e N-AUT (□) durante o experimento: (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.....	56

Figura 5.2	Imagem negativa da eletroforese dos produtos da extração de DNA com o kit da PROMEGA® em gel de agarose 1,5%.....	57
Figura 5.3	Imagem negativa da eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5%. a) Domínio Bacteria: gene bacteriano rRNA 16 S. b) Grupo das Sulfatorredutoras: gene dsrB.....	
Figura 5.4	Perfil de DGGE para o gene bacteriano rRNA 16S.....	58
Figura 5.5	Dendograma de similaridade obtido através do programa BioNumerics, Versão 7.6 Applied Maths, Bélgica, usando o gel de DGGE para o Domínio Bacteria analisado por meio do coeficiente de DICE e o método UPGMA.....	
Figura 5.6	Perfil de DGGE para o gene dsrB. Os números presentes no gel da imagem (b) representam as bandas sequenciadas.....	59
Figura 5.7	Dendograma de similaridade obtido através do programa BioNumerics, Versão 7.6 Applied Maths, Bélgica, usando o gel de DGGE para o grupo das Sulfatorredutoras. O perfil de DGGE foi analisado utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA.....	60
Figura 5.8	Árvore filogenética construída por comparação das bandas sequenciadas obtidas pelo perfil de DGGE do gene dsrB contendo as sequências mais próximas retiradas do banco de dados do Genbank. A árvore foi construída através do método Neighbor-joining usando o programa MEGA 5.0. O valor Bootstrap está indicado nas ramificações. A barra de escala representa 2 substituições de nucleotídeos por 100 nucleotídeos.....	63
Figura 5.9	Desempenho do AUT 2 durante o experimento: (a) Remoção de Sulfato, (b) Consumo de DQO, (c) Produção de Sulfeto. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.....	66
Figura 5.10	Teste de adesão da biomassa AUT em espuma de poliuretano em Sólidos Voláteis Totais (mg) por massa de material suporte (g). As barras de erro representam a propagação dos erros experimentais.....	68
Figura 5.11	Desempenho dos Reatores ETA (◆), LAC (□) e FOR (▲): (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.....	72
Figura 5.12	Coloração adquirida pelo reator FOR após 10 dias de enriquecimento. Esta coloração rosa adquirida pelo meio indica que o mesmo não encontra-se mais reduzido e é constatada pelo indicador rezasurina.....	75

Figura 5.13	Fotos dos frascos de antibiótico utilizados para o experimento NMP após 30 dias de crescimento e respectivas combinações de tubos positivos e negativos (a) Inóculo, (b) LAC, (c) ETA (d) FOR.....	78
Figura 5.14	Desempenho dos Reatores FOR 6 (□), FOR 4 (◆) e FOR 3 (▲): (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto, (d) pH. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.....	90
Figura 5.15	Desempenho dos Reatores ETA 6 (◆), ETA 4(□), e ETA 3 (▲): (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto, (d) pH. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.....	91
Figura 5.16	Desempenho dos Reatores LAC 4 (□) e LAC 3 (▲): (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto, (d) pH. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.....	92
Figura 5.17	Imagem negativa da eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% para o Domínio Bacteria: gene bacteriano rRNA 16 S e para o grupo das Sulfatorredutoras: gene dsrB. 1- ETA 7; 2- ETA 6; 3-ETA 4; 4-ETA3; 5.FOR7; 6-FOR6; 7-FOR4; 8-FOR3;9-LAC4;10-LAC3.....	93
Figura 5.18	Perfil de DGGE para o gene rRNA 16S na fase 2.....	95
Figura 5.19	Dendograma de similaridade obtido através do programa, PyElph 1.4, usando o gel de DGGE para o Domínio Bacteria. O perfil de DGGE foi analisado utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA.....	95
Figura 5.20	Perfil de DGGE para o gene dsrB na fase 2.....	96
Figura 5.21	Dendograma de similaridade obtido através do programa, PyElph 1.4, usando o gel de DGGE para o grupo das sulfatorredutoras. O perfil de DGGE foi analisado utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Varição da energia livre de Gibbs durante a redução de sulfato para diferentes matérias orgânicas.....	23
Tabela 4.1	Análises Físico-químicas e de biologia molecular realizadas nas Etapa 1, 2 e 3 deste trabalho.....	36
Tabela 4.2	Composição do meio de cultura utilizado no enriquecimento.....	37
Tabela 4.3	Características físico-químicas do meio de cultura contendo inóculo AUT adicionado aos reatores batelada nas fases 2 e 3 deste trabalho.....	42
Tabela 4.4	Quantidade adicionada de cada fonte de carbono em substituição ao lactato e denominação do reator anaeróbio na Fase 2 do experimento.....	44
Tabela 4.5	Alteração do pH do meio Postgate C para cada fonte de carbono utilizada e denominação do respectivo reator.....	45
Tabela 4.6	Denominação das amostras coletadas para reatores AUT e N-AUT.....	48
Tabela 4.7	Sequência do grampo GC acoplada as extremidades 5' dos primers 968f e DSRp2060f.....	49
Tabela 4.8	Concentração final dos reagentes para execução do PCR para Domínio Bacteria.....	49
Tabela 4.9	Concentração final dos reagentes para execução do PCR para Grupo das Sulfatorredutoras.....	50
Tabela 5.1	Parâmetros obtidos através de análises físico-químicas durante o enriquecimento.....	53
Tabela 5.2	Afiliações filogenéticas para bandas sequenciadas obtidas do perfil de DGGE para o gene dsrB.....	64
Tabela 5.3	Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas durante o enriquecimento para o reator AUT 2.....	65
Tabela 5.4	Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas durante o enriquecimento para os reatores LAC, ETA e FOR.....	70
Tabela 5.5	Combinações selecionadas e valores de NMP correspondentes para cada reator estudado no ensaio para diferentes fontes de carbono.....	76
Tabela 5.6	Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas para a fonte de carbono formiato durante o enriquecimento em pH ácido.....	78
Tabela 5.7	Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas para a fonte de carbono etanol durante o enriquecimento em pH ácido.....	80
Tabela 5.8	Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas para a fonte de carbono lactato durante o enriquecimento em pH ácido.....	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS.....	21
3.2	BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS).....	23
3.3	BIORREMEDIAÇÃO DA DAM.....	26
3.4	ENRIQUECIMENTO DE BRS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	FASE 1: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONES PARA TRATAMENTO DA DAM	36
4.1.1	Enriquecimento das Bactérias Redutoras de Sulfato	37
4.1.2	Análises Físico-Químicas	39
4.1.3	Ensaio de Adesão da Biomassa em Espuma de Poliuretano	39
4.1.3.1	Reatores Diferenciais.....	40
4.1.3.2	Inóculo.....	41
4.1.3.3	Material Suporte.....	41
4.1.3.4	Protocolo Experimental.....	41
4.2	ENRIQUECIMENTO DA BIOMASSA AUT EM POSTGATE C MODIFICADO.....	42
4.2.1	Fase 2: Enriquecimento de BRS em diferentes fontes de carbono	44
4.2.2	Fase 3: Enriquecimento de BRS em pH ácido	44
4.3	AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	47
4.3.1	Coleta de Amostras	47
4.3.2	Procedimento Experimental	48
5	RESULTADO E DISCUSSÕES	51
5.1	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, COMUNIDADE MICROBIANA E IMOBILIZAÇÃO DO REATOR AUT.....	51
5.1.1	Desempenho dos Reatores AUT 1 e N-AUT	51
5.1.2	Comunidade Microbiana dos Reatores AUT 1 e N-AUT	55
5.1.3	Ensaio de imobilização da biomassa AUT em Reatores Diferenciais	64
5.1.3.1	Desempenho do Reator AUT-2.....	64
5.1.3.2	Avaliação da adesão da biomassa em espuma de poliuretano.....	66
5.2	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA BIOMASSA AUT EM MEIO POSTGATE C MODIFICADO.....	67
5.2.1	Desempenho dos reatores alterando a fonte de carbono ...	68
5.2.1.1	Quantificação das BRS por NMP.....	75
5.2.2	Desempenho dos reatores alterando o pH	77

5.2.3	Estudo da Comunidade Microbiana nos enriquecimentos em Postgate C modificado.....	92
6	CONCLUSÃO.....	96
7	SUGESTÕES.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração e metalurgia ao explorarem minerais de sulfeto, geralmente acarretam a oxidação química e/ou biológica do ferro e enxofre, provocando a formação de águas residuárias ácidas contendo metais e sulfato, denominadas drenagem ácida de minas (DAM) (KAKSONEN et al., 2006).

Estas caracterizam-se como um dos maiores problemas de contaminação ambiental, causando impactos prejudiciais de longa duração nos cursos d'água e para a biodiversidade. Além disso, a presença de substâncias tóxicas em largas quantidades, como metais pesados, pode resultar em sérios impactos ao ambiente e também para saúde dos seres humanos.

Pode-se controlar a DAM, impedindo sua formação e migração, ou por meio do tratamento destas por técnicas físico-químicas ou biológicas. O método químico tradicional apresenta diversas desvantagens, tais como, alto custo com reagentes químicos, remoção de sulfato ineficiente e alta geração de lodo (KAKSONEN et al., 2006). Em contrapartida, biorreatores redutores de sulfato apresentam elevada eficiência e custo efetivo, tendo se mostrado assim, uma importante alternativa em substituição ao processo convencional. Na presença de compostos orgânicos, que devem ser suplementados na DAM para que haja fonte de carbono e energia disponível para os microrganismos, e condições anaeróbios, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) produzem sulfeto de hidrogênio e bicarbonato, viabilizando a precipitação de sulfetos de metais e o aumento do pH do meio (SAHINKAYA et al., 2011).

Como as BRS podem existir em diversas localidades, sendo consideradas onipresentes na natureza (PLUGGE et al., 2011), tais como solos, sedimentos, águas residuárias de indústrias e mineração, a utilização de BRS autóctones para biorremediação da DAM torna-se uma alternativa possível. Utilizar microrganismos autóctones é geralmente mais recomendado devido a questões de segurança ambiental, uma vez que será

utilizada a população microbiana nativa, redução de custos e melhor adaptabilidade (AZUBUIKE et al., 2016; HOSOKAWA et al., 2009).

A importância do processo de biorremediação da DAM reside também no aspecto ambiental, visto que segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n° 357, de 17 de março de 2005, o padrão de lançamento de sulfato em corpos receptores deve ser inferior a 250 mg/L, limite individual de emissão de sulfato e que atende aos padrões de qualidade da água, de forma a não causar efeitos letais, alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia de vida (CONAMA, 2005).

Diversos estudos retratam a utilização de biomassa previamente adaptada não autóctone para tratamento de águas residuárias ácidas contendo sulfato (ALTUN et al., 2014; SINGH et al., 2008; ZHANG;WANG, 2016), demonstrando que estes microrganismos são adequados para esta finalidade. Em contrapartida, poucos estudos relatam o uso de microrganismos autóctones para tratamento de DAM em biorreatores e comparam a viabilidade de utilização destes em substituição à inóculo já estabilizado em reatores anaeróbios (LUPTAKOVA;KUSNIEROVA, 2005).

A biorremediação utilizando microrganismos autóctones tem despertado grande interesse devido aos resultados promissores encontrados durante o emprego destes para tratamento de águas ácidas e remoção de metais (LU et al., 2011; MARTINS et al., 2009) Neste ínterim, este projeto destaca-se ao avaliar a utilização de microrganismos provenientes do próprio local que deseja-se descontaminar, obtendo-se um consórcio microbiano simples, com custo efetivo e que pode trazer diversos avanços para o tratamento da DAM.

Neste projeto foi avaliado o potencial de comunidades microbianas redutoras de sulfato autóctones submetidas ao processo de bioaugmentação para tratando de DAM, comparando-se a eficiência de remoção de sulfato ao utilizar-se dois tipos de inóculo: biomassa autóctone (AUT), proveniente de sedimento de mina de urânio contendo DAM, e, biomassa não autóctone (N-AUT), originada de reator sulfetogênico contendo lodo já estabilizado. Após isto, buscou-se avaliar o efeito na eficiência de remoção de sulfato da alteração da fonte de carbono do meio de cultura para etanol e formiato,

doadores de elétron com menor custo que o lactato (BERTOLINO et al., 2014; HEXIS, 2017; ORBITAL, 2017) e também, a resistência da biomassa AUT à condições de acidez, através da redução do pH do meio de enriquecimento.

2 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste projeto de pesquisa é avaliar o potencial de comunidades microbianas sulfato redutoras autóctones provenientes de sedimento de mina ácida enriquecidas em meio Postgate C para tratamento de DAM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) Comparar o desempenho para remoção de sulfato e diversidade microbiana de comunidades de BRS autóctone e não autóctone utilizando Postgate C como meio de cultura;
- b) Avaliar o processo de imobilização da biomassa autóctone enriquecida em espuma de poliuretano empregando reatores diferenciais;
- c) Estudar o efeito da alteração da fonte de carbono do meio de cultura para etanol e formiato na remoção de sulfato e na comunidade de BRS;
- d) Estudar a comunidade microbiana e a resistência de microrganismos autóctones a condições ácidas alterando o pH do meio de cultura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

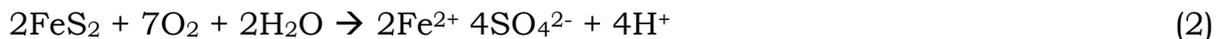
3.1 DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS (DAM)

A Drenagem Ácida de Minas (DAM) contendo metais é formada pela interação do ar e da água com sulfetos, como por exemplo a pirita (FeS_2), podendo ser formada no interior da cava da mina ou em sistemas de deposição estéril ou rejeito (BEKMEZCI et al., 2011). Estas águas residuárias apresentam baixo pH, alta condutividade específica, altas de concentrações de metais, como ferro, alumínio e manganês e, outros compostos tóxicos (AKCIL;KOLDAS, 2006).

A produção da DAM pode ser representada pela oxidação da pirita, na presença de ar e água (Equação 1):



Como a pirita (FeS_2) representa um dos sulfetos de metais mais comuns, pode-se examinar as reações de geração da DAM por meio de sua oxidação (AKCIL;KOLDAS, 2006). A primeira reação consiste na oxidação deste mineral de sulfeto em ferro dissolvido, sulfato e hidrogênio, como demonstrado na Equação 2:



Os íons Fe^{2+} , SO_4^{2-} e H^+ representam um aumento no total de sólidos dissolvidos e na acidez da água, podendo induzir a redução do pH.

Se o potencial oxidante do ambiente for suficiente, a maior parte do íon ferroso será oxidado a íon férrico (Equação 3):



Para valores de pH menores que 2,3 e 3,5 o íon férrico, precipita como hidróxido de ferro e jarosita (Equação 4), reduzindo ainda mais o pH da água:



Outros sulfetos de minerais são oxidados de forma similar a pirita, lançando também metais e ácido sulfúrico. Como o ácido sulfúrico aumenta a solubilidade de metais presentes no solo e em rochas, normalmente observa-se a presença de metais em altas concentrações na DAM, como Cu, Zn, Al, Pb, As, Cd, com concentração de 10-100mg/L, e Fe, que pode estar presente em concentrações maiores (BEKMEZCI et al., 2011).

Os fatores primários que determinam a velocidade de geração da DAM são: pH, temperatura, presença de oxigênio, presença de água, atividade química do Fe^{3+} , área superficial dos sulfetos metálicos expostos, energia de ativação requerida para iniciar a geração de acidez e a atividade bacteriana (AKCIL;KOLDAS, 2006).

Os microrganismos responsáveis pela dissolução de sulfetos metálicos consistem nas naqueles acidofílicos extremos, que apresentam pH ótimo baixo de 3,0. Apesar da acidez, altas concentrações de sulfato e metais tóxicos, uma população microbiana diversa é encontrada nos locais contendo DAM (BAKER;BANFIELD, 2003; RODRIGUEZ, 2010).

Variações na temperatura, força iônica e pH produzem comunidades caracterizadas pela presença de diferentes espécies. Entretanto, estas comunidades são caracterizadas por apresentar números limitados de espécies. Devido a esta simplicidade biológica e geoquímica, estes ambientes apresentam grande potencial como sistemas modelos para análise das interações e processos biogeoquímicos, bem como da função e estrutura das comunidades microbianas presentes na DAM (BAKER;BANFIELD, 2003).

A formação da DAM é altamente variável dependendo do local onde é originada. Temos como exemplo a mina Osamu Utsumi localizada em Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil, na qual a extração de urânio foi realizada entre 1974 e 1997. As características físico químicas da DAM produzida em

uma pilha de rejeitos desta mina foram pH 3,5, concentração de matéria orgânica de 0,5mg/L, concentração de SO_4^{2-} de 1550 mg/L, concentração de Mn de 137,6 mg/L e concentração de Zn de 22,6 mg/L (RODRIGUEZ, 2010).

A DAM é naturalmente ácida e geralmente apresenta uma baixa concentração de carbono orgânico. Devido a isto, sistemas de biorremediação da DAM baseados na redução biológica do sulfato, necessitam de suplementação em quantidade suficiente de matéria orgânica para que haja fonte de carbono e energia para os microrganismos (LU et al., 2011).

Cabe ressaltar que caso a DAM não seja controlada ou tratada, pode fluir para rios e lagos, contaminando solos e destruindo plantas e a animais. Além disso, a formação de efluentes ácidos pode continuar por dezenas e até centenas de anos após o fechamento da mina se as condições permanecerem favoráveis (SAHINKAYA et al., 2011).

3.2 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

As bactérias dissimilativas redutoras de sulfato (BRS) utilizam o sulfato (SO_4^{2-}) como acceptor de elétrons, em condições anóxicas, e compostos orgânicos ou H_2 como doadores de elétrons, tendo como produto da reação o sulfeto de hidrogênio (H_2S). As BRS são em sua maioria, anaeróbias obrigatórias, o que acarreta a necessidade de utilização de técnicas anóxicas estritas para seu cultivo (PARKER et al., 2010).

Estas utilizam uma variedade muito ampla de doadores de elétrons, podendo degradar até mesmo hidrocarbonetos aromáticos, como tolueno e etilbenzeno, benzoato e fenol (MUYZER;STAMS, 2008). Entretanto, as fontes de carbono preferenciais das BRS consistem em ácidos orgânicos (tais como, lactato, piruvato e formiato), ácidos voláteis (por exemplo, acetato), e, álcoois (etanol, propanol, butanol e metanol) (HAO et al., 1996).

Pode-se classificar as BRS em dois grupos principais: BRS de oxidação incompleta, as quais degradam a matéria orgânica de maneira incompleta a acetato, e, BRS de oxidação completa, que degradam a matéria orgânica completamente a gás carbônico. BRS que degradam a matéria orgânica

completamente a dióxido de carbono, geralmente utilizam também acetato como um substrato para seu crescimento (MUYZER;STAMS, 2008).

A Figura 3.1 demonstra as rotas metabólicas de degradação microbiana de matéria orgânica complexa em ambientes anóxicos na presença de sulfato. Cabe salientar que primeiramente, as macromoléculas são hidrolisadas por bactérias hidrolíticas. Subsequentemente, os monômeros são fermentados pelas bactérias fermentativas e os produtos resultantes desta fermentação, na presença de sulfato, são utilizados como substratos pelas BRS.

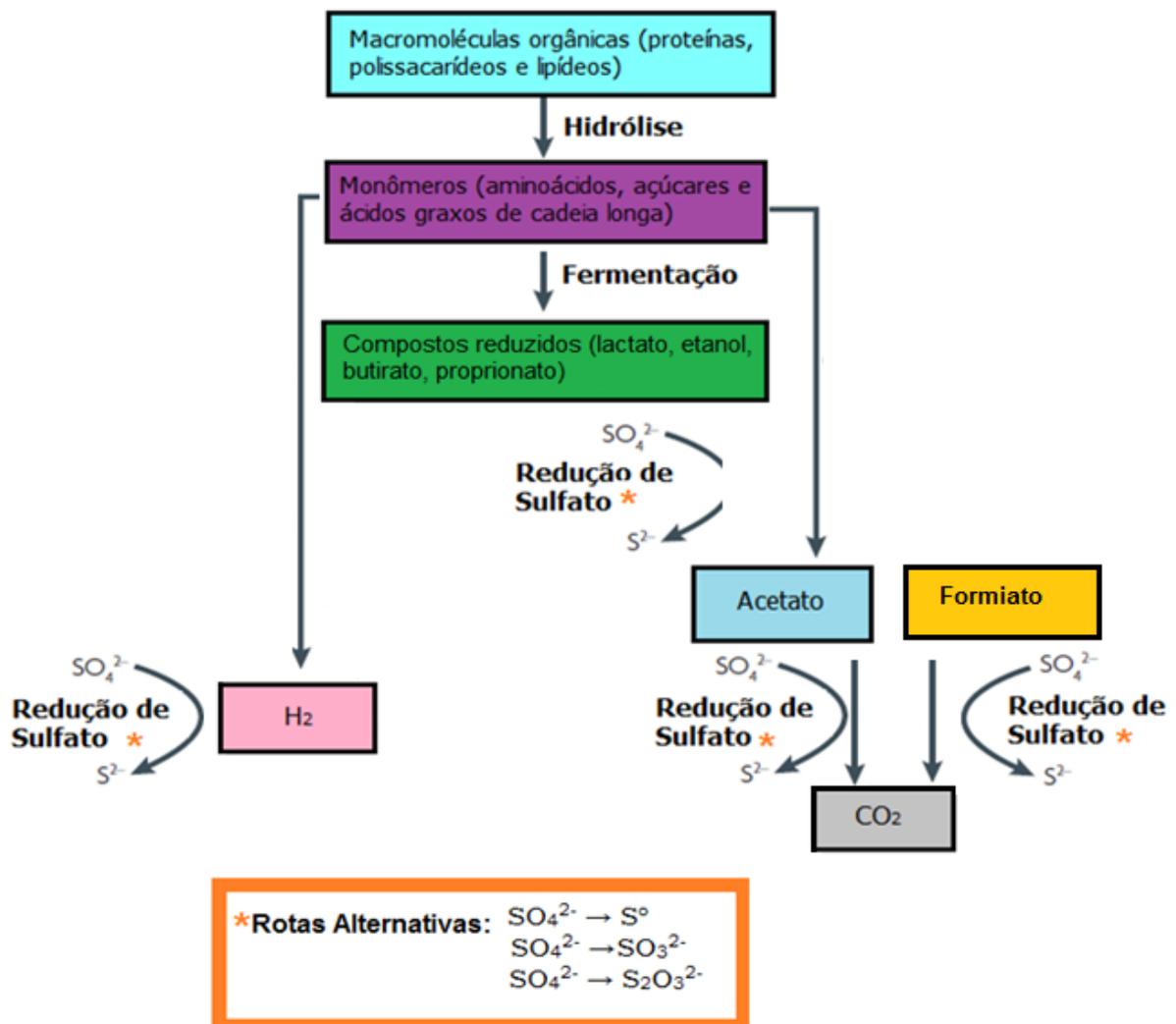
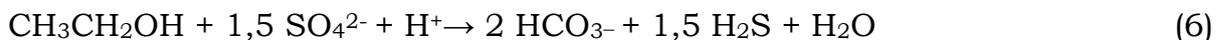
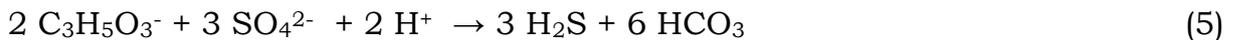


Figura 3.1 - Etapa de degradação de matéria orgânica quando o sulfato está presente como receptor de elétrons.

Fonte: Muyzer e Stam (2008), adaptado pela autora.

Além da capacidade de utilizar diversos aceptores e doadores de elétrons, as BRS podem crescer em uma grande variedade de condições ambientais, sendo consideradas ubíquas. Desta forma, estas podem ser encontradas tanto ambientes naturais quanto modificados que contenham sulfato. O isolamento e detecção de BRS foi possível em sedimentos marinhos, campos de petróleo, aquíferos, sistemas projetos, como estações anaeróbias de tratamento de água e locais com valores de pH extremos, como a DAM (MUYZER;STAMS, 2008).

Durante a metabolização da matéria orgânica, por exemplo, lactato (Equação 5), etanol (Equação 6) ou formiato (Equação 7), as BRS apresentam a capacidade de reduzir o sulfato (SO_4^{2-}) a sulfeto de hidrogênio (H_2S), produzindo também, bicarbonato (HCO_3^-). Desta forma, o bicarbonato gerado pela oxidação dos doadores de elétrons durante a sulfetogênese permite a elevação do pH de ácido para neutro ou alcalino (SAHINKAYA et al., 2011), enquanto que o sulfeto produzido possibilita a remoção de metais por meio da formação de precipitados estáveis com estes (BEKMEZCI, 2011), como consta na Equação 8.



Com isto, nota-se a viabilidade da utilização de BRS para biorremediação da DAM, ao permitir a remoção de sulfato e metais e a elevação do pH destas águas residuárias.

A escolha do doador de elétrons é essencial para o tratamento biológico da DAM contendo sulfato empregando as BRS. A fonte de carbono influencia substancialmente a taxa de remoção de sulfato. Sendo assim, diferentes fontes de carbono podem resultar em diferentes velocidades de produção de biomassa bacteriana (CAO et al., 2012).

Kwon et al. (2015) estudaram o impacto dos doadores de elétrons no desenvolvimento da comunidade microbiana em condições de redução de sulfato e presença de ferro, e inoculados com sedimento subsuperficial. A redução de sulfato e ferridrita ($\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ocorreu simultaneamente e foi mais rápida para o lactato do que o acetato. Quando a glicose foi utilizada como doadora de elétrons, uma maior redução de ferridrita foi observada, porém não houve redução de sulfato. Conclui-se também que a utilização de diferentes fontes de carbono promoveu mudanças significativas na comunidade microbiana.

3.3 BIORREMEDIAÇÃO DA DAM

Quantidade significativa de águas residuárias ácidas não são tratadas, pois a maior parcela das tecnologias de tratamento da DAM são inadequadas, ineficientes e apresentam custo elevado. Neste contexto, uma proposta em substituição ao método químico tradicional consiste no tratamento biológico da DAM empregando BRS. O tratamento biológico apresenta diversas vantagens, tais como, elevada eficiência na remoção de sulfato e metais, baixa produção de lodo, viabilidade econômica e segurança ambiental (BERTOLINO et al., 2012; KAKSONEN;PUHAKKA, 2007).

Zhang e Wang (2016) estudaram a biorremediação da DAM por meio de grânulos imobilizados de BRS provenientes de estação de tratamento águas residuárias em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente, utilizando lactato como fonte de carbono. O reator apresentou um desempenho satisfatório para pH afluente de 2,8 e altas concentrações de metais, incluindo Fe, Mn, Cu, Cd e Zn. O pH efluente esteve em torno de 7,8 e 8,3 enquanto que a eficiência de remoção dos metais foi superior a 99,9%, com exceção do Mn, que variou de 42,1% a 99,3%.

Uma alternativa para a biorremediação da DAM consiste em selecionar microrganismos do próprio local que deseja-se descontaminar (autóctones), de forma a favorecer a manutenção da microbiota natural, garantir uma melhor adaptabilidade e reduzir custos (AZUBUIKE et al., 2016; HOSOKAWA

et al., 2009). Microrganismos autóctones presentes em ambientes poluídos representam uma alternativa importante para resolver um dos maiores desafios da biodegradação e biorremediação de poluentes, visto que estas condições ambientais são favoráveis para seu crescimento e metabolismo (AZUBUIKE et al., 2016).

As BRS apresentam um papel importante em tecnologias anaeróbias de biorremediação para tratamento de águas, solos e subsuperfícies contaminadas visto que são mediadoras diretas e indiretas da redução de metais pesados e metaloides, contribuindo também para a biodegradação de poluentes orgânicos (GEETS et al., 2006). Vale citar também o potencial destas comunidades microbianas para biorremediação de radionuclídeos (LI et al., 2015).

A biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados e radionuclídeos por meio da utilização de cepas bacterianas autóctones capazes de reduzir metais, tem despertado grande interesse como alternativa para descontaminação destas áreas. Estudos recentes relatam o potencial de bactérias Gram-Positivas autóctones (*Desulfotomaculum reducens* MI-1), isoladas de um local contaminado com metais pesados, em remover estes metais, incluindo urânio, cromo, manganês e ferro (LI et al., 2015; OTWELL et al., 2015; TEBO; OBRAZTSOVA, 1998).

Tebo e Obraztsova (1998) primeiramente enriqueceram o sedimento de local contendo altas concentrações de Cr(VI) e outros metais utilizando o meio Brackish, contendo sulfato como acceptor de elétrons (WIDDEL AND BAK, 1992). Após a obtenção de uma cultura *Desulfotomaculum reducens* MI-1 enriquecida e pura, substituiu-se o sulfato por metais como aceptores de elétrons alternativos nas concentrações: 10 mM Fe(III), 200 µM Mn(IV), 500 µM U(VI) ou 60 µM Cr(VI). Quando o butirato, lactato e outras fontes de carbono foram utilizados como doadores de elétrons, observou-se crescimento para os metais Mn (IV), Fe (III), U(VI) e Cr(VI), na ausência de sulfato. Não foi observado crescimento quando aceptores de elétrons não foram adicionados.

Otwell et al. (2015) e Li et al. (2015) preocuparam-se em explicar o mecanismo pelo qual as culturas *Desulfotomaculum reducens* MI-1 realizam

a redução destes metais ao invés de sulfato. No estudo feito por Otwell et al. (2015), identificou-se uma proteína denominada Dred_2421 capaz de reduzir Cr(VI) e U(VI) solúveis utilizando NADH como doador de elétrons. Em trabalho subsequente, Li et al. (2015) demonstrou que a transferência de elétrons do NADH para os metais é feita principalmente pelo domínio CTD (Domínio terminal C de ligação à FAD). Além deste domínio, há a presença também do domínio NTD (Domínio terminal N de ligação à FMN) e um cluster 4Fe-4S entre os dois domínios, que não estão diretamente envolvidos nesta atividade.

Bilek e Wagner (2012) testaram a remoção de sulfato em biorreator em escala de bancada para tratamento de DAM natural durante 3 anos adotando condições *in situ* para águas subterrâneas (10° C e BRS autóctones), partículas de argila como material suporte e H₂ como doador de elétrons sem substituição do inóculo. Após 1,3 anos de operação, obteve-se uma quantidade de biomassa constante (7,6 mg de biomassa/g de suporte) e a estabilização da taxa de remoção de sulfato de 0,25.0,5 mmol SO₄²⁻(L.h)⁻¹. Uma utilização de H₂ de 98% foi observada para a redução do sulfato.

Cole et al. (2011) demonstraram que águas residuárias provenientes de minas ácidas contendo altas concentrações de Arsênio (As) podem ser tratados através de consórcios de BRS autóctones. DAM de uma mina localizada na França, denominada Carnoulès, foi incubada em condições anóxicas com consórcio de BRS contendo sedimento desta mina previamente enriquecido. As concentrações de As, Zn, pH e atividade microbiana foram monitoradas durante 94 dias, resultando em uma remoção de As e Zn de 1,06 e 0,23mmol/L, respectivamente. O pH foi elevado de 4,0 como valor inicial para 5,0 e, a existência de atividade bacteriana foi comprovada através da avaliação crescimento microbiano por contagem de células, que atingiu valores de aproximadamente 10x10⁷ células bacterianas.

A eficiência da estratégia de biorremediação depende da atividade das BRS, a qual é afetada por condições ambientais, parâmetros operacionais e composição da comunidade microbiana local. Devido a isto, torna-se importante complementar as análises físico-químicas com análises de biologia molecular que permitam monitorar as mudanças espaciais e

temporais na composição e funcionamento das comunidades de BRS (GEETS et al., 2006).

Dentre as ferramentas citadas por Geets et al. (2006) têm-se, PCR (Reação em Cadeia Polimerase) com primers específicos para o grupo das BRS, DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), sequenciamento de bandas amplificadas por PCR, entre outras.

De maneira geral, estas técnicas empregam amplificação do gene rRNA 16S, devido sua distribuição universal e conservação estrutural e funcional. Zhou et al. (2015) determinou a diversidade e estrutura de comunidades bacterianas em biorreatores redutores de sulfato por meio da amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S. A identificação de microrganismos raros (*Halanaerobium*, *Halothiobacillus*, *Desulfonatronum*, *Syntrophobacter*, *Fusibacter*), que apresentam papel importante nestes reatores e normalmente não são identificados por técnicas convencionais de biologia molecular foi possível devido à utilização da técnica de sequenciamento MiSeq.

Entretanto, a utilização de genes que codificam enzimas de relevância fisiológica ou metabólica para as BRS pode complementar o estudo da atividade das BRS no processo de biorremediação, contribuindo para obtenção de melhores resultados. Pode-se citar como melhor marcador para este estudo, o gene *dsr*, responsável pela codificação da enzima sulfito redutase dissimilatória, que catalisa a redução de sulfito a sulfeto, sendo exigida por todos os microrganismos redutores de sulfato (GEETS et al., 2006).

Este gene pode apresentar duas subunidades α (*dsrA*) e β (*dsrB*), que são originadas de um ancestral comum, provavelmente decorrente da duplicação de um gene *dsr* existente antes da separação dos domínios Archae e Bacteria (OLIVEIRA et al., 2011). A presença de regiões conservadas nestes genes permitem seu emprego em larga escala para caracterização das comunidades de BRS (Muyzer; Stams, 2008), e por isto o gene *dsrB* foi selecionado para ser utilizado como marcador neste experimento.

Nguyen et al. (2016) estudou a estrutura de um consórcio autóctone de BRS para remoção de chumbo em reatores de leito móvel com biofilme e fluxo contínuo durante 40 dias utilizando a técnica de DGGE e amplificação do gene *dsrB*. Os resultados demonstraram que as espécies *Desulfomicrobium escambiense* e *Desulfovibrio carbinolicus* estavam presentes como espécies dominantes nos reatores e apresentaram um papel importante na remoção do chumbo. Enquanto um aumento significativo em seu número de células nos reatores durante a operação foi observado, o efeito tóxico do chumbo promoveu o desaparecimento de outras espécies de BRS no consórcio, como *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfomicrobium salsugmis*, e *Desulfovibrio vulgaris*.

Wang et al. (2016) estudou a distribuição e diversidade de BRS em solo irrigado com DAM por meio da amplificação do gene *rRNA 16S* e quantificação do gene *dsrB* em ensaios de PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que há aumento da abundância de BRS com esta irrigação, e a composição e diversidade bacteriana do solo também é alterada. Constatou-se também que a abundância de linhagens bacterianas esteve mais relacionada com o pH, matéria orgânica e sulfato presentes no meio, do que com a presença de metais. A espécie de BRS dominante na superfície do solo foi a *Desulfobacca*, pertencendo ao grupo Deltaproteobacteria.

3.4 ENRIQUECIMENTO DE BRS

Os métodos de enriquecimento contínuos e em batelada são empregados para possibilitar o crescimento de culturas microbianas especializadas que sejam provenientes de locais contaminados (autóctones). Através do controle das condições de cultura e nutrientes é possível favorecer o crescimento de grupos específicos, como por exemplo, as BRS.

Para que o enriquecimento seja eficaz, deve-se utilizar soluções nutrientes, que permitam o crescimento de microrganismos em laboratório, denominadas meio de cultura. Este crescimento pode ser feito em recipientes fechados, denominados cultura em batelada, na qual três fases distintas de

crescimento podem ser observadas: fase lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte ou declínio (PARKER et al., 2010), como descrito na Figura 3.2:

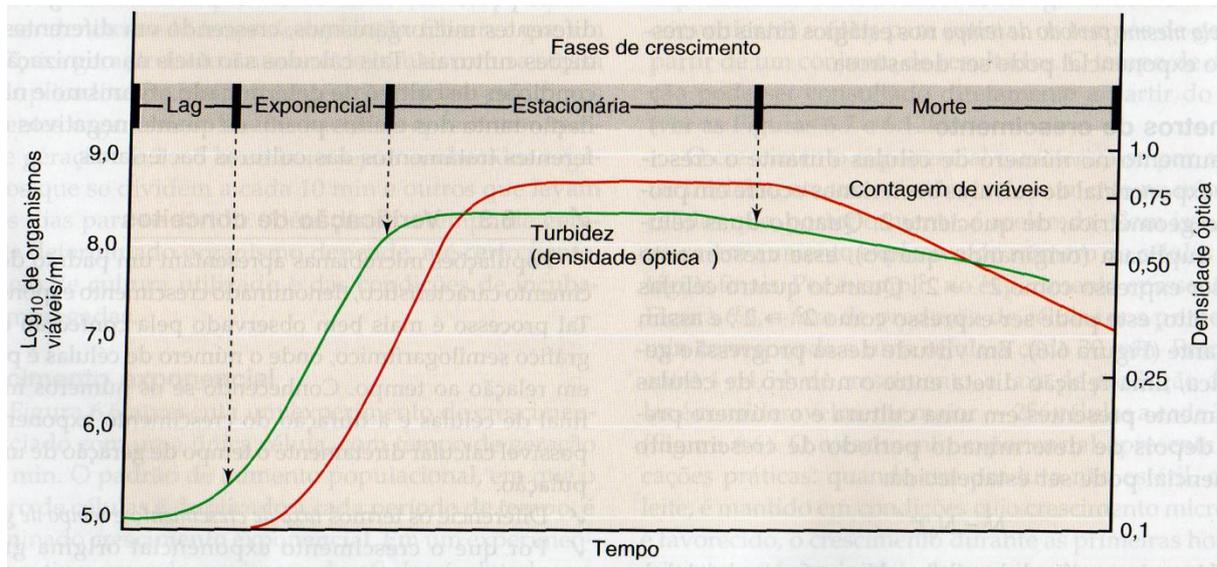


Figura 3.2 - Curva de Crescimento típica de uma população bacteriana.

Fonte: (PARKER et al., 2010).

A fase lag corresponde à fase de adaptação dos microrganismos ao novo meio de cultura, podendo ter curta ou longa duração, dependendo do histórico de cultura e das condições de cultivo. Após esta fase, inicia-se a fase exponencial, na qual observa-se o aumento da população em crescimento exponencial. Entretanto, este crescimento não ocorre indefinidamente, iniciando-se assim a fase estacionária, na qual não observa-se alterações líquidas no número de células. Se as mesmas condições de incubação forem mantidas, as células podem morrer e iniciar-se a fase de morte (PARKER et al., 2010).

Para que o enriquecimento de BRS seja possível meios seletivos para o cultivo e crescimento deste grupo de microrganismos devem ser utilizados, como proposto por Postgate em 1979. Dentre os meios relatados para esta finalidade, pode-se citar o Meio B, indicado para diagnóstico e manutenção de culturas, e Meio C, utilizado para cultivo de microrganismos. A principal diferença entre o Meio B e C consiste em sua composição (ILHAN-SUNGUR et al., 2007; JAIN, 1995;). Enquanto que as principais fontes de sulfato no Meio B consiste em sulfato de magnésio, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/L) e sulfato de

cálcio, CaSO_4 (1 g/L), no Meio C, o sulfato de sódio, Na_2SO_4 (4,5 g/L) é utilizado.

Nestes meios de cultura é imprescindível que condições estritamente anaeróbias sejam estabelecidas e o potencial de redução esteja abaixo de -200mV como relatado por Cabrera et al. (2005) durante a avaliação da toxicidade de metais em cepas *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio sp.* Neste estudo, estas culturas foram mantidas em meio Postgate B e posteriormente cultivadas em meio Postgate C contendo metais e alta concentração de sulfato. As concentrações mais altas de metais toleradas e os níveis de precipitação nestas condições foram: para *Desulfovibrio vulgaris*, 24,7%-15 ppm Cr(III), 45%-4 ppm Cu(II), 60%-10 ppm Mn(II), 96%-8,5 ppm Ni(II) and 9%-20 ppm Zn(II) e para *Desulfovibrio sp.*, 25,5%-15 ppm Cr(III), 71%-4 ppm Cu(II), 66,2%-10 ppm Mn(II), 96,1%-8,5 ppm Ni(II) and 93%-20 ppm Zn(II).

Diversos estudos relatam a utilização do meio Postgate C para enriquecimento de BRS e tratamento de águas residuárias contendo sulfato (CABRERA et al., 2005; GARDNER; STEWART, 2002; LUPTAKOVA; KUSNIEROVA, 2005).

Fortin et al. (2000), utilizou meio Postgate C modificado para identificar a presença BRS em rejeitos de minas de Au e Cu-Zn, bem como as condições físico-químicas, como pH, teor de carbono e potencial redox, presente nestes sedimentos. Os resultados obtidos demonstraram a presença de BRS em todos os rejeitos de minas estudados. Além disso, notaram que a utilização de lactato como única fonte de carbono no meio de cultivo limitou o crescimento das BRS, ressaltando a importância da utilização de diversos doadores de elétrons no meio de cultura.

Cetin et al. (2008), utilizou meio Postgate C modificado contendo Cr(VI) para enriquecer BRS presentes em águas residuárias industriais contaminadas com Cr(VI). O estudo demonstrou que a capacidade de redução de Cr(VI) da comunidade microbiana dependia dos valores de pH do meio de cultura, e o pH ótimo encontrado foi 8.

O lactato é utilizado pela maioria das BRS uma vez que a redução de sulfato é altamente favorável energeticamente (Tabela 3.1). Apesar de ser preferível para redução de sulfato, substratos como acetato, glicose, etanol,

formiato e glicerol, apresentam menor custo, e diante disto, o interesse em estudar a redução de sulfato utilizando estas fontes de carbono é observada em diversos estudos (HOSOKAWA et al., 2009; KWON et al., 2015;; VAINSHTEIN et al., 2003; ZHOU et al., 2015; WOLICKA et al., 2015;).

Tabela 3.1 - Variação da energia livre de Gibbs durante a redução de sulfato para diferentes matérias orgânicas.

Reação	ΔG^0 (KJ/reação)
Acetato + $SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$	-47,6
Formiato + $0,25 SO_4^{2-} + 0,25H^+ \rightarrow HCO_3^- + 0,25HS^-$	-58,04
Propionato + $0,75 SO_4^{2-} \rightarrow$ Acetato + $HCO_3^- +$ $0,75 HS^- + 0,25 H^+$	-37,7
Butirato + $0,5 SO_4^{2-} \rightarrow 2$ Acetato + $0,5 HS^- + 0,5 H^+$	-27,8
Lactato + $0,5 SO_4^{2-} \rightarrow$ Acetato + $HCO_3^- + 0,5 HS^-$	-80,2
Etanol + $0,5 SO_4^{2-} \rightarrow$ Acetato + $0,5 HS^- + 0,5H^+ +$ H_2O	-69,2

Fonte: Muyzer e Stams (2008), adaptado pela autora.

Bertolino et al. (2014) comparou lactato e glicerol como único doador de elétrons para redução de sulfato em reatores de leito fluidizado. A primeira estratégia consistiu em estimular a redução de sulfato até que uma concentração de biomassa contendo predominantemente BRS se estabilizasse. Para isto, adotou-se o lactato como fonte de carbono, visto que este pode ser utilizado por diferentes cepas microbianas e o meio Postgate C. Pode-se então, alterar a fonte de carbono para glicerol. Os resultados obtidos demonstraram redução de sulfato de 90% para lactato, predominando a via de oxidação incompleta para redução do sulfato e acarretando alta concentração de acetato. A mesma redução de sulfato de 90% foi observada para o glicerol, com formação de butirato juntamente com acetato como produtos de oxidação. Além disso, uma relação de sintrofismo entre BRS e bactérias fermentativas foi observada, uma vez que a fermentação do glicerol ocorreu paralelamente à redução de sulfato.

Zhou et al. (2015) avaliou a redução de sulfato utilizando diferentes fontes de carbono (etanol, lactato, formato e glicose) em biorreatores anaeróbios. O melhor desempenho foi obtido para o reator alimentado com etanol, que apresentou o menor período de partida (31 dias) e a maior taxa de remoção de sulfato ($8,60 \text{ kg.m}^3.\text{d}^{-1}$). Apesar de o mesmo tipo de inóculo ter sido utilizado na alimentação dos reatores, diferentes comunidades microbianas foram encontradas para os diferentes substratos utilizados. A maior riqueza e uniformidade na comunidade bacteriana foi observada no reator alimentado com glicose. Entretanto, a maior abundância de BRS, foi observada no reator alimentado com etanol. Além das BRS, foram detectadas também bactérias oxidadoras de enxofre e bactérias redutoras de enxofre.

Diante disto, buscou-se estudar neste trabalho a viabilidade da utilização de BRS autóctones submetidas ao processo de bioaugmentação para a remoção de sulfato da DAM, através de três etapas principais: comparação do potencial para remoção de sulfato com biomassa não autóctone e previamente adaptada, enriquecimento alterando a fonte de carbono convencional para etanol e formiato e, avaliação da resistência a condições de baixo pH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos a serem realizados incluíram ensaios de enriquecimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS) em reatores batelada anaeróbios empregando microrganismos autóctones e modificando as condições de enriquecimento (fonte de carbono e pH do meio de cultura Postgate C), avaliação quantitativa destes microrganismos através do Método do Número mais Provável (NMP) e caracterização da comunidade microbiana presente nos ensaios realizados.

Os ensaios ocorreram no Laboratório de Biotecnologia Anaeróbia e no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, Minas Gerais. Abaixo, segue o fluxograma que resume as fases experimentais deste trabalho (Figura 4.1).

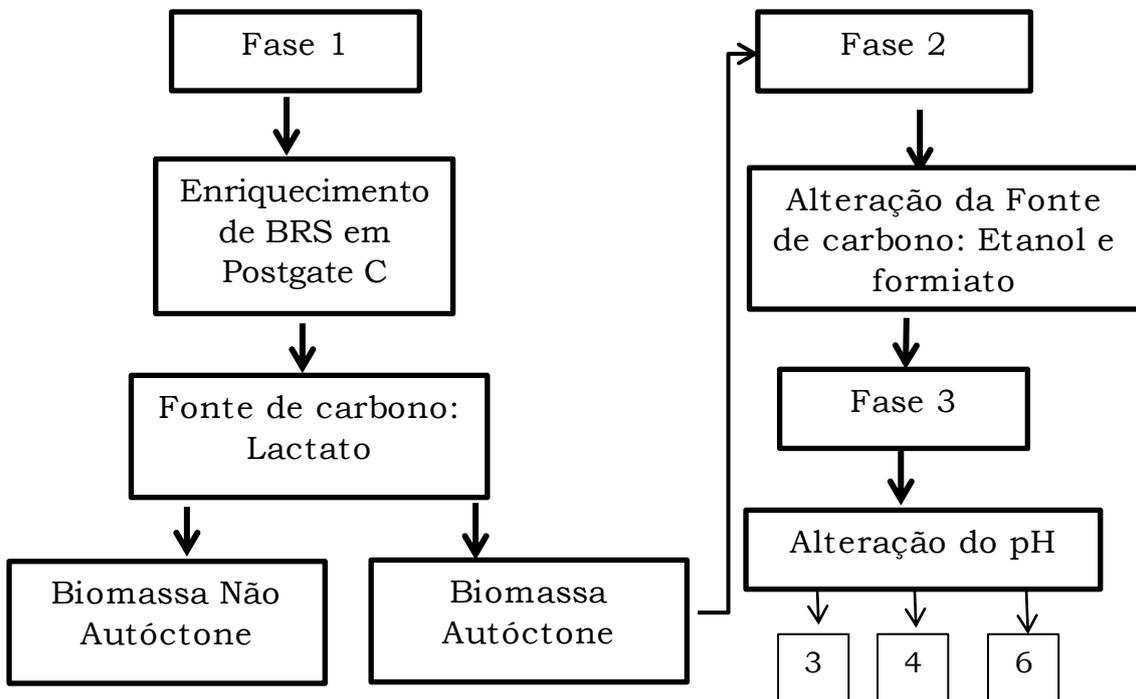


Figura 4.1 - Fluxograma explicativo das Fases experimentais deste trabalho.

Fonte: Da autora.

As análises físico químicas e de biologia molecular aplicadas a estas etapas seguem na tabela 4.1:

Tabela 4.1: Análises Físico-químicas e de biologia molecular realizadas nas Etapas 1, 2 e 3 deste trabalho.

Análises Físico-Químicas	SVT, pH, SO_4^{2-} , DQO, H_2S
Análises de Biologia Molecular	Extração de DNA, PCR, DGGE e sequenciamento das bandas excisadas

Fonte: Da autora.

4.1 FASE 1: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICRORGANISMOS AUTÓCTONES PARA TRATAMENTO DA DAM

Para avaliar o potencial de microrganismos autóctones no tratamento da DAM, comparou-se o desempenho e a diversidade microbiana de BRS autóctones (AUT) e não autóctones (N-AUT) por meio do enriquecimento de BRS em reatores anaeróbios tipo batelada utilizando meio de cultura Postgate C. Após isto, buscou-se estudar a dinâmica de aderência microbiana da biomassa autóctone em espuma de poliuretano, como possível inóculo de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Portanto, esta fase experimental foi dividida em duas partes, conforme demonstra a Figura 4.2.

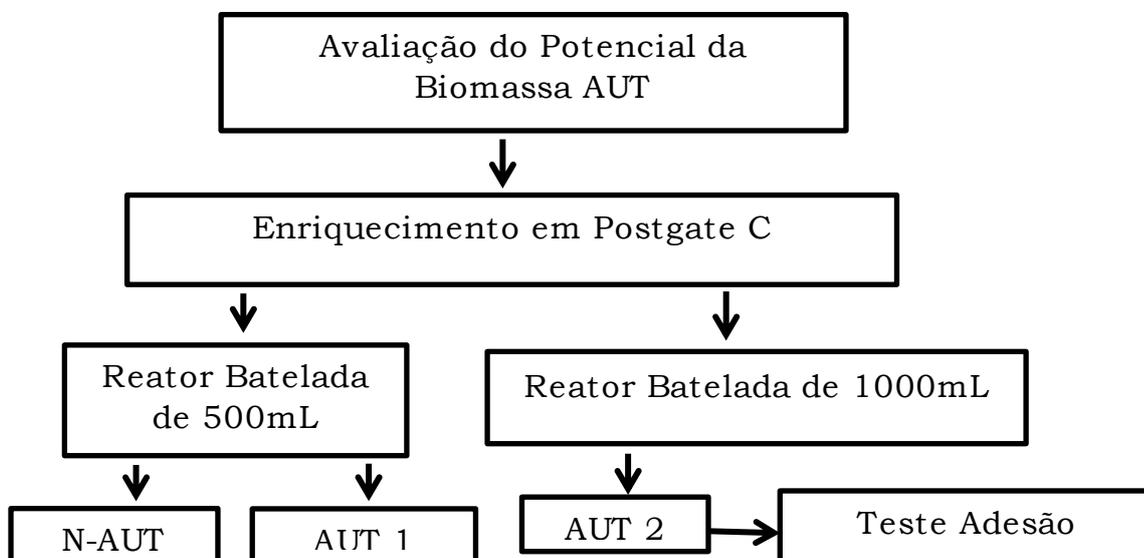


Figura 4.2 - Fluxograma contendo os procedimentos experimentais durante a Fase 1 deste trabalho.

Fonte: Da autora.

4.1.1 Enriquecimento das Bactérias Redutoras de Sulfato

Os ensaios realizados para ativação e enriquecimento das bactérias redutoras de sulfato foram realizados sob assepsia e fluxo constante de nitrogênio (100%). Foi utilizado como meio de cultura Postgate C (ILHAN-SUNGUR et al., 2007), cuja composição segue na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição do meio de cultura utilizado no enriquecimento.

Constituintes	Quantidades Adicionadas*
KH ₂ PO ₄ (g)	0,50
NH ₄ Cl (g)	1,00
Na ₂ SO ₄ (g)	4,50
CaCl ₂ .2H ₂ O (g)	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O (g)	0,06
Lactato (mL)	6,00
Extrato de levedura (g)	1,00
FeSO ₄ .7H ₂ O (1%) (uL)	400,00
Citrato de sódio.2H ₂ O (g)	0,30
Resazurina (mL)	1,00
Na ₂ S (5%) (mL)	10,00

*Para volume final de 1L de Postgate C.

Fonte: Da Autora.

O enriquecimento foi realizado em dois reatores anaeróbios tipo batelada com volume de 500mL, alimentados com 250mL de Postgate C (Figura 4.3). Os reatores foram autoclavados e submetidos a fluxo de nitrogênio (100%) durante 20 minutos, podendo então ser fechados. No primeiro reator (denominado Reator AUT 1), adicionou-se 45±4 mg de

Sólidos Voláteis Totais (SVT) de inóculo previamente enriquecido proveniente de sedimento de mina de urânio contendo DAM, Mina Osamu Utsumi (Figura 4.4), localizada em Poços de Caldas, Minas Gerais (Biomassa AUT). No segundo reator (Reator N-AUT), adicionou-se 46 ± 5 mg de SVT de inóculo derivado de reator sulfetogênico contendo lodo já estabilizado e adaptado em lactato como fonte de carbono (Biomassa N-AUT). Os dois reatores foram homogeneizados por meio de agitação manual, sendo então incubados sob agitação controlada de 100 rpm e temperatura de 30°C durante 41 dias.

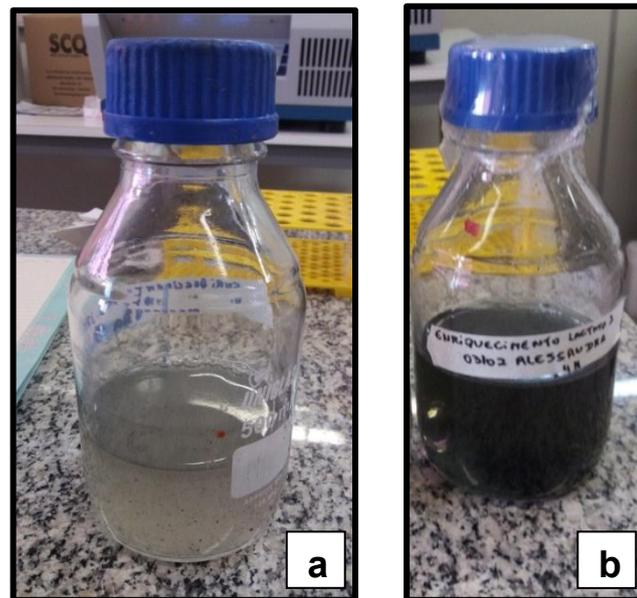


Figura 4.3 - Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados: a) Reator AUT 1 b) Reator N-AUT.

Fonte: Da autora.



Figura 4.4 - Mina Osamu Utsumi (INB), Poços de Caldas, Brasil. Local de coleta do sedimento de mina de urânio contendo DAM utilizado no enriquecimento das BRS.

Fonte: Da autora.

4.1.2 Análises Físico-Químicas

Os reatores foram monitorados por meio da determinação do teor de sulfeto, sulfato, matéria orgânica medida como DQO (semanalmente), e medição do pH (início e fim do enriquecimento) de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association - APHA, 2005).

As amostras foram previamente centrifugadas em micro centrífuga de modelo MCD-2000 HEMATOCRIT em 8000 rpm durante 10 min para medições de DQO e concentrações de sulfato.

Para quantificação do sulfato foi utilizado o método turbidimétrico 4500-SO₄²⁻. O sulfeto (S²⁻/HS⁻/H₂S) foi medido como sulfeto total dissolvido no meio de cultura e utilizou-se método colorimétrico em espectrofotômetro da marca 39 Hach® modelo DR-2800 por meio de kit hach® específico para análises de sulfeto e produzido pelo fabricante. Para a DQO foi utilizado o método colorimétrico de refluxo fechado -5220 D. O pH foi medido de acordo com o método eletrométrico 4500-H+.

4.1.3 Ensaio de Adesão da Biomassa em Espuma de Poliuretano

O ensaio de adesão da biomassa em espuma de poliuretano utilizando reatores diferenciais foi realizado para verificar o processo de aderência microbiana da biomassa AUT neste material suporte e assim, auxiliar na determinação das condições para inoculação de reator RAHLF (Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo).

4.1.3.1 Reatores Diferenciais

Foram utilizados 4 reatores diferenciais de 5 cm de comprimento, 2,6 cm de diâmetro e capacidade de 27 mL, confeccionados em vidro, providos de tampa teflon e vedados com anel de borracha tipo o-ring (Figura 4.5).

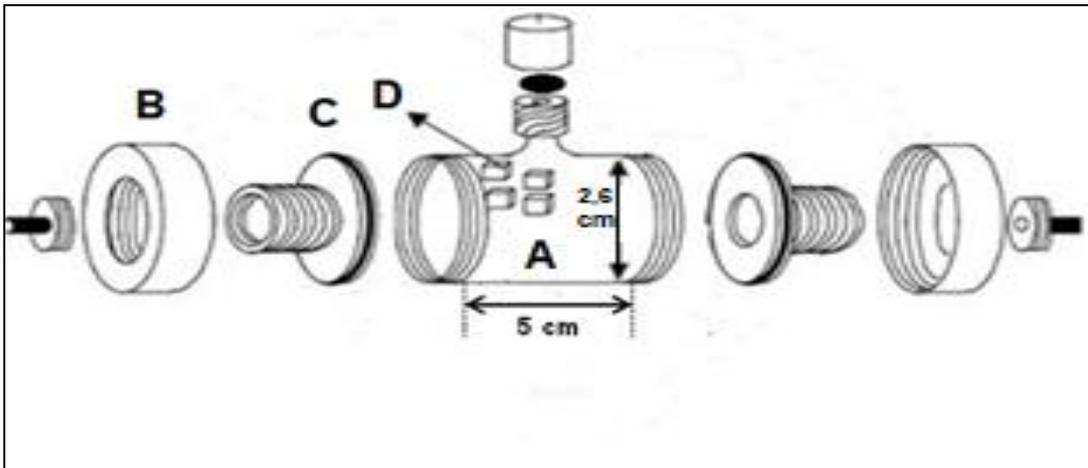


Figura 4.5 - Representação esquemática do reator diferencial utilizado: A) reator, B) tampa, C) O-ring, D) material suporte.

Fonte: Rodriguez et al. (2011), adaptado pela Autora.

4.1.3.2 Inóculo

O inóculo utilizado no ensaio de Adesão da Biomassa em Espuma de Poliuretano foi previamente enriquecido em reator batelada anaeróbio de 1000 mL, contendo 500mL de meio de cultura Postgate C e inoculado com 10% da Biomassa AUT (denominado Reator AUT 2). O reator foi então incubado sob agitação controlada de 100 rpm e temperatura de 30°C durante 62 dias.

4.1.3.3 Material Suporte

Os reatores diferenciais foram preenchidos com 0,4 g de partículas cúbicas de espuma poliuretano com 5 mm de aresta, densidade aparente de 23 Kg.m³, porosidade próxima a 95% e raio de esfera equivalente (Req) igual a 0,31. As espumas foram produzidas sem adição de corantes ou aditivos pela empresa Colchões Guilherme, localizada na cidade de São Carlos, SP.

4.1.3.4 Protocolo experimental

O reator AUT 2 contendo 1687,7 mg/L de Sólidos Voláteis Totais (SVT) foi recirculado nos reatores diferenciais durante 28 dias, conforme esquema apresentando nas Figura 4.6 e Figura 4.7. Foi adotado tempo de detenção hidráulica de 24 horas, temperatura de 30°C e velocidade superficial de 0,36 cm/min, reproduzindo as mesmas condições de operação do reator RAHLF.

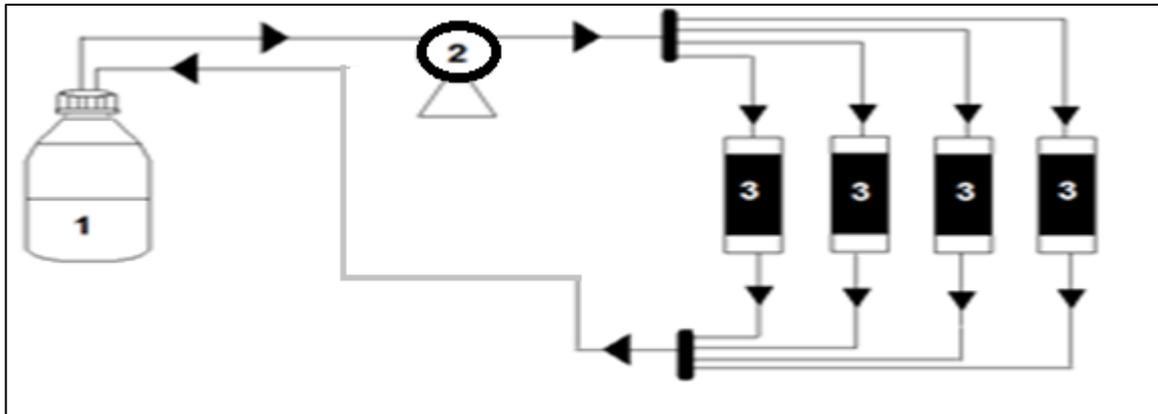


Figura 4.6 - Representação Esquemática do Experimento: 1) Reator AUT 2, 2) Bomba peristáltica Gilson®, 3) Reatores diferenciais.

Fonte: Da Autora.



Figura 4.7 - Foto dos reatores diferenciais, em operação, instalados na estufa para controlar a temperatura.

Fonte: Da Autora.

Em intervalos de 7 dias, desmontava-se um reator diferencial e submetia-se as matrizes colonizadas à análise de sólidos voláteis totais (SVT). Através da utilização de um pinça e água destilada comprimiu-se as espumas removidas do reator diferencial. A solução obtida por este procedimento foi submetida à secagem em estufa por 24 h a 105°C e, posteriormente calcinada em mufla a 550°C durante 15 minutos. O peso da espuma seca foi determinado após secagem da mesma em estufa durante 24 h a 105°C.

4.2 ENRIQUECIMENTO DA BIOMASSA AUT EM POSTGATE C MODIFICADO (FASE 2 e FASE 3)

Nesta etapa enriqueceram-se as BRS autóctones (biomassa AUT) alterando-se o meio Postgate C. Na fase 2, alterou-se a fonte de carbono para etanol e formiato, de forma a avaliar a eficiência de remoção de sulfato ao utilizar-se fontes de carbono com menor custo do que o lactato. Na fase 3, buscou-se testar a resistência destas BRS em condições ácidas, alterando o pH inicial do enriquecimento para valores de 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0.

As características do meio de cultura contendo o inóculo AUT adicionado seguem na Tabela 4.3:

Tabela 4.3 - Características físico-químicas do meio de cultura contendo inóculo AUT adicionado aos reatores batelada nas fases 2 e 3 deste trabalho.

Parâmetro	Valor
pH	7,76
DQO (mg/L)	4052,6
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	3454,9
Sulfeto (mg/L)	59,2
SVT (mg/L)	1660

Fonte: Da autora.

4.2.1 Fase 2: Enriquecimento de BRS em diferentes fontes de carbono

Esta etapa consistiu no enriquecimento das BRS autóctones em meio Postgate C modificado, por meio da alteração da fonte de carbono para etanol e ácido fórmico, conforme consta na Tabela 4.4. Para que a avaliação de efeito da alteração dos doadores de elétrons no crescimento das BRS fosse possível, testou-se novamente o enriquecimento em Postgate C contendo lactato como substrato. Os demais componentes do meio de cultura foram adicionados conforme consta na Tabela 4.2.

Tabela 4.4 - Quantidade adicionada de cada fonte de carbono em substituição ao lactato e denominação do reator anaeróbio na Fase 2 do experimento.

Fonte de Carbono	Quantidade adicionada*	Reator
Etanol	0,39 mL	ETA
Lactato	1,50 mL	LAC
Formiato	2,56 g	FOR

*A quantidade adicionada de fonte de carbono foi calculada de modo a manter a relação DQO/SO₄²⁻ do meio Postgate C.

Fonte: Da autora.

O experimento foi conduzido por meio da inoculação de 45±4 mg de SVT da Biomassa AUT em cinco reatores tipo batelada de 500 mL contendo 250mL de Postgate C modificado (Figura 4.8). Os reatores LAC e ETA foram mantidos a 30°C durante 34 dias, enquanto que o reator FOR, foi mantido por apenas 10 dias em enriquecimento. O tempo de enriquecimento foi definido adotando como critério a manutenção do meio de cultura reduzido. Assim, quando observa-se a oxidação do mesmo o experimento era encerrado.

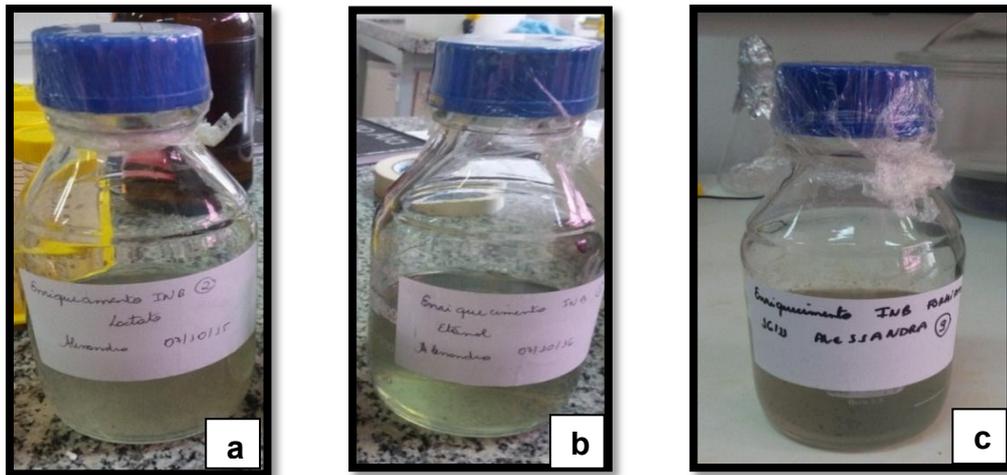


Figura 4.8 - Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando a fonte de carbono: a) Reator LAC b) Reator ETA c) Reator FOR.

Fonte: Da autora.

4.2.2 Fase 3: Enriquecimento de BRS em pH ácido

Nesta etapa, alterou-se o pH do meio Postgate C e estudou-se a resistência das BRS às condições ácidas utilizando as fontes de carbono estudadas na fase 2. Inoculou-se 45 ± 4 mg de SVT da Biomassa AUT em 8 reatores tipo batelada de 500 mL contendo 250 mL de Postgate C modificado (Figura 4.9, 4.10 e 4.11), conforme consta na Tabela 4.5. As amostras foram mantidas em enriquecimento durante 24 dias, a 30°C . O experimento para o reator LAC em pH inicial 6 não foi repetido pois já havia sido realizado na Fase 1.

Tabela 4.5 - Alteração do pH do meio Postgate C para cada fonte de carbono utilizada e denominação do respectivo reator.

Fonte de Carbono	pH Inicial	Reator*
Etanol	3	ETA 3
	4	ETA 4
	6	ETA 6
Lactato	3	LAC 3
	4	LAC 4
Formiato	3	FOR 3
	4	FOR 4
	5	FOR 5
	6	FOR 6

*Definido de acordo com o pH inicial do meio de cultura.

Fonte: Da autora.

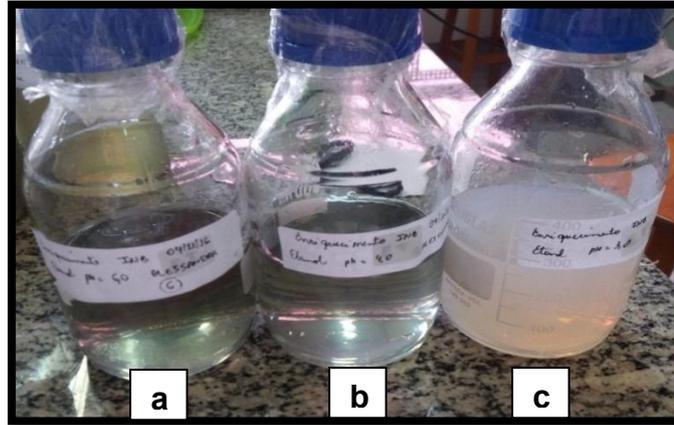


Figura 4.9 - Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando o pH para fonte de carbono etanol: Reator ETA 3 (a); ETA 4 (b); ETA 6 (c)

Fonte: Da autora.

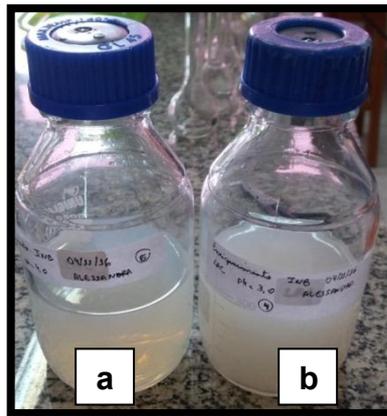


Figura 4.10 - Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando o pH para fonte de carbono lactato: Reator LAC 3 (a); LAC 4 (b).

Fonte: Da autora.

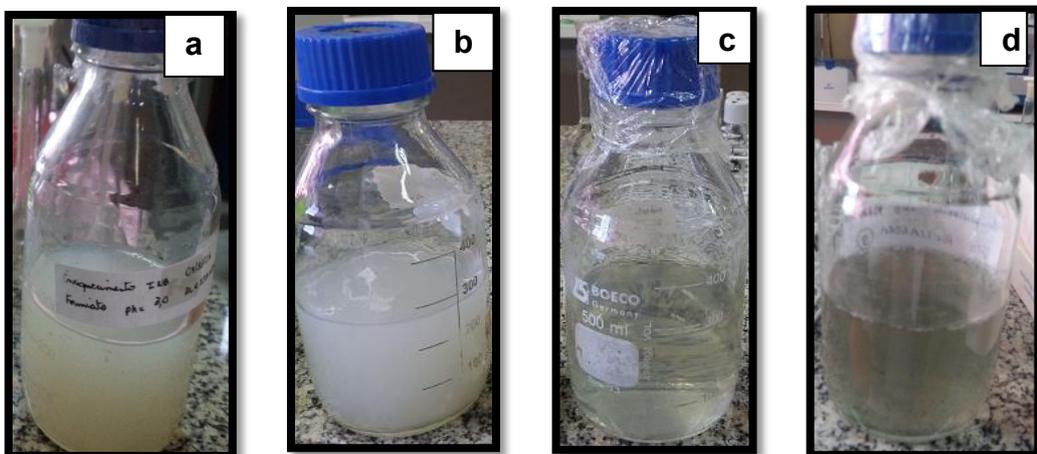


Figura 4.11 - Reatores tipo batelada anaeróbios utilizados alterando o pH para fonte de carbono formiato: Reator FOR 3 (a); FOR 4 (b); FOR 5 (c); FOR 6 (d).

Fonte: Da autora.

4.2.3 Análises Físico-Químicas

Os reatores foram monitorados por meio da determinação semanal do teor de sulfeto, sulfato e DQO. Para o ensaio com diferentes fontes de carbono, mediu-se o pH no início e fim do enriquecimento, enquanto que para o ensaio em pH ácido, a medição foi feita semanalmente. Mediu-se também o teor de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT) ao fim do enriquecimento. Estas análises foram feitas acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005), e seguindo os métodos citados no item 4.1.2.

Para análises de ST e SVT, o procedimento consistiu em calcinar o cadinho de porcelana utilizado em mufla a 550°C durante 15 minutos, e após o resfriamento, mediu-se sua massa (M_1). Adicionou-se 50 mL da solução presente nos reatores (V) no cadinho e secou o mesmo em estufa por 24 h a 105°C, medindo novamente sua massa após este período (M_2). Este cadinho foi novamente calcinado em mufla a 550°C durante 15 minutos e mediu-se sua massa (M_3). Os valores de ST e SVT são calculados de acordo com as equações 9 e 10.

$$ST = \left(\frac{M_2 - M_1}{V} \right) * 1000 \quad (9)$$

$$SVT = \left(\frac{M_2 - M_3}{V} \right) * 1000 \quad (10)$$

4.2.4 Análise Quantitativa dos grupos de BRS

Para avaliar quantitativamente os grupos de bactérias redutoras de sulfato foi utilizado o método do Número Mais Provável (NMP). Empregou-se cinco tubos de antibiótico contendo 9 mL de meio de cultivo composto por 8,8 mL de Postgate C e alíquotas de 0,1 mL das soluções de sulfeto de sódio (0,4%) e sulfato ferroso (1%). Inoculou-se a biomassa AUT neste meio de cultivo empregando taxas de diluições decimais seriadas na faixa de 10^{-1} a 10^{-10} para o inóculo AUT e reator FOR e, 10^{-2} a 10^{-6} para os reatores ETA e

LAC. Após este procedimento, os frascos foram cultivados sob mistura gasosa de Nitrogênio, a 30°C e durante 30 dias.

O sulfeto produzido pelas BRS reage com o sal ferroso presente no meio e origina o precipitado negro (FeS), que provoca turbidez dos meios de cultivo. Quando isto ocorre, o crescimento dos microrganismos é considerado positivo.

Por meio da contagem dos tubos positivos e negativos de três diluições consecutivas, seleciona-se a combinação correspondente e obtém-se o valor NMP. Com este dado, pode-se calcular o valor NMP para o experimento de acordo com a seguinte equação (APHA, 2005):

$$\frac{NMP}{100 \text{ mL}} = Valor \ NMP \times \frac{10}{V} \quad (11)$$

Em que: V corresponde a menor diluição da série de combinações de tubos positivos

Esta metodologia foi aplicada apenas para a Fase 2 do experimento.

4.3 AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA

Para comparar e caracterizar a diversidade de microrganismos nos ensaios de enriquecimento do grupo das BRS foi utilizada a técnica DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) seguida de seqüenciamento de bandas recortadas do gel do DGGE e análise filogenética. Esta avaliação filogenética foi realizada apenas na FASE 1 deste estudo.

4.3.1 Coleta de Amostras

Durante a Fase 1, foram coletadas amostras semanalmente durante um mês, e estas foram nomeadas segundo a tabela 4.6:

Tabela 4.6 - Denominação das amostras coletadas para reatores AUT e N-AUT.

Nome	Dias de Operação
AUT 1 e N-AUT 1	4
AUT 2 e N-AUT 2	11
AUT 3 e N-AUT 3	15
AUT 4 e N-AUT 4	24
AUT 5 e N-AUT 5	31

Fonte: Da autora.

Para Fase 2, coletou-se amostras ao final do enriquecimento utilizando etanol (ETA 7) e ácido fórmico (FOR 7) como fontes de carbono.

Para Fase 3, avaliou-se a comunidade microbiana de forma a identificar-se a presença de BRS com capacidade de crescimento em condições ácidas. Denominou-se as amostras como consta na Tabela 4.5, sendo assim, ETA 3, ETA 4 e ETA 6 (pH inicial 3, 4 e 6, respectivamente), LAC 3 e LAC 4 (pH inicial 3 e 4, respectivamente) e, FOR 3, FOR 4, FOR 5 e FOR 6 (pH inicial 3, 4, 5 e 6 respectivamente).

4.3.2 Procedimento Experimental

A primeira etapa consistiu na extração de DNA dos microrganismos conforme instruções presentes no Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA). A extração de DNA foi confirmada através de eletroforese (DIGEL®) em gel de agarose 1,5% a 120 V por 30 minutos.

Após isto, foi feita amplificação através da reação da cadeia polimerase (PCR) em Termociclador (Axygen) seguindo o seguinte protocolo desnaturação inicial à 94°C durante 4 min; 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, anelamento dos primers à 55°C por 1 min, e extensão à 72°C por 1 min; extensão final à 72°C por 10 min. Foram amplificados o gene bacteriano rRNA16S com primers específicos para os Domínios Bacteria, 968F com grampo GC (5'gc.AAC GCG AAG AAC CTT AC) e 1401R

(5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG) (BRUCHA, 2007) e, o gene *dsrB* (Sulfito Redutase Dissimilatória Subunidade Beta) com primers específicos para o grupo das sulfatorredutoras, DSRp2060F com grampo GC (5'gc.AAC ATCGTYCAYACCCAGGG-3') e DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') (LOPEZ, 2014). A sequência do grampo GC, segue na Tabela 4.7. Foram preparadas misturas (mix) de 50uL contendo tampão de PCR 10X (PROMEGA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2-0,5mM de cada primer (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 0.5 U de Taq DNA polymerase (Promega), 50-100 ng de DNA (Tabelas 4.8 e 4.9). A confirmação do PCR foi realizada por meio de eletroforese (DIGEL®) em gel de agarose 1,5% com marcador de peso molecular 100pb.

Tabela 4.7 - Sequência do grampo GC acoplada as extremidades 5' dos primers 968f e DSRp2060F.

Sequência do	CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA
grampo GC	CGG GGG G

Fonte: Da Autora.

Tabela 4.8 -Concentração final dos reagentes para execução do PCR para Domínio Bacteria.

Reagentes	Concentração Final dos Reagentes	Volume para reação de 50 uL
Solução Tampão 10X	1	5uL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5uL
Primer 968f (20mM)	0,2 uM	0,5uL
Primer 1401 r (20mM)	0,2uM	0,5uL
DNTP's (100 mM)	0,8 mM	0,4uL
Taq-polimerase	0,5U	0,4 uL
H ₂ O	-	q.s.p. para 50uL
DNA	50-100ng	-

Fonte: Da Autora.

Tabela 4.9 - Concentração final dos reagentes para execução do PCR para Grupo das Sulfatorredutoras.

Reagentes	Concentração Final dos Reagentes	Volume para reação de 50 uL
Solução Tampão 10X	1X	5uL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5mM	1,5uL
Primer DSRp2060F (20mM)	0,5mM	1,25uL
Primer DSR4R (20 mM)	0,5mM	1,25uL
DNTP's (100 mM)	0,8mM	0,4uL
Taq-polimerase	0,5U	0,4 uL
H ₂ O	-	q.s.p. para 50uL
DNA	50-100ng	-

Fonte: Da Autora.

Para a técnica de DGGE utilizou-se o sistema LOCCUS Biotecnologia. As condições foram 85 V, com temperatura de 60°C, durante 17 horas, em gel de poliacrilamida 7,5% com gradiente desnaturante de uréia-formamida 40 a 60%, de forma a separar diferentes sequências dos segmentos de rRNA16S previamente amplificados. Para estudar o perfil de diversidade das amostras do gel de DGGE e calcular o coeficiente de similaridade foi utilizado o programa Bionumerics® (Bionumerics 7.6, Applied Maths, Bélgica) através do Coeficiente Dice e o método UPGMA.

Apenas as bandas provenientes do gel de DGGE das amostras AUT e N-AUT para o gene *dsrB* foram recortadas e reamplificadas sem a utilização do grampo GC, porém empregando os mesmos primers para o grupo das Sulfatorredutoras (Tabela 4.8). Estas amostras foram encaminhadas ao Centro de Estudos de Genoma Humano da Universidade de São Paulo para realização do seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado através da utilização do equipamento ABI 3730 DNA Analyser. As sequências obtidas foram posteriormente editadas e alinhadas no programa BioEdit e comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank do Centro de Informação Biotecnológica (NCBI), através do programa BLASTN e TBLASTX.

5 RESULTADO E DISCUSSÕES

Nesta etapa discutiu-se os resultados da Fase 1, que consistiu na avaliação do desempenho para remoção de sulfato e da comunidade microbiana dos reatores AUT e N-AUT, bem como o estudo do processo de adesão da biomassa AUT à espuma de poliuretano, e analisou-se também, a eficiência para remoção de sulfato do inóculo AUT ao modificar-se a fonte de carbono do meio de cultura para etanol e formiato e, ao reduzir-se o pH para valores ácidos (Fases 2 e 3, respectivamente).

5.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, COMUNIDADE MICROBIANA E IMOBILIZAÇÃO DO REATOR AUT

5.1.1 Desempenho dos Reatores AUT 1 e N-AUT

A remoção de sulfato foi muito similar para os reatores AUT 1 e N-AUT, como mostrado na Tabela 5.1, que resume o desempenho destes reatores. A máxima remoção de sulfato obtida foi de 57% para o reator AUT 1 e 62% para o reator N-AUT. A remoção de matéria orgânica medida em DQO foi de 29% para reator AUT 1, enquanto que para reator N-AUT obteve-se 89% de consumo de DQO. Ambos os reatores demonstraram aumento nos valores de pH.

Singh et al. (2011) enriqueceu lodo proveniente de digestor anaeróbio de uma estação de tratamento de esgoto utilizando meio de cultura Postgate C em reatores tipo batelada, obtendo um pH final de 8,13, remoção de sulfato de 20,5% e consumo de DQO de 12%. Os resultados de remoção de sulfato e DQO foram inferiores aos observados neste experimento.

Tabela 5.1 - Parâmetros obtidos através de análises físico-químicas durante o enriquecimento.

Parâmetros	Reator AUT	Reator N-AUT
pH Inicial	6,65±0,10	6,20±0,10
pH Final	7,86±0,01	7,91±0,01
COD/SO ₄ ²⁻	1,26±0,16	1,30±0,18
DQO inicial (mg/L)	(4,96±0,13)10 ³	(4,76±0,13)10 ³
DQO final (mg/L)	(4,03±0,11)10 ³	(9,04±0,54)10 ²
Consumo de DQO Máximo (%)	29,1±3,4	88,8±3,7
Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	(3,95±0,51)10 ³	(3,67±0,50)10 ³
Concentração Final de Sulfato (mg/L)	(1,89±0,18)10 ³	(1,52±0,17)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (%)	57±15	62±17
Concentração Inicial de Sulfeto (mg/L)	0,2±2,3	11,8±4,7
Concentração Final de Sulfeto (mg/L)	308±17	449±18
Máxima Produção de Sulfeto* (mg/L)	608±27	648±27

* A máxima produção de sulfeto consiste na concentração máxima de sulfeto obtida durante o experimento subtraída da concentração inicial de sulfeto.

Fonte: Da Autora.

Considerando a estequiometria da reação completa, caso o lactato fosse completamente oxidado, como demonstrado na Equação 5, para uma remoção de sulfato de $(2,24 \pm 0.54)10^3$ mg/L no reator AUT, um consumo de DQO de $(1,49 \pm 0.36)10^3$ mg/L seria esperado. O consumo de DQO observado no experimento foi de $(1,45 \pm 0.17)10^3$ mg/L, similar ao valor esperado. A biomassa presente no reator AUT foi isolada de sedimento proveniente de mina de urânio, e, acredita-se que seja composta por um gênero sulfetogênico capaz de promover a completa oxidação da matéria orgânica.

Para o reator N-AUT, o consumo de DQO esperado para uma remoção de sulfato de $(2,26 \pm 0.53)10^3$ mg/L era de $(1,51 \pm 0.35)10^3$ mg/L. O consumo de DQO obtido foi $(4,22 \pm 0.14)10^3$ mg/L. Como o meio Postgate C favorece a oxidação incompleta de matéria orgânica pelas BRS (BERTOLINO, 2012) e o inóculo N-AUT é composto por um consórcio microbiano, acredita-se que o consumo incompleto de lactato promoveu a presença de diferentes espécies de microrganismos, bem como o sintrofismo das BRS com outros microrganismos, como arqueias metanogênicas e bactérias acetogênicas. (MUYZER, 2008).

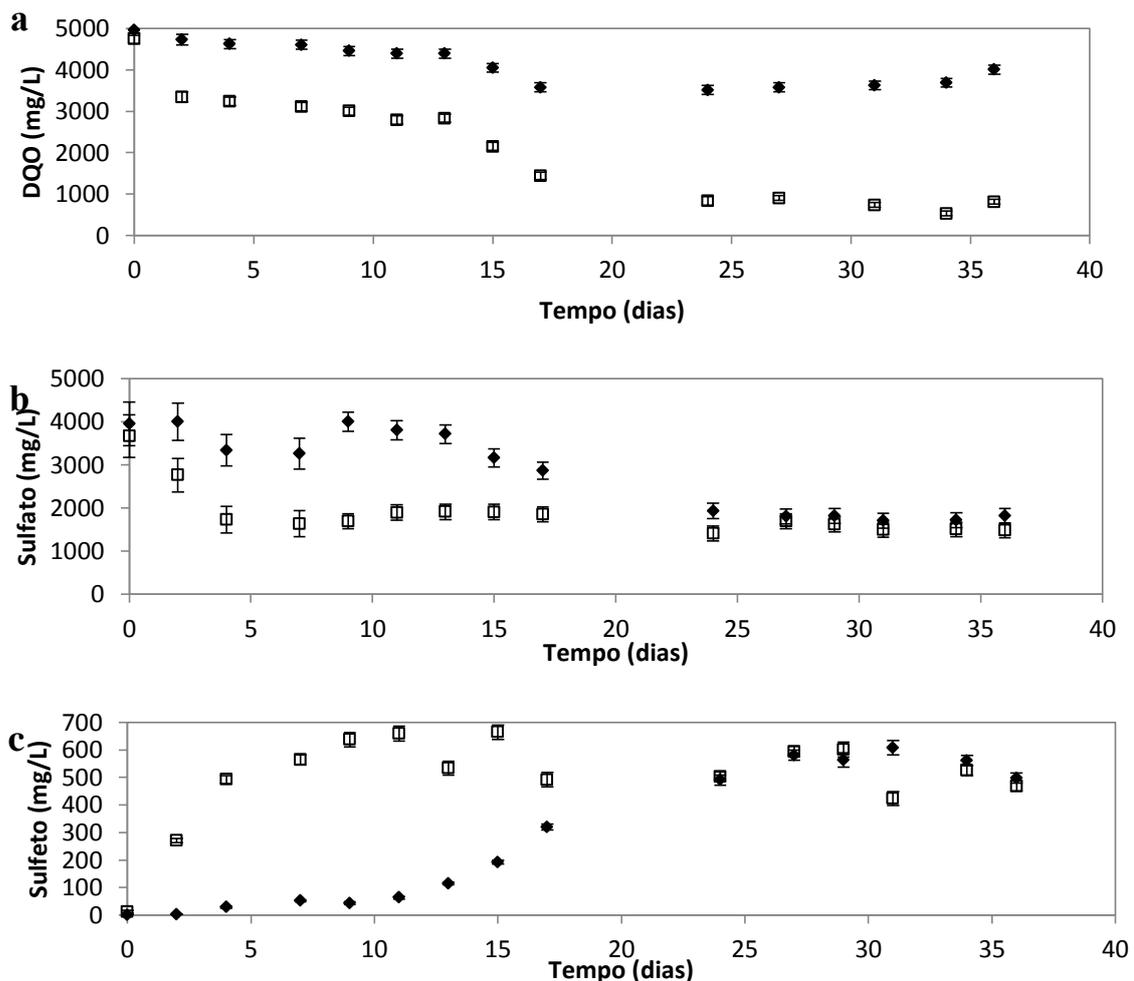


Figura 5.1 - Desempenho dos Reatores AUT (◆) e N-AUT (□) durante o experimento: (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.

Fonte: Da autora.

A produção de sulfeto foi similar para os reatores AUT 1 e N-AUT. Uma máxima produção de sulfeto de 650 mg/L foi produzida no Reator N-AUT e

608 mg/L no Reator AUT 1. O reator AUT apresentou dois estágios de crescimento da biomassa, como demonstrado na Figura 5.1. O primeiro estágio teve duração de 10 dias, e não foi observado acúmulo de sulfeto. Já no segundo estágio, com 11 dias de duração, uma alta produção de sulfeto foi observada.

Vainshtein et al. (2003) observou-se também, a presença de dois estágios de crescimento e redução de sulfato para o consórcio bacteriano que foi isolado de amostras de solo de um ecossistema aeróbio/anaeróbio: um estágio lento, sem acumulação de sulfeto, e um estágio rápido, com acumulação de sulfeto. O primeiro estágio com duração de aproximadamente 20 dias, e a baixa diminuição da concentração de sulfato resultou na acumulação de intermediários de enxofre desconhecidos.

Isto ajuda a comprovar a presença de dois estágios de crescimento da biomassa AUT durante o enriquecimento, um estágio de adaptação às novas condições do meio de cultura (Fase lag), cuja duração pode variar de acordo com as condições de cultura, seguido por um estágio de crescimento exponencial (Fase exponencial), resultando em alta redução de sulfato e produção de sulfeto.

A Figura 5.1, que resume o desempenho dos reatores durante o experimento, mostra que a biomassa AUT necessitou de um tempo de adaptação de aproximadamente 10 dias. Durante este período, nota-se um alta remoção de sulfato e alta produção de sulfeto no Reator N-AUT em comparação ao Reator AUT 1, que apresentou portanto uma menor atividade sulfetogênica. Durante a fase lag, as concentrações de sulfato e sulfeto permaneceram praticamente estáveis no Reator AUT 1, havendo apenas uma pequena remoção de sulfato e produção de sulfeto. Esta fase lag não foi constatada para o Reator N-AUT, provavelmente devido ao fato de que a biomassa N-AUT foi pré-adaptada em baixos valores de pH em um reator sulfetogênico.

Martins et al. (2009), observou a presença de uma fase lag durante o estudo de bactérias redutoras de sulfato resistentes a metais utilizadas para o tratamento de DAM em reatores tipo batelada anaeróbios. Neste estudo, uma variedade de amostras ambientais foram utilizadas como fonte de

biomassa, tais como solos, sedimentos e lodo de plantas de tratamento de águas residuárias.

Meier et al. (2012) estudou modelos de reatores batelada contendo culturas enriquecidas de sedimentos ácidos de um lago adotando diferentes pHs iniciais com altas concentrações de Fe^{2+} e Al^{3+} . Para valores de pH iniciais de 3 e 4, uma extensa fase lag foi observada, indicando a necessidade de adaptação das BRS à condições ácidas.

Após o período de aclimatação necessário para biomassa AUT, ambas as culturas apresentaram atividade sulfetogênica similar (Figura 5.1), resultando em valores similares de remoção de sulfato e produção de sulfeto.

Luptakova e Kusnierova (2005) estudaram a remoção de metais de DAM usando BRS isoladas de fontes naturais e industriais, cultivadas em meio Postgate C, bem como a análise da precipitação de cobre através do sulfeto produzido. Os resultados encontrados demonstraram uma redução de sulfato equivalente para ambas as culturas.

5.1.2 Comunidade Microbiana dos Reatores AUT 1 e N-AUT

A Figura 5.2 confirma a presença de DNA genômico nas amostras extraídas dos reatores AUT 1 e N-AUT. Para o reator N-AUT a extração de DNA foi possível desde o início do enriquecimento (4 dias de operação), o que não foi observado para o reator AUT, no qual a extração de DNA apenas foi possível após 11 dias de operação.

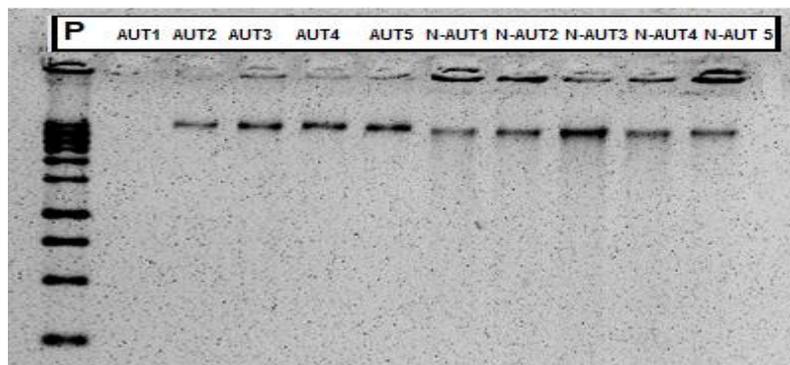


Figura 5.2 - Imagem negativa da eletroforese dos produtos da extração de DNA com o kit da PROMEGA® em gel de agarose 1,5%.

Fonte: Da autora.

As amostras obtidas com a extração de DNA foram amplificadas para o Domínio Bacteria e o grupo das sulfatorredutoras (Figura 5.3). A análise da imagem do gel demonstra que o tamanho do fragmento amplificado correspondeu ao esperado (433 pb) para o Domínio Bacteria, bem como para o grupo das sulfatorredutoras (350pb) (GEETS et al., 2006).

Não foi possível amplificar o gene *dsrB* durante as duas primeiras semanas de enriquecimento para o reator AUT (AUT 1 e AUT 2), como demonstrado na Figura 5.3b. Este período corresponde à fase de adaptação (15 dias de operação), com baixa produção de sulfeto (Figura 5.1c), e acredita-se que o número escasso de BRS durante este período de cultura não tenha sido suficiente para permitir a amplificação por PCR e a análise por DGGE. Isto não foi observado para o gene bacteriano rRNA 16S (Figura 5.3a).

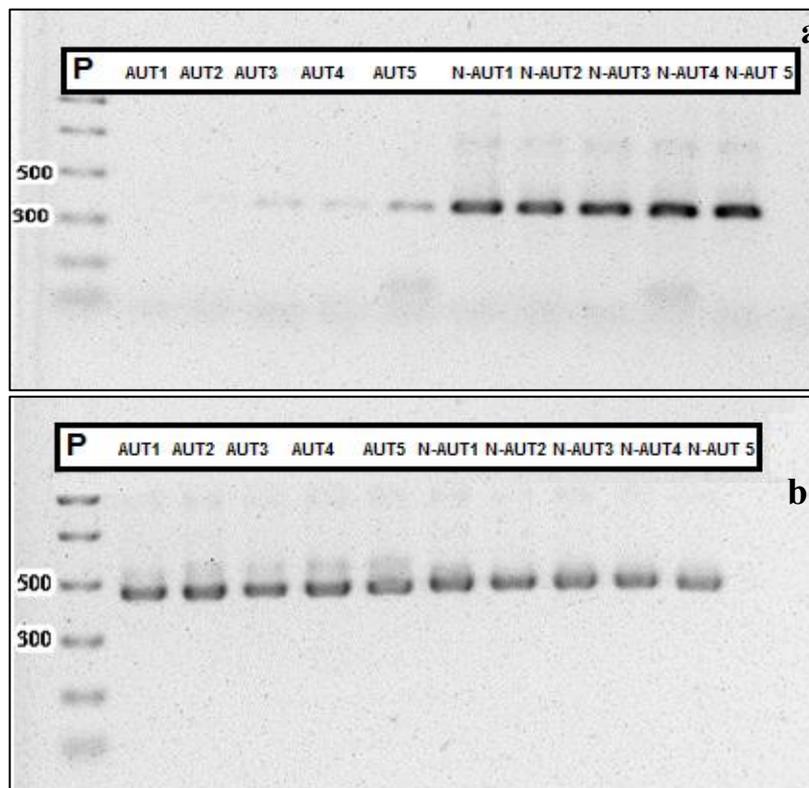


Figura 5.3 - Imagem negativa da eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5%.

- a) Domínio *Bacteria*: gene bacteriano rRNA 16S.
- b) Grupo das Sulfatorredutoras: gene *dsrB*.

Fonte: Da autora.

A análise da Figura 5.4, que apresenta o perfil de DGGE para o Domínio *Bacteria* demonstra que uma alta diversidade microbiana foi encontrada nos reatores AUT e N-AUT, durante o período de enriquecimento. Segundo Martin et al. (2011), a diversidade na comunidade bacteriana e o papel funcional de cada espécie coexistente pode ser uma das razões para a eficácia da biorremediação da DAM.

Diferentes comunidades foram observadas em ambos os reatores, havendo apenas 52% de similaridade para o Domínio Bacteria, como demonstrado no endógama de similaridade obtido através do programa BioNumerics e utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA (Figura 5.5).

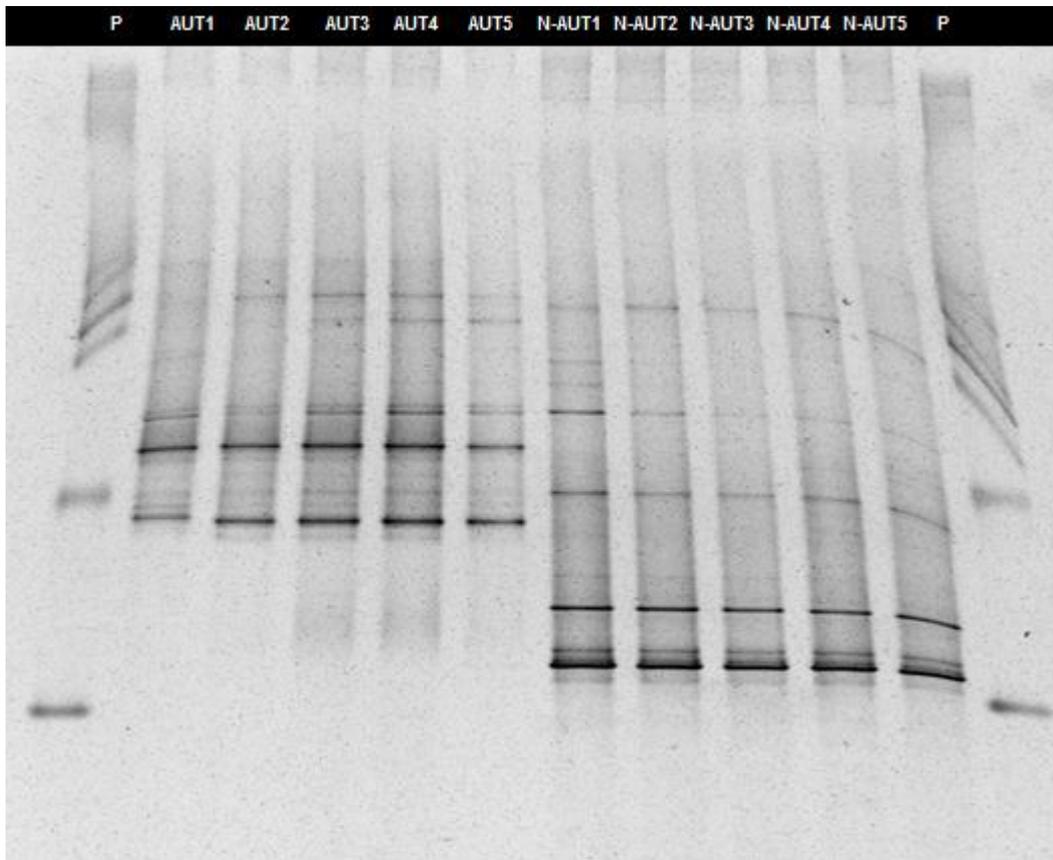


Figura 5.4 - Perfil de DGGE para o gene bacteriano rRNA 16S.

Fonte: Da autora.

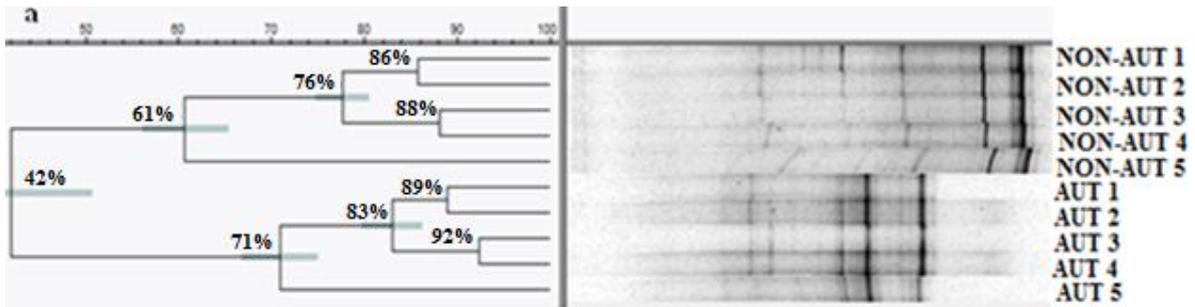


Figura 5.5 - Dendrograma de similaridade obtido através do programa BioNumerics, Versão 7.6 Applied Maths, Bélgica, usando o gel de DGGE para o Domínio Bacteria e analisado por meio do coeficiente de DICE e o método UPGMA.

Fonte: Da autora.

Para o grupo das sulfatorredutoras, o perfil de DGGE demonstrou a presença de uma única banda predominante para o reator AUT. Entretanto, uma alta diversidade foi encontrada no reator N-AUT (Figura 5.6). Esta menor diversidade de BRS no reator AUT corrobora o fato de que provavelmente o inóculo AUT é composto por um gênero sulfetogênico capaz de promover oxidação completa da matéria orgânica.

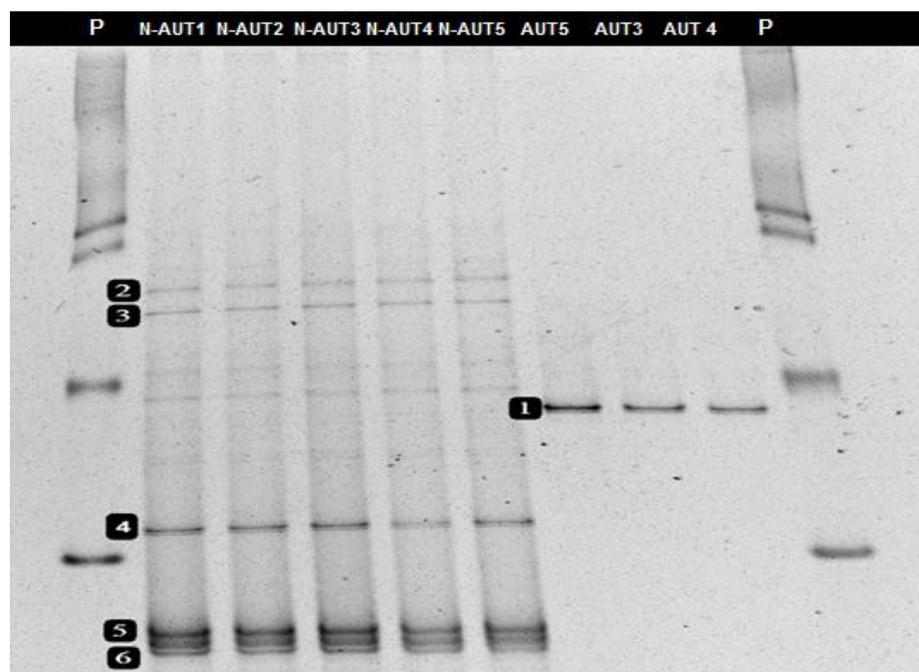


Figura 5.6 - Perfil de DGGE para o gene *dsrB*. Os números presentes no gel da imagem (b) representam as bandas sequenciadas.

Fonte Da autora.

Novamente, os reatores demonstraram diferentes comunidades microbianas, com uma similaridade de apenas 12% entre os reatores AUT e N-AUT conforme Figura 5.7.

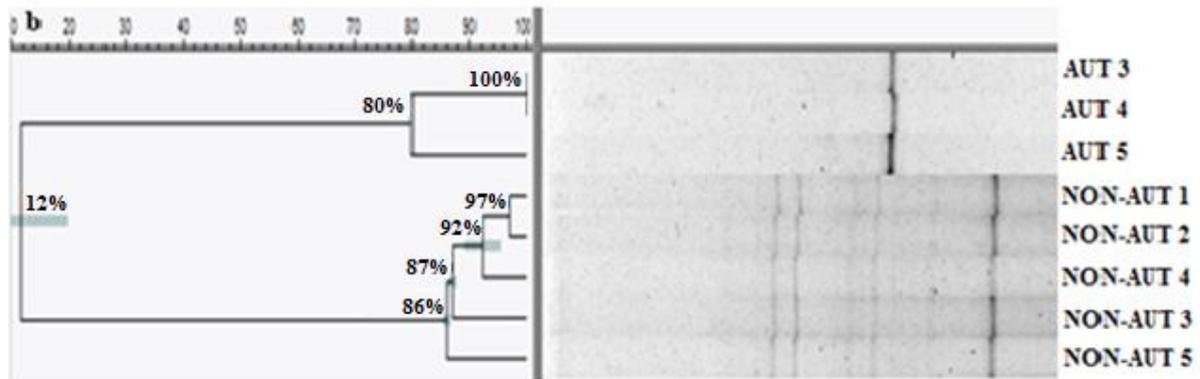


Figura 5.7 - Dendrograma de similaridade obtido através do programa BioNumerics, Versão 7.6 Applied Maths, Bélgica, utilizando o gel de DGGE para o grupo das Sulfatorredutoras e analisado por meio do coeficiente de DICE e o método UPGMA.

Fonte: Da autora.

A diversidade bacteriana e a diversidade para o grupo das sulfatorredutoras permaneceu estável durante o período de enriquecimento (Figura 5.4 e 5.6). Entretanto, ao final do enriquecimento (dia operacional 31), a comunidade presente em ambos os reatores apresentou uma menor similaridade com a comunidade encontrada em outros períodos de enriquecimento (Figura 5.5 e 5.7), principalmente para o Domínio *Bacteria*, na qual 61% de similaridade para N-AUT 5 e 51% de similaridade para AUT 5, foi observado ao comparar com as outras amostras.

A árvore filogenética construída por meio da comparação das bandas sequenciadas do gene *dsrB* obtidas pelo gel de DGGE com as sequências mais próximas retiradas do banco de dados do Genbank (Figura 5.8), demonstraram que a Banda 1, proveniente do reator AUT, apresentou maior similaridade com o genus *Desulfotomaculum*, pertencendo ao grupo Clostridia, enquanto que todas as outras bandas isoladas, provenientes do reator N-AUT, foram mais similares com o genus *Desulfovibrio*, pertencendo ao grupo Delta Proteobacteria.

Espécies *Desulfotomaculum* utilizam compostos orgânicos simples como doadores de elétrons e podem ser oxidadoras completas ou incompletas de matéria orgânica. Sulfato, sulfito e tiosulfato podem ser utilizados como aceptores de elétrons e são reduzidos a H₂S. Algumas espécies podem crescer autotroficamente utilizando CO₂ como única fonte de carbono. O crescimento destas espécies pode ser feito em meios simples já definidos contendo sulfeto como redutor, e algumas espécies necessitam de suplementação com vitaminas e extrato de levedura. Para espécies mesófilas, a temperatura ótima de crescimento está entre 30-37°C, e o pH ótimo entre 6,5 a 7,5. Porém, seu crescimento é observado na faixa de pH de 5,5 a 8,9 (KUEVER; RAINEY, 2009).

O gênero *Desulfotomaculum* apresenta a capacidade de formação de esporos, o que não é observado para as espécies *Desulfovibrio* (KUEVER et al., 1999). Isto pode explicar a presença de apenas uma banda predominante no gel de DGGE para o grupo das BRS no reator AUT, provavelmente decorrente da presença de um gênero especializado (Figura 5.6). Esta capacidade de formação de esporos possibilitou o isolamento e crescimento destas espécies a partir de sedimento de mina ácida neste trabalho, uma vez que permite a adaptação e sobrevivência destes microrganismos em ambientes com condições não favoráveis ao seu crescimento, como os encontrados na DAM.

Espécies *Desulfovibrio* representam o grupo de BRS com crescimento mais rápido relatado e utilizam compostos orgânicos de baixa massa molecular como substrato, por exemplo, ácido láctico, ácido acético e etanol (CABRERA, 2005). Quando lactato é utilizado como doador de elétrons para a redução de sulfato, estas BRS oxidam este substrato incompletamente a acetato. (ZHANG;WANG 2016).

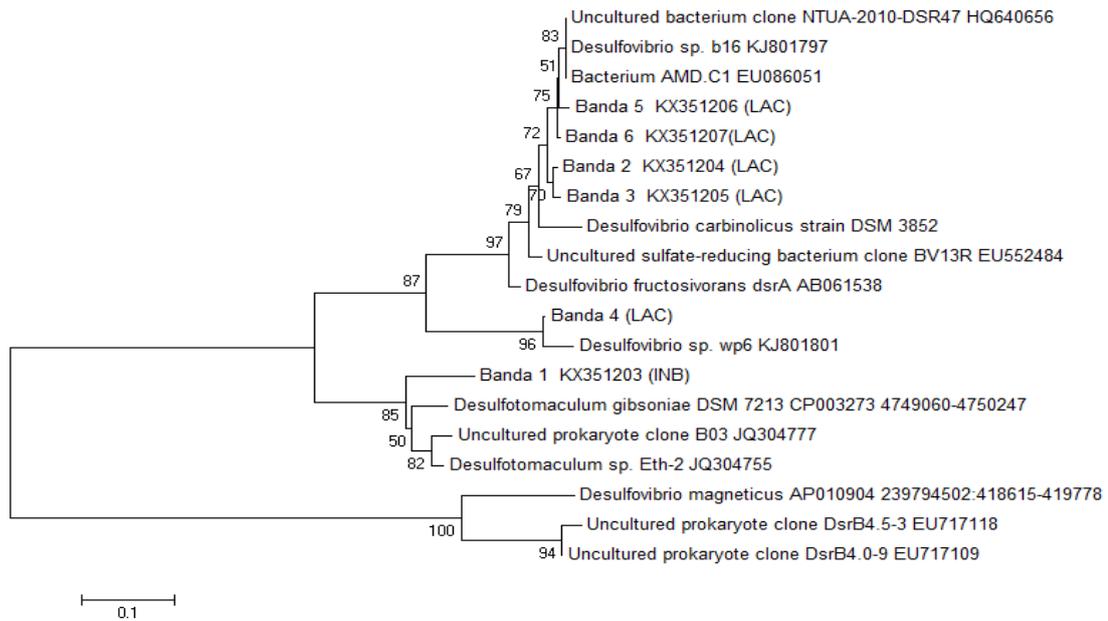


Figura 5.8 - Árvore filogenética construída através do método Neighbor-joining pelo programa MEGA 5.0, por meio da comparação das bandas que foram sequenciadas a partir do perfil de DGGE do gene *dsrB* contendo as seqüências mais próximas retiradas do banco de dados do Genbank. A barra de escala representa 2 substituições de nucleotídeos por 100 nucleotídeos. O valor *Bootstrap* está indicado nas ramificações.

Fonte: Da autora.

A Tabela 5.2 resume as afiliações filogenéticas das bandas de DGGE sequenciadas. A banda 1, foi 91% similar a cepa, uma BRS mesofílica isolada de uma vala de água doce localizada em Bremen, no norte da Alemanha (KUEVER et al., 2014). Esta BRS apresentam a capacidade de crescimento em uma grande variedade de substratos, incluindo compostos orgânicos, ácidos graxos de cadeia longa e muitos compostos aromáticos. A oxidação de substratos é usualmente completa a CO_2 , porém para altas concentrações de substrato, o acúmulo de acetato e outros ácidos graxos pode ser observado (KUEVER; RAINEY, 2009). A temperatura de crescimento destes microrganismos encontra-se entre 20-42°C e o pH entre 6,0 e 8,0, tendo como faixa ótima de crescimento 6,9 a 7,2. Dentre as fontes de carbono preferencias para esta espécie podemos citar, etanol, formiato e piruvato (KUEVER; RAINEY, 2009).

As demais bandas, provenientes do reator N-AUT, apresentaram maior similaridade com uma seqüência de uma cepa de BRS isolada de um local

contendo DAM e capacidade de redução de sulfato em condições moderadamente ácidas (RAMPINELLI et al., 2008). Espécies *Desulfovibrio fructosivorans*, com a qual a banda 2 apresentou maior similaridade, tem uma habilidade única dentre todas as BRS, já que são capazes de oxidar a frutose (MOREAU, 2010). Uma das espécies coexistentes no reator N-AUT, foi a espécie *Desulfovibrio magneticus*, reportada por Altun et al. (2014) em um reator de leito fluidizado sulfetogênico utilizado para remoção de arsênio. Estas bactérias são capazes de produzir sulfeto de ferro magnético extracelular.

Não foi possível registrar a banda 4 (Figura 5.6) no banco de dados do Genbank, devido ao tamanho reduzido apresentado por esta. Entretanto, esta apresentou maior similaridade (92%) com a espécie *Desulfovibrio desulfuricans* encontrada por Zhang e Wang (2016) ao tratar DAM contendo altas concentrações de metais, usando lodo de uma estação de tratamento de água e um reator anaeróbio de leito empacotado. Além de microrganismos relacionados à espécie *Desulfovibrio desulfuricans*, foram encontrados também bactérias fermentativas anaeróbias, com capacidade de utilizar lactato como doador de elétrons. Este estudo indicou que a maior parte dos elétrons produzidos pela oxidação incompleta da matéria orgânica poderiam ser utilizados por organismos anaeróbios fermentativos coexistentes no reator. Isto pode auxiliar a explicar o alto consumo de DQO encontrada no reator N-AUT, mas do que esperado baseado na redução de sulfato.

Um estudo feito em um sistema de biorremediação baseado na redução de sulfato por Lu et al. (2011) durante um tratamento com pH inicial de 2,0, demonstrou a presença de espécies *Desulfotomaculum* com capacidade de tolerância a condições de elevada acidez e a presença de metais, mantendo uma remoção de sulfato eficiente. Estas espécies, apesar de apresentarem uma baixa diversidade para o grupo das BRS comparada as espécies *Desulfovibrio*, demonstraram o mesmo desempenho que o reator N-AUT na remoção de sulfato, como demonstrado na Figura 5.1.

Tabela 5.2 - Afiliações filogenéticas para bandas sequenciadas obtidas do perfil de DGGE para o gene dsrB.

Banda (Número de Acesso no Genbank)	Sequência mais Próxima (Número de Acesso no Genbank)	Similaridade (Query Cover)	Cepa cultivada mais próxima (Número de Acesso no Genbank)	Similaridade (Query Cover)*	Grupo Filogenético
1 (KX351203)	<i>Desulfotomaculum gibsoniae</i> DSM 7213 (CP003273)	91% (100%)	<i>Desulfotomaculum gibsoniae</i> DSM 7213 (CP003273)	91% (100%)	Clostridia ¹⁰
2 (KX351204)	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	97% (100%)	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ DSM 3600 (AF418187)	97% (95%)	Delta Proteobacteria
3 (KX351205)	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	97% (100%)	<i>Desulfovibrio magneticus</i> RS-1 (AP010904)	94% (100%)	Delta Proteobacteria
4	Uncultured prokaryote clone DsrB4.5.3 (EU717118)	97% (100%)	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> strain F28-1 (DQ092635)	92% (99%)	Delta Proteobacteria
5 (KX351206)	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	98% (100%)	<i>Desulfovibrio carbinolicus</i> strain DSM 3852	94% (100%)	Delta Proteobacteria
6 (KX351207)	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	99% (100%)	<i>Desulfovibrio magneticus</i> RS-1 DNA (AP010904)	94% (99%)	Delta Proteobacteria

* Definidas utilizando a ferramenta de pesquisa BLASTN.

Fonte: Da autora.

Observou-se assim que o reator AUT apresentou uma baixa diversidade de BRS, bem como um baixo consumo de DQO, provavelmente decorrente da oxidação completa de matéria orgânica por um grupo sulfetogênico especializado. O reator N-AUT, entretanto, apresentou alta diversidade BRS, juntamente com um alto consumo de DQO, como resultado da oxidação incompleta da matéria orgânica bem como do sintrofismo das BRS com outros microrganismos.

Os resultados obtidos neste trabalho aliados a possibilidade de tolerância à acidez pelos microrganismos *Desulfotomaculum* podem trazer vantagens ambientais significativas para o tratamento da DAM. Devido a isto, decidiu-se por realizar um estudo mais detalhado destas comunidades autóctones, avaliando a viabilidade de imobilizar estes microrganismos em material suporte para aplicação em reatores sulfetogênicos com biomassa

aderida, bem como, estudar novas condições de enriquecimento dos mesmos (Fases 2 e 3).

5.1.3 Ensaios de imobilização da biomassa AUT em reatores diferenciais

5.1.3.1 Desempenho do Reator AUT 2

O reator AUT 2 utilizado no experimento apresentou uma remoção de sulfato de 34% e consumo de matéria orgânica medida como DQO de 14% e uma produção de sulfeto 364 mg/L. O desempenho do reator durante o experimento pode ser observado na Tabela 5.3, bem como na Figura 5.9 seguintes. Apesar da remoção de sulfato ter sido inferior a obtida para o reator AUT 1, pode-se constatar novamente a existência de um período de adaptação ao novo meio de cultura de aproximadamente 11 dias, e observar que as curvas de remoção de sulfato, consumo de DQO e produção de sulfeto foram bem similares.

Tabela 5.3 - Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas durante o enriquecimento para o reator AUT 2.

Parâmetros	Reator AUT
pH Inicial	7,12±0.10
pH Final	7,98±0.01
COD/SO ₄ ²⁻	1,12±0.08
DQO inicial (mg/L)	(4,68±0.11)10 ³
DQO final (mg/L)	(4,07±0.11)10 ³
Consumo Máximo de DQO (%)	14±3
Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	(3,85±0.26)10 ³
Concentração Final de Sulfato (mg/L)	(2,76±0.20)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (%)	34±9
Concentração Inicial de Sulfeto (mg/L)	42,1±2,5
Concentração Final de Sulfeto (mg/L)	306±9
Máxima Produção de Sulfeto (mg/L)	364±17

Fonte: Da Autora.

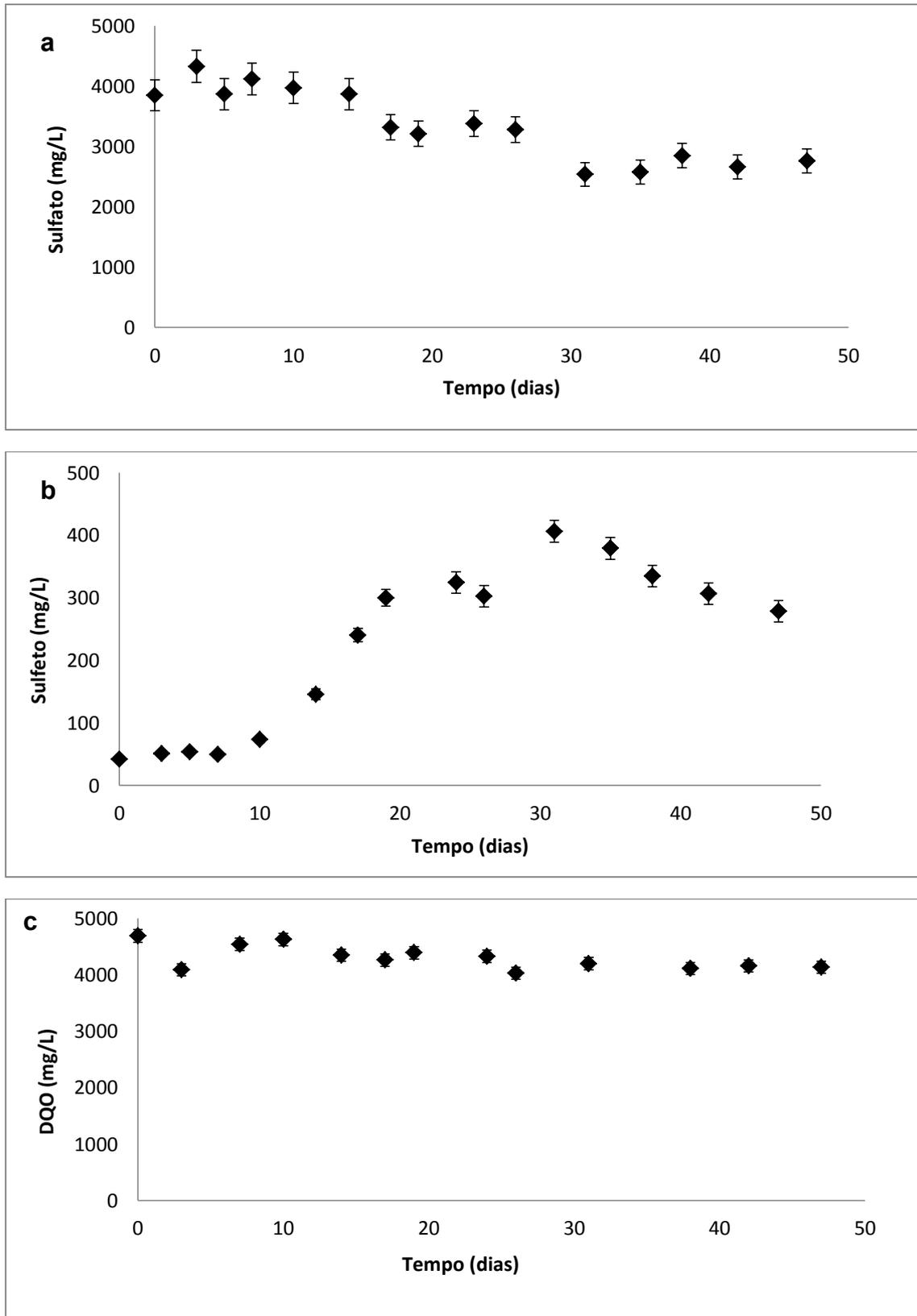


Figura 5.9 - Desempenho do AUT 2 durante o experimento: (a) Remoção de Sulfato, (b) Consumo de DQO, (c) Produção de Sulfeto.

As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.

Fonte: Da autora.

5.1.3.2 Avaliação da adesão da biomassa em espuma de poliuretano

A máxima adesão da biomassa AUT no material suporte foi de 60,5 mg SVT/g espuma, após 14 dias de experimento, como demonstrado na Figura 5.10, que resume os resultados de adesão da cultura AUT em espuma de poliuretano. Após este período, observa-se a estabilização da imobilização. Isto demonstra que 14 dias de recirculação seria suficiente para inoculação de um reator RAHLF com a biomassa AUT.

Um taxa de adesão similar foi encontrada por Rodriguez e Zaiat (2011), que obtiveram uma máxima concentração de SVT usando ácido láctico como doador de elétrons de 100 mg SVT/ g espuma após 7 dias de experimento. Os reatores diferenciais usados foram inoculados com comunidades autóctones obtidas de amostras de sedimento de mina de urânio localizada em Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil e, comunidades não autóctones provenientes de reator UASB tratando resíduo de abatedouro de aves de uma indústria em Tietê, São Paulo, Brasil.

Os valores similares ao relatado por Rodriguez e Zaiat (2011) encontrados neste experimento, demonstram a viabilidade da imobilização de biomassa autóctone em espuma de poliuretano, comprovando a hipótese de que estas podem ser utilizadas para tratamento da DAM em reatores sulfetogênicos, como RAHLF. Isto permite também a utilização futura destes microrganismos como inóculo de reatores com biomassa aderida para tratamento da DAM.

Vale ressaltar que neste trabalho, as comunidades autóctones também foram provenientes de sedimento de mina de urânio, entretanto, estas encontram-se adaptadas em meio Postgate C e são compostas por uma comunidade selecionada de BRS após longo período de enriquecimento (Figura 5.6).

Ribeiro et al. (2005) estudou a influência da fonte de carbono na adesão anaeróbia de biomassa em espuma de poliuretano utilizando diferentes reatores diferenciais alimentados com proteína, glicose, amido, lipídeos e substratos complexos através de recirculação do meio líquido. Os

resultados obtidos demonstraram que a natureza da fonte de carbono influenciava a dinâmica de adesão.

Isto indica que a fonte de carbono selecionada durante o enriquecimento pode influenciar o processo de adesão da biomassa AUT à espuma de poliuretano, e assim, um estudo mais detalhado do enriquecimento destes microrganismos autóctones utilizando fontes de carbono alternativas e preferenciais para as espécies *Desulfotomaculum* torna-se necessário, uma vez que há possibilidade de que melhores resultados de adesão do que os relatados neste experimento possam ser obtidos.

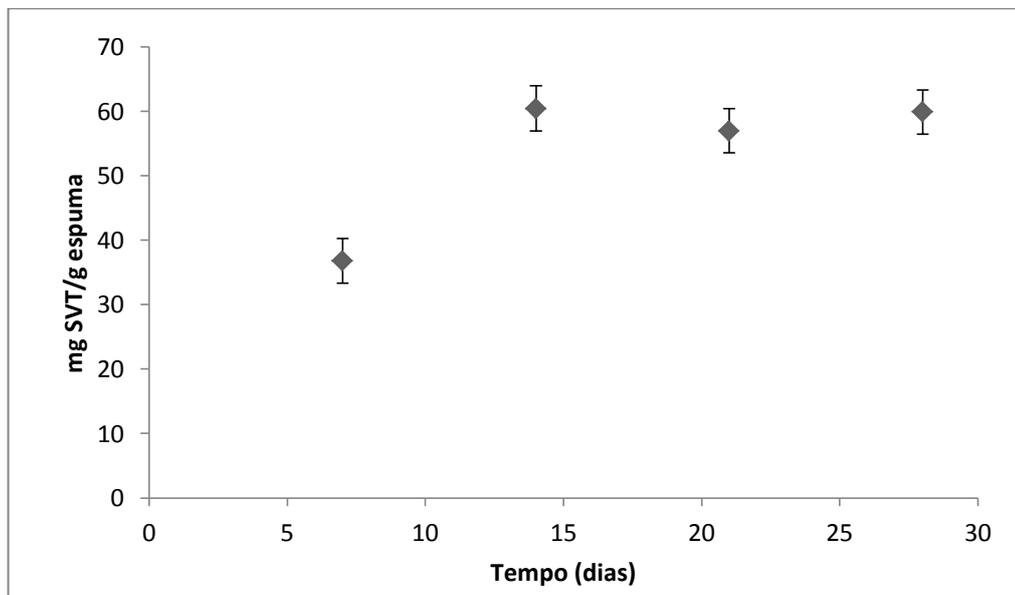


Figura 5.10 - Teste de adesão da biomassa AUT em espuma de poliuretano em Sólidos Voláteis Totais (mg) por massa de material suporte (g). As barras de erro representam a propagação dos erros experimentais.

Fonte: Da autora.

5.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA BIOMASSA AUT EM MEIO POSTGATE C MODIFICADO

As fontes de carbono etanol e formiato foram escolhidas em substituição ao lactato para o enriquecimento em Postgate C modificado nesta etapa do projeto, devido à preferência das espécies *Desulfotomaculum* por esta fonte de carbono, como relatado por Kuever e Rainey (2009). Nos

itens 5.2.1 e 5.2.2, seguem os resultados obtidos para os ensaios utilizando estas fontes de carbono, incluindo o lactato, em condições de neutralidade e pH ácido.

5.2.1 Desempenho dos reatores alterando a fonte de carbono

A remoção de sulfato foi equivalente para os reatores ETA e LAC, enquanto que o reator FOR apresentou remoção inferior, como demonstrado na Tabela 5.4. A máxima remoção de sulfato obtida foi de 46% no reator LAC, 41% no reator ETA e 35% no reator FOR, enquanto que o consumo de DQO foi de 26% para o reator LAC, 22% para o reator ETA e 45% para o reator FOR. Em comparação ao reator LAC, apenas uma ligeira elevação de pH foi observada para os reatores ETA e FOR. Sahinkaya e Yucesoy (2010) encontrou altas eficiências de remoção de sulfato e DQO (92% e 95%, respectivamente) ao substituir o lactato por etanol como doador de elétrons em um reator sulfetogênico. Os resultados mostraram que a alteração da fonte de carbono não afetou negativamente o desempenho do sistema.

Uma remoção de sulfato inferior ao encontrado neste experimento foi observada por Wolicka et al. (2015) durante o estudo da precipitação de minerais em um meio contendo zinco (Zn) em condições de redução de sulfato, empregando comunidades redutoras de sulfato enriquecidas em meio Postgate C modificado, contendo etanol ou lactato como fontes de carbono. A remoção de sulfato sem adição de Zn utilizando etanol como doador de elétrons foi de aproximadamente 30%, enquanto que para o lactato como substrato, a remoção de sulfato obtida foi em torno de 25%.

Wolicka et al. (2014) estudou a redução de sulfato em meio de cultura Postgate C modificado com etanol como fonte de carbono e inoculado com microrganismos autóctones provenientes de solo coletado em vale glacial. Os reatores batelada foram incubados a 4°C durante 8 semanas e os resultados obtidos demonstraram uma remoção de sulfato de 62,5% ao final do enriquecimento.

Tabela 5.4 - Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas durante o enriquecimento para os reatores LAC, ETA e FOR.

Parâmetros	Reator LAC	Reator ETA	Reator FOR
pH Inicial	7,34±0,1	7,41±0,1	7,05±0,1
pH Final	8,07±0,1	7,70±0,1	7,15±0,1
COD/SO ₄ ²⁻	1,07±0,09	1,22±0,10	1,19±0,11
DQO inicial (mg/L)	(4,63±0,09)10 ³	(5,93±0,10)10 ³	(6,16±)10 ³
DQO final (mg/L)	(3,29±0,08)10 ³	(4,44±0,09)10 ³	(3,46±)10 ³
Consumo de DQO Máximo (%)	29±3	25±2	44±2
Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	(4,85±0,38)10 ³	(4,31±0,37)10 ³	(5,17±0,46)10 ³
Concentração Final de Sulfato (mg/L)	(2,30±0,24)10 ³	(3,67±0,30)10 ³	(5,95±0,36)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (%)	46±11	42±10	35±12
Concentração Inicial de Sulfeto (mg/L)	61,6±2,6	60,3±2,8	59,57±2,6
Concentração Final de Sulfeto (mg/L)	556±13	71±12	1±2,3
Máxima Produção de Sulfeto (mg/L)	496±14	139±12	20,54±3,8
NMP/mL	4,0x10 ³	6,8x10 ³	1,2x10 ³
ST final (mg/L)	7811±70	6128±60	16666±136
SVT final (mg/L)	1797±35	512±36	3998±43

Fonte: Da autora.

WU et al. (1991) estudou o papel das BRS no desempenho de grânulos provenientes de um UASB tratando águas residuárias de indústria cervejeira. Na presença de 9 mM (864 mg/L) de concentração de SO_4^{2-} , as BRS não apresentaram um papel significativo no metabolismo do H_2 , formiato e acetato. Apenas 5% do formiato presente foi utilizado para redução de sulfato. Entretanto, uma conversão de etanol de 28% foi observada. Estes resultados demonstraram que enquanto a conversão do etanol foi realizada principalmente pelas BRS, o formiato foi consumido predominante pelas espécies metanogênicas.

A análise da Figura 5.11 nos permite notar que a substituição da fonte de carbono para etanol e formiato resultou na diminuição da fase lag, com duração de aproximadamente de 13 dias para o reator LAC, enquanto que o período de adaptação foi de aproximadamente 3 dias para o reator ETA e 2 dias para o reator FOR. Zhou et al. (2015) conseguiu realizar a partida de biorreatores anaeróbios utilizando lactato, etanol e formiato como fontes de carbono. O melhor doador de elétrons consistiu em etanol, apresentando a menor fase lag e maior taxa de remoção de sulfato. Tsukamoto et al. (2004) também retratou períodos de aclimatação inferiores quando etanol foi utilizado como doador de elétrons para o tratamento da DAM em biorreatores.

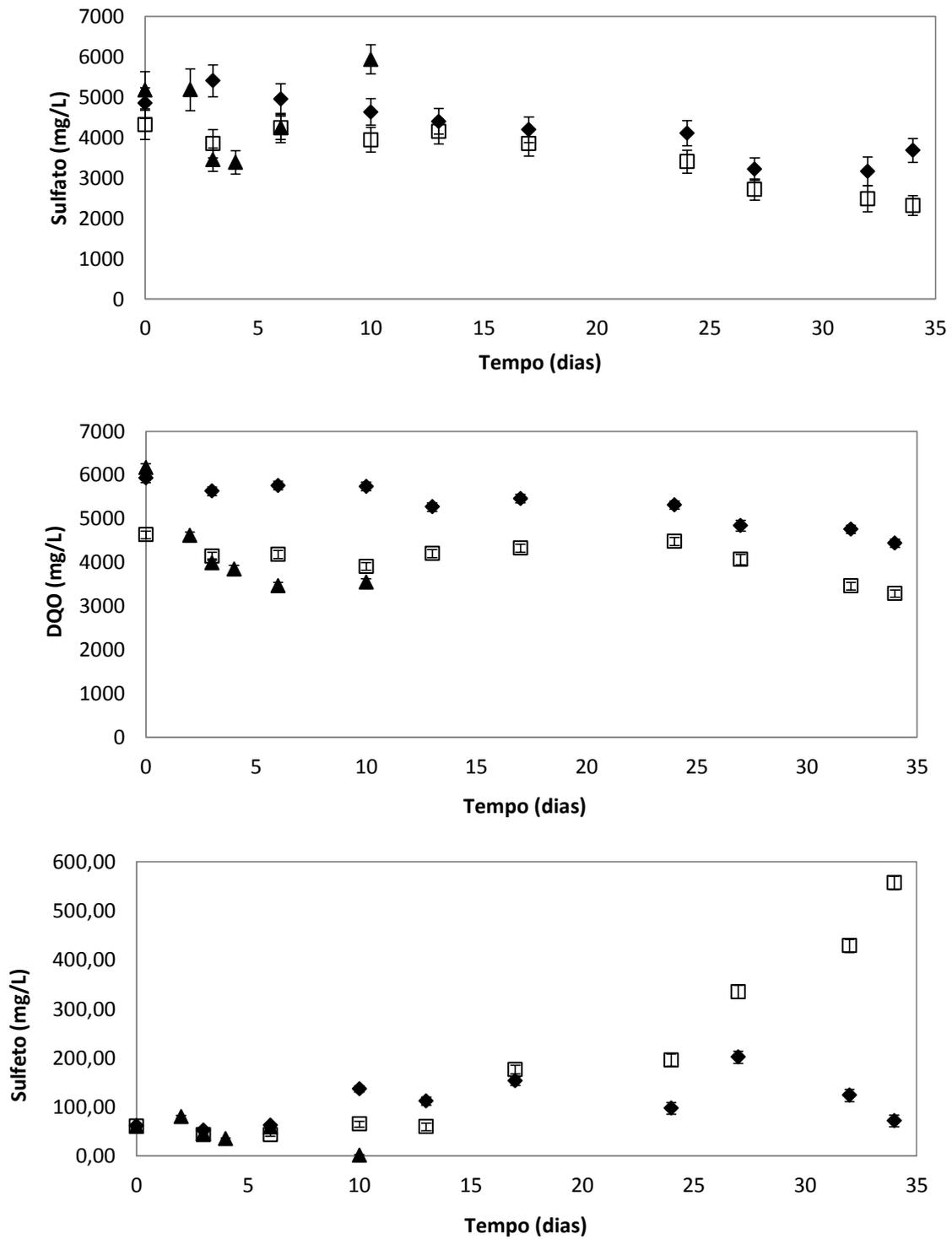


Figura 5.11 - Desempenho dos Reatores ETA (◆), LAC (□) e FOR (▲):

- (a) Consumo de DQO;
- (b) Remoção de Sulfato;
- (c) Produção de Sulfeto.

As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração

Fonte: Da autora.

Considerando a completa oxidação do lactato no reator LAC (Equação 5), a remoção de sulfato de $(2,00 \pm 0,44)10^3$ mg/L resultaria em um consumo de DQO de $(1,33 \pm 0,29)10^3$ mg/L. O consumo de DQO encontrado no experimento foi de $(1,34 \pm 0,13)10^3$ mg/L. Se o etanol fosse completamente oxidado, com demonstrado na Equação 6, para uma remoção de sulfato de $(2,24 \pm 0,25)10^3$ mg/L no reator ETA, um consumo de DQO de $(1,50 \pm 0,35)10^3$ mg/L seria esperado. O consumo de DQO obtido durante o enriquecimento foi de $(1,49 \pm 0,12)10^3$ mg/L. Isto nos permite observar que o consumo de DQO para LAC e ETA foi bem similar ao valor esperado, e demonstra que ao alterar a fonte de carbono para etanol manteve-se o predomínio de um gênero sulfetogênico com capacidade oxidar completamente o substrato.

Rzeczycka e Baszczyk (2005) estudaram o crescimento de BRS em um meio contendo fosfogesso e diferentes fontes de carbono. Uma remoção de sulfato de 1690 mg/L e um consumo de DQO de 1300 mg/L foi observada quando o lactato foi utilizado como fonte de carbono. Para etanol, a redução de sulfato foi de 1380 mg/L e de DQO 1800 mg/L.

Remoções de sulfato similares quando o etanol e o lactato foram usados como doadores de elétrons também foi relatado por Martins et al. (2009), durante a avaliação do efeito destas fontes de carbono na redução de sulfato em BRS resistentes a metais para aplicação na descontaminação da DAM. Em torno de 2000 mg/L de sulfato foram reduzidas, valor similar ao obtido neste experimento. Enquanto praticamente todo lactato foi removido (em torno de 5000 mg/L), apenas uma pequena parcela do etanol foi consumida (aproximadamente 2000 mg/L). Isto não foi observado neste estudo, em que apenas uma parcela tanto do etanol (1490 mg/L) quanto lactato (1340 mg/L) foram consumidas.

Quando o formiato é utilizado como substrato, para uma oxidação completa desta fonte de carbono (Equação 7) com redução de sulfato de $(1,80 \pm 0,59)10^3$ mg/L, um consumo de DQO de $(1,20 \pm 0,40)10^3$ mg/L seria esperado. O consumo de DQO obtido no experimento foi de $(2,70 \pm 0,13)10^3$ mg/L. Como o consumo de DQO superou o esperado para o formiato como fonte de carbono, acredita-se que este tenha sido utilizado como doador de

elétrons para outras vias além da redução de sulfato, como metanogênese (BIJMANS et al., 2008).

Apesar de a mesma quantidade de inóculo ter sido adicionada em todos os reatores, uma concentração final de SVT diferente foi obtida. O reator FOR apresentou a maior concentração de SVT, 3998 mg/L, enquanto que o reator ETA apresentou a menor concentração de SVT, apenas 500 mg/L. Isto demonstra que houve crescimento de um grupo microbiano diverso além das BRS quando o formiato foi utilizado como fonte de carbono (Figura 5.18), já que a remoção de sulfato foi inferior para o reator FOR e consumo de DQO acima do esperado estequiometricamente foi constatada. O menor valor de SVT para etanol em comparação ao lactato como fonte de carbono não alterou a remoção de sulfato, que foi equivalente nestes reatores. Acredita-se assim, que a utilização do etanol como fonte de carbono tenha reduzido a diversidade da população bacteriana presente no reator (Figura 5.18) e favorecido as espécies sulfetogênicas capazes de oxidar completamente a matéria orgânica. Cabe salientar que a oxidação completa do etanol é realizada por um grupo específico de BRS (RODRIGUEZ; ZAIAT, 2011).

É importante salientar que apesar da menor taxa remoção de sulfato ter sido observada no reator FOR, este removeu uma quantidade significativa de sulfato durante o período de enriquecimento (10 dias) em comparação com o período de cultura dos demais reatores LAC e ETA (34 dias). A duração do enriquecimento foi inferior para o reator FOR, pois após este período o meio não permaneceu reduzido. Isto é constatado através da coloração rosa adquirida pelo meio, que indica oxidação do mesmo devido à presença do indicador rezasurina (Figura 5.12), e da redução da concentração de sulfeto observada (Tabela 5.4).



Figura 5.72 - Coloração adquirida pelo reator FOR após 10 dias de enriquecimento. Esta coloração rosa adquirida pelo meio indica que o mesmo não se encontra mais reduzido e é constatada pelo indicador rezasurina.

Fonte: Da Autora.

Martins et al. (2016) estudou a capacidade de produção de H_2 de cepas *Desulfovibrio* empregando meio Postgate C modificado com formiato como fonte de carbono. Constatou-se a presença de uma fase inicial de consumo de sulfato, com duração de aproximadamente 20 horas e com crescimento no número de células. Após esta etapa, iniciou-se a produção de H_2 . Isto pode explicar o crescimento limitado observado durante o período de enriquecimento para o reator FOR, e o alto consumo de sulfato obtido em poucos dias de enriquecimento.

Considerando que a concentração aproximada de sulfato presente na DAM produzida na mina Osamu Utsumi (local de coleta da biomassa AUT) seja de 1550 mg/L, e que o padrão de lançamento de sulfato seja de 250 mg/L (CONAMA, 2005), para todas as fontes de carbono estudadas, esta condição seria atendida, uma vez que a remoção de sulfato foi de aproximadamente 2000 mg/L no reator LAC, 2240 mg/L no reator ETA e 1490 mg/L no reator FOR.

Assim, de acordo com os resultados encontrados, constata-se a viabilidade da utilização de etanol no processo de enriquecimento das BRS em substituição ao lactato, tanto na manutenção de taxas de remoção de sulfato eficientes e que atendem aos padrões de lançamento de sulfato em corpos de recepção, quanto no favorecimento do crescimento principalmente

de espécies sulfetogênicas. Além disto, é importante salientar que esta fonte de carbono, no cenário brasileiro, apresenta grande viabilidade também no aspecto econômico (BERTOLINO et al., 2014).

5.2.1.1 Quantificação das BRS por NMP

Nesta etapa, realizou-se a quantificação das BRS nos reatores LAC, ETA e FOR utilizando a técnica de NMP e selecionou-se a melhor combinação de resultados após 30 dias de cultivo em Postgate C de acordo com a Figura 5.13. Os resultados e combinações selecionadas seguem na Tabela 5.5 abaixo. Cabe salientar que os valores NMP das respectivas combinações escolhidas abaixo constam na Tabela “Índices do NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são utilizados 5 tubos de diluição”, disponível em APHA, 2005.

Tabela 5.5 - Combinações selecionadas e valores de NMP correspondentes para cada reator estudado no ensaio para diferentes fontes de carbono.

Reator	Combinação	NMP/mL	NMP/g SVT
Inóculo	3-4-0	$2,1 \times 10^3$	$1,26 \times 10^6$
LAC	1-1-0	$4,0 \times 10^3$	$2,23 \times 10^6$
ETA	2-1-0	$6,8 \times 10^3$	$1,33 \times 10^7$
FOR	2-3-0	$1,2 \times 10^3$	$3,00 \times 10^5$

Fonte: Da autora.

É possível constatar pela Tabela 5.5 que o maior número de células de BRS por mL e por g SVT ocorreu no reator ETA. O valor NMP/mL neste reator foi similar ao estimado no reator LAC, entretanto foi significativamente superior ao valor NMP/g SVT do reator LAC. Isto explica a eficiência de remoção de sulfato equivalente obtida nestes reatores, e também o valor inferior de SVT encontrado no reator ETA, em comparação ao reator LAC, demonstrando que a população microbiana presente no reator ETA é

representada por um número maior de BRS do que para o reator LAC e que as espécies sulfetogênicas predominaram neste reator.

Para o reator FOR, um valor NMP inferior ao obtido em LAC e ETA foi observado, o que explica a menor remoção de sulfato constatada neste reator. Além disso, como esperado, a biomassa do reator FOR apresentou um número menor de células de BRS em sua composição em comparação aos demais reatores, demonstrando que esta fonte de carbono permitiu o crescimento de outras espécies bacterianas além das sulfetogênicas, explicando o período inferior de duração do enriquecimento, o alto valor de SVT encontrado e o alto consumo de DQO, mais que o esperado de acordo com a estequiometria.

Um estudo feito por Almeida (2005), em sedimento proveniente de mina de urânio localizada em Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil, obtido no mesmo local que a biomassa AUT, demonstrou que a máxima população de BRS encontrada foi de 2,8 NMP/mL. Isto constata que o enriquecimento feito neste experimento em Postage C aumentou consideravelmente o número de BRS, tanto para o lactato, como para o etanol como fonte de carbono.

Jong e Parry (2003), estudou a remoção de sulfato e metais em UASB em escala de bancada utilizando uma população mista de BRS coletada de água de mina tratada em filtro Wetland. A contagem de BRS resultou em valores superiores ao encontrado neste experimento de 2×10^5 a 8×10^8 . Valores de 2×10^4 a 5×10^4 CFU/mL foram relatados por Martins et al. (2011) durante a biorremediação da DAM utilizando como inóculo cultura de BRS proveniente de biorreator alimentado com etanol. O número inferior de células encontradas neste experimento demonstra que a biomassa AUT apresenta uma menor quantidade de BRS quando comparada a grupos não autóctones compostos por um consórcio microbiano, entretanto, a eficiência de remoção não é afetada, como demonstrado na primeira fase deste experimento.

Martins et al. (2011), não conseguiu detectar a presença de BRS em áreas de mineração, entretanto, um alto número destes microrganismos foi relatado em lodo de estações de tratamento de água residuária ($1,8 \times 10^7$

CFU/g e $5,3 \times 10^6$ CFU/g). Em amostras de microrganismos autóctones, provenientes de amostras de solo e sedimentos, valores inferiores foram encontrados ($2,3 \times 10^4$ CFU/g e 5×10^3 CFU/g, respectivamente).

Os estudos feitos por Almeida (2005) e Martins et al. (2011) demonstraram a baixa quantidade de BRS presentes nas áreas de mineração, decorrentes das condições extremas de pH encontradas na DAM, demonstrando a importância do processo de enriquecimento destes microrganismos.

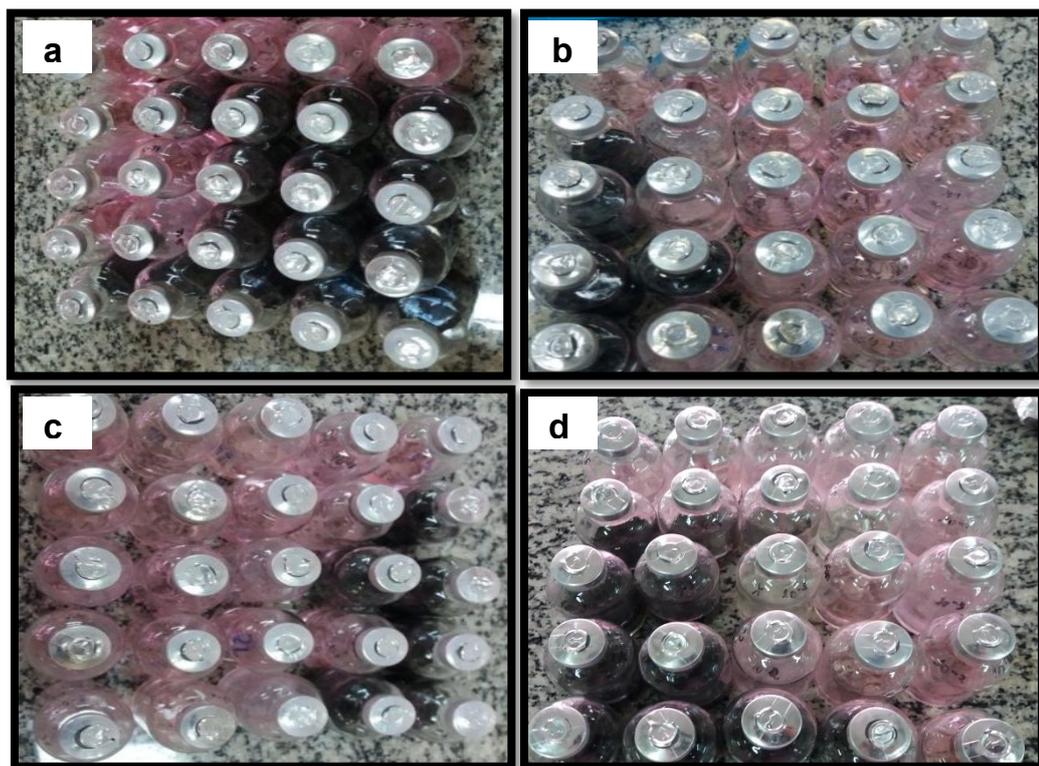


Figura 5.13 - Fotos dos frascos de antibiótico utilizados para o experimento NMP após 30 dias de crescimento e respectivas combinações de tubos positivos e negativos (a) Inóculo, (b) LAC, (c) ETA (d) FOR.

Fonte: Da autora.

5.2.2 Desempenho dos reatores alterando o pH

Foi possível obter remoção de sulfato em pH ácido para todas as fontes de carbono estudadas, como pode ser observado nas Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 seguintes. Para o formiato como fonte de carbono (Tabela 5.6), foi obtida remoção de sulfato de 38% para o reator FOR 3, 39% para o reator FOR 4 e

19% para o reator FOR 6. O consumo de DQO foi de 22% para FOR 3, 30% para FOR 4 e 17% para FOR 6. Apenas foi observado elevação significativa de pH para o reator FOR 6 e para este, o pH foi medido apenas no início e final do enriquecimento. Para o reator FOR 5 não ocorreu redução do meio, e por isso este não consta na Tabela 5.6 seguinte e na Figura 5.14.

Tabela 5.6 - Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas para a fonte de carbono formiato durante o enriquecimento em pH ácido.

Parâmetros	Reator FOR 3	Reator FOR 4	Reator FOR 6
pH Inicial	2,89±0,1	4,02±0,1	-
pH após Inoculação	2,65±0,1	4,15±0,1	6,10±0,1
pH Final	2,86±0,1	4,24±0,1	8,74±0,1
COD/SO ₄ ²⁻	1,15±0,10	1,02±0,08	1,14±0,08
DQO inicial (mg/L)	(4,57±0,12)10 ³	(5,31±0,13)10 ³	(4,88±0,13)10 ³
DQO final (mg/L)	(3,95±0,09)10 ³	(3,97±0,09)10 ³	(4,07±0,09)10 ³
DQO estequiométrica*	(1,02±0,27)10 ³	(1,35±0,41)10 ³	(0,56±0,30)10 ³
Máximo Consumo de DQO (mg/L)	(1,01±0,15)10 ³	1,62±0,16)10 ³	(0,81±0,16)10 ³
Consumo de DQO Máximo (%)	22±3	30±3	17±3
Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	(4,02±0,33)10 ³	(5,22±0,38)10 ³	(4,30±0,29)10 ³
Concentração Final de Sulfato (mg/L)	(4,47±0,32)10 ³	(3,47±0,40)10 ³	(4,11±0,30)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (mg/L)	(1,53±0,41)10 ³	(2,02±0,51)10 ³	(0,56±0,30)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (%)	38±11	39±10	19±10
Concentração Inicial de Sulfeto (mg/L)	46,2±2,6	49,2±2,6	55,2±2,6
Concentração Final de Sulfeto (mg/L)	3,8±4,6	1,0±4,6	8,6±4,7
ST final (mg/L)	7632±67	15843±129	16488±135
SVT final (mg/L)	2008±31	3256±37	3478±40

*A DQO estequiométrica foi calculada por meio da Equação 7, e indica a remoção de DQO esperada de acordo com a estequiometria desta reação.

Fonte: Da Autora.

Considerando a estequiometria para a completa oxidação do formiato de acordo com a Equação 7, com a redução do pH, os valores de consumo de DQO se aproximaram do valor esperado estequiometricamente, principalmente para o reator FOR 3 (Tabela 5.6). Acredita-se, portanto, que a redução do pH tenha desfavorecido o consumo desta fonte de carbono por outras vias além da redução de sulfato. Outro fator que corrobora esta afirmação e demonstra uma diminuição da biomassa não sulfato redutora presente neste reator ao final do enriquecimento, consiste na redução do valor SVT encontrado experimentalmente (Tabela 5.6).

Almeida (2005) relatou que as BRS concorrem com as metanogênicas por substratos comuns, dentre estes estão o hidrogênio, formiato e acetato. Entretanto, as espécies metanogênicas que são encontradas em reatores tratando DAM em pH próximo a neutralidade, são sensíveis a redução do pH e as BRS acabam predominando nesta competição (BIJMANS et al., 2014; O'FLAHERTY et al., 1998; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). Isto pode ter auxiliado a redução da biomassa presente nos reatores FOR 4 e FOR 3.

Para o etanol como fonte de carbono (Tabela 5.7), a remoção de sulfato foi de 29% para o reator ETA 6, 7% para o reator ETA 4 e 18% para o reator ETA 3. Esta remoção de sulfato ocorreu já nos primeiros 7 dias de enriquecimento para o reator ETA 6 e ETA 3 (Figura 5.15). O consumo de DQO observado foi de 24% para ETA 6, 1% para ETA 4 e 5,5% para ETA 3. O reator ETA 4 permaneceu com o meio reduzido apenas durante 13 dias de enriquecimento, quando obteve a máxima remoção de sulfato e isto explica seu valor inferior em comparação as demais reatores, apesar dos valores de pH estarem próximos a neutralidade.

Para o reator ETA 3, constatou-se uma diminuição do pH ao longo do enriquecimento, o que não foi observado para os reatores ETA 4 e ETA 6. Segundo Barbosa (2009), os compostos que são produzidos durante a metabolização do etanol e redução do sulfato pelas BRS influenciam o pH do meio. Quando o etanol é completamente oxidado a CO_2 , observa-se a elevação do pH devido a geração de alcalinidade (Equação 6). Entretanto, quando há degradação incompleta do etanol pelas BRS (Equação 12),

acetato pode ser produzido, e este acúmulo, pode alterar as condições de pH para valores levemente ácidos.

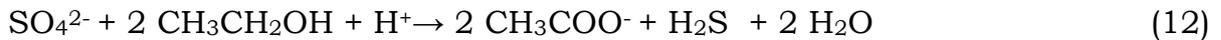


Tabela 5.7 - Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas para etanol como fonte de carbono durante o enriquecimento em pH ácido.

Parâmetros	Reator ETA 3	Reator ETA 4	Reator ETA 6
pH Inicial	2,7±0,1	3,81±0,1	6,55±0,1
pH após Inoculação*	5,97±0,1	6,18±0,1	6,78±0,1
pH Final	5,45 ±0,1	6,75±0,1	6,94±0,1
COD/SO ₄ ²⁻	0,95±0,09	1,06±0,09	1,00±0,08
DQO inicial (mg/L)	(4,58±0,13)10 ³	(4,16±0,13)10 ³	(5,05±0,12)10 ³
DQO final (mg/L)	(4,41±0,09)10 ³	(3,69±0,09)10 ³	(4,12±0,09)10 ³
DQO Estequiométrica*	(0,47±0,33)10 ³	(0,35±0,28)10 ³	(1,04±0,32)
Consumo de DQO Máximo (mg/L)	(0,26±0,13)10 ³	(0,47±0,15)10 ³	(1,21±0,15)10 ³
Consumo de DQO Máximo(%)	5,5±3	9,6±3	24±3
Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	(5,29±0,41)10 ³	(3,95±0,33)10 ³	(4,59±0,39)10 ³
Concentração Final de Sulfato (mg/L)	(4,85±0,33)10 ³	(3,68±0,29)10 ³	(6,07±0,38)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (mg/L)	(0,7±0,5)10 ³	(0,52±0,42)10 ³	(1,55±0,49)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (%)	18±13	7±6	29±9
Concentração Inicial de Sulfeto (mg/L)	47,2±2,6	47,7±2,6	45,7±2,6
Concentração Final de Sulfeto (mg/L)	13,1±2,4	13,5±4,7	47,0±2,6
ST final (mg/L)	7384±65	6100±56	5928±55
SVT final (mg/L)	2186±33	812±29	724±28

*A DQO estequiométrica foi calculada por meio da Equação 6, e indica a remoção de DQO esperada de acordo com a estequiometria desta reação.

Fonte: Da Autora.

Sahinkaya e Yuceso (2010) estudou o tratamento de água residuária ácida contendo cobre e zinco em reator anaeróbio sulfetogênico

compartimentado. Para pH em torno de 6,0 e 6,5 e, ausência de metais, aproximadamente 1200 mg/L de etanol foram removidas, valor similar ao encontrado no reator ETA 6 (Tabela 5.7).

Inversalmente ao observado nos reatores FOR, a diminuição do pH do meio acarretou um aumento no SVT dos reatores ETA. Este aumento foi mais significativo no reator ETA 3 (Tabela 5.7). De acordo com Sánchez-Andrea et al. (2014), o pH, bem como o tipo de inóculo e substrato apresentam um efeito importante na composição da comunidade microbiana em um reator. Enquanto o pH afeta a atividade de diferentes microrganismos, o tipo de substrato influencia a complexidade destas comunidades. Acredita-se assim, que a redução do pH para valores moderadamente ácidos quando o etanol foi utilizado como substrato (Reator ETA 3), não tenha favorecido as espécies sulfetogênicas e por isso acarretado um aumento em outras espécies neste reator e, conseqüentemente, na quantidade de biomassa. A análise da Figura 5.18 corrobora esta afirmação e mostra que a comunidade de bactérias só foi alterada no reator ETA 3, no reator ETA 4 esta não foi impactada.

Diversos trabalhos relatam o tratamento de DAM utilizando etanol como doador de elétrons com redução gradativa do pH, sem alteração da eficiência de remoção de sulfato, mostrando que a biomassa pode se adaptar a estas condições após inoculada ao reator (GALLEGOS-GARCIA et al., 2009; SAHINKAYA;YUCESO, 2010; VIEIRA et al., 2016). Uma alternativa para esta significativa redução nas taxas de remoção de sulfato durante o enriquecimento em pH ácido para a biomassa AUT utilizando etanol como fonte de carbono, seria o enriquecimento desta em pH próximo de 7,0, valor ideal para as BRS (RAMPINELLI et al., 2008) e redução do pH apenas após inoculação desta em reatores sulfetogênicos para tratamento de DAM, como relatado por Martins et al. (2011) e Bai et al. (2014).

Tsukamoto et al. (2004) adaptou as BRS a diminuição do pH utilizando etanol como fonte de carbono em colunas para tratamento da DAM. O pH foi reduzido progressivamente até 3,0. Constatou-se que a redução do pH afetava a eficiência dos biorreatores contendo BRS e que devido a isto, uma fonte de alcalinidade seria necessária para aumentar o

pH do afluente, principalmente para valores de pH inferiores a 3,0. Independente do tipo de reator utilizado para redução de sulfato, águas residuárias ácidas são diluídas quando entram nos reatores, e assim, quando a taxa de produção de alcalinidade é superior à taxa de aumento da acidez, não ocorre diminuição do pH e assim, a atividade das BRS não é afetada (RAMPINELLI et al., 2008).

Segundo SUN et al. (2016), o etanol é um composto fermentável importante e que pode ser rapidamente consumido tanto pelas BRS como pelas bactérias fermentativas. A efetividade na utilização do etanol pelas BRS pode afetar diretamente a eficiência de remoção de sulfato no sistema. Isto pode explicar a diminuição do desempenho dos reatores ETA para pH abaixo de 6,78, onde provavelmente não houve favorecimento das espécies sulfetogênicas. Outro fator importante é que o acúmulo de acetato também é um fator limitante para eficiência da remoção de sulfato e sua degradação por via sulfetogênica não é observada mesmo quando há presença de sulfato em excesso (LENS et al., 2003).

Para o lactato como doador de elétrons, a remoção de sulfato obtida durante o enriquecimento em pH ácido foi de 32% e 43% para os reatores LAC 3 e LAC 4, respectivamente. O consumo de DQO foi de 11% e 22%. Não ocorreu aumento significativo do pH do meio para o reator LAC 3 e foi observada redução do pH do meio para o reator LAC 4.

Verma et al. (2015) utilizou cultura mista de BRS para tratar água residuária sintética contendo Cr(VI) e empregou meio Postagte C contendo lactato como fonte de carbono para enriquecimento destes microrganismos. Foi demonstrado que o pH afetava a concentração de íons sulfeto, como observado neste trabalho (Figura 5.16c). Entretanto, para pH 5, valores similares de remoção de sulfato foram obtidos quando comparado à máxima eficiência reportada em pH 7,0 (41% e 49,9%, respectivamente)

Jong e Parry (2006) operaram um reator anaeróbio horizontal de leito fixo contendo BRS em condições ácidas e demonstraram que estas foram capazes de suportar a remoção de sulfato em valores de pH de 6,0, 5,0, 4,5, 4,0 e 3,5. A redução do pH ocorreu gradativamente durante 75 dias. Para pH de 5,01, 73,5%, (2204 mg/L) de máxima remoção de sulfato foi obtida, valor

equivalente ao relatado durante o enriquecimento neste estudo (43% e 2000 mg/L de remoção de sulfato).

Para o pH de 3,5 remoções de sulfato inferiores ao relato neste experimento (110,5 mg/L) foram obtidas por Jong e Parry (2006), sendo que uma máximo de 6,2% (188,7 mg/L) de sulfato foi removido nestas condições. Além disso, foi relatado uma singela elevação do pH de 3,5 para 4,25, a qual foi acompanhada por uma pequena produção de sulfeto de 1mmol/L (34mg/L), situação que não foi mantida, acarretando a redução da concentração de sulfeto e o pH do meio, obtendo um pH final de 3,58. Para o reator LAC 3, algo semelhante foi observado, como pode ser constatado na figura 5.16, o pH máximo obtido foi 3,77 e a máxima concentração de sulfeto após inoculação foi de 6 mg/L.

Tabela 5.8 - Parâmetros obtidos por meio de análises físico-químicas para lactato como fonte de carbono durante o enriquecimento em pH ácido.

Parâmetros	Reator LAC 3	Reator LAC 4
pH Inicial	3,03±0,1	3,96±0,1
pH após inoculação	3,60±0,1	5,12 ±0,1
pH Final	3,68±0,1	4,74±0,1
COD/SO ₄ ²⁻	1,15±0,10	1,27±0,12
DQO inicial (mg/L)	(3,94±0,12)10 ³	(4,93±0,12)10 ³
DQO final (mg/L)	(4,43±0,09)10 ³	(4,31±0,09)10 ³
DQO Estequiométrica*	(0,76±0,25)10 ³	(1,33±0,29)10 ³
Consumo de DQO Máximo (mg/L)	(0,47±0,13)10 ³	(1,21±0,17)10 ³
Consumo de DQO Máximo (%)	11±3	22±3
Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	(3,47±0,31)10 ³	(3,76±0,33)10 ³
Concentração Final de Sulfato (mg/L)	(3,74±0,29)10 ³	(5,47±0,36)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (mg/L)	(1,15±0,38)	(2,00±0,43)10 ³
Máxima Remoção de Sulfato (%)	30±11	43±9
Concentração Inicial de Sulfeto (mg/L)	48,7±2,6	48,19±2,6
Concentração Final de Sulfeto (mg/L)	1,0±2,3	3,2±2,3
ST final (mg/L)	10068±85	9368±80
SVT final (mg/L)	2684±35	1864±31

*A DQO estequiométrica foi calculada por meio da Equação 5, e indica a remoção de DQO esperada de acordo com a estequiometria desta reação.

Fonte: Da Autora.

De acordo com a estequiometria da Equação 5, para o Reator LAC 3, um consumo de DQO abaixo do esperado foi encontrado (Tabela 5.8). Isto demonstra que deve ter ocorrido acúmulo de acetato no mesmo devido à atuação de BRS de oxidação incompleta, conforme Equação 11 (BERTOLINO et al., 2012). Segundo Sánchez-Andrea et al. (2014) para pH inferior a 4,5 (no reator LAC 3 o pH é de 3,6), o ácido acético predomina ao invés do lactato, e este é tóxico para maioria dos microrganismos, incluindo bactérias acidofílicas. Isto provavelmente deve ter afetado também a eficiência de remoção de sulfato neste reator.



Para o Reator LAC 4, uma remoção de sulfato equivalente ao relatado em valores de pH próximos a neutralidade foi obtida. Entretanto, um valor de consumo de DQO experimental ligeiramente inferior ao valor esperado pela estequiometria (Tabela 5.8) foi observado. Isto constata que provavelmente também ocorreu acúmulo de acetato neste reator, acarretando a redução do pH do meio.

A eficiência de remoção de sulfato nos reatores LAC foi equivalente em pH moderadamente ácido e reduzida em baixo pH em comparação a valores próximos a neutralidade (46%-2000mg/L, 57%-2240 mg/L em pH 7,41 e 6,65, respectivamente e, 43%-2000mg/L, 30%-1150mg/L e em pH 5,12 e 3,60, respectivamente). Para os reatores ETA, uma singela redução no pH acarretou diminuição no desempenho destes reatores (41% em pH 7,34 e, 29%, 7% e 18% em pH 6,78, 6,18 e 5,97 respectivamente) e significativa alteração na comunidade bacteriana para o reator ETA 3, como reportado na Figura 5.18. Esta redução na eficiência com a diminuição do pH era esperada, visto que a maioria das BRS crescem melhor em pH na faixa de 6 a 8, podendo até ser desativadas em valores superiores ou inferiores a estes limites (VERMA et al., 2015).

Barbosa (2009) cultivou BRS provenientes de sedimento de lagoa localizada em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, em meio Postgate C modificado em pH 5,5 e 7, para etanol e lactato como fontes de carbono e,

constatou também que o crescimento e remoção de sulfato é afetado negativamente em condições moderadamente ácidas. Para lactato como fonte de carbono, uma remoção de sulfato de 1250 mg/L, ligeiramente inferior ao relatado neste experimento, foi constatada em pH 5,5. Para o etanol como doador de elétrons uma redução de sulfato de apenas 460 mg/L foi relatada em pH 5,5, mostrando que o crescimento das BRS não foi favorecido em valores de pH abaixo de 7 para este doador de elétrons (A remoção em pH 7 foi de 1500 mg/L). Isto corrobora o fato de que em pH abaixo de 6,78 as espécies sulfetogênicas não foram favorecidas quando o etanol foi utilizado como fonte de carbono neste experimento.

A diminuição na eficiência de remoção nos reatores alimentados com lactato em pH ácido decorre provavelmente da diminuição da concentração de lactato e aumento deste em sua forma ácida (ácido láctico). Segundo Acerbi (2015), abaixo de pH 4 observa-se a prevalência da forma ácido láctico. Para o reator LAC 3, cujo pH é 3,6, 65% do lactato encontra-se em sua forma ionizada, enquanto que 89% do acetato formado, encontra-se na forma de ácido acético. Assim, esta formação de ácido láctico juntamente com a formação de ácido acético, deve ter acarretado a redução do desempenho deste reator, visto que na forma ácida, estes podem perpassar a membrana celular e acidificar o citoplasma das células, causando assim a redução do desempenho das BRS e demais microrganismos presentes no reator. Isto acarretou a presença de um excesso de substrato que não pôde ser utilizado pelas comunidades microbianas presentes neste reator.

Isto deve ter afetado também o enriquecimento do reator LAC 4, visto a máxima remoção de sulfato ocorreu nos primeiros 7 dias de enriquecimento e, após este período, uma elevação na concentração de sulfato e brusca diminuição de sulfato foi observada (Figura 5.16), indicando o possível efeito tóxico destas formas ácidas não dissociadas, inibindo a atividade das BRS, como relatado também por Jong e Parry (2006). Nestas condições, 6,8% do lactato encontra-se na forma de ácido láctico, enquanto que 24% do acetato encontra-se na forma de ácido acético.

Em pH acima de 6, apenas a presença de lactato é observada (ACERBI, 2015). Isto pode explicar o fato de que a redução de pH do enriquecimento

para 6,65 não tenha afetado a eficiência de remoção de sulfato e tenha mantido o favorecimento das espécies sufetogênicas. Isto não ocorreu quando o etanol foi utilizado como fonte de carbono.

Almeida (2005) encontrou valores de pH que variaram de 3,0 a 4,5, aproximadamente, em sedimento da cava de mina de urânio localizada em Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil, de onde a biomassa AUT é proveniente, explicando a resistência apresentada por estas BRS à redução do pH. Porém, como o inóculo AUT utilizado neste estudo encontrava-se a um longo período de tempo sendo cultivado em Postgate C e pH 7,0, isto pode ter acarretado a diminuição da eficiência de remoção quando o pH foi reduzido para valores ácidos. Outro fator para a redução do desempenho destes reatores é que as BRS nesta faixa de pH poderiam estar presentes inicialmente na DAM, porém inativas e o enriquecimento previamente realizado ativou estas BRS (FORTIN et al., 2000).

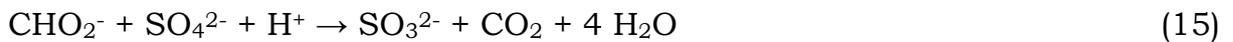
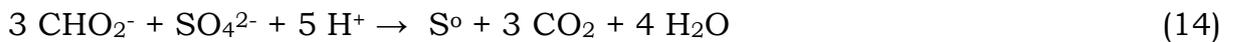
Martins et al. (2009) não conseguiu detectar a presença de BRS durante o enriquecimento em reatores batelada utilizando etanol e lactato como fontes de carbono, quando o inóculo utilizado foi proveniente de amostras de área de mineração. A remoção de sulfato também não foi observada. Quando as amostras de solo foram adicionadas, o pH do meio de enriquecimento foi reduzido de 6,7 para 3,7 e 4,5 e devido a isto foi observada dificuldade crescimento de microrganismos autóctones em condições ácidas.

No estudo feito por Rampinelli et al. (2008), espécies de BRS provenientes de local contendo DAM (pH 2,4) capazes de crescer em pH inicial 5,5 foram identificadas e isoladas, apresentando taxas de similares de remoção de sulfato em pH inicial 7,0 e 5,5. Isolar BRS de locais contendo DAM representa um meio efetivo para selecionar BRS tolerantes à acidez, pois estes são habitats para microrganismos com fisiologias específicas para crescimento em condições extremas.

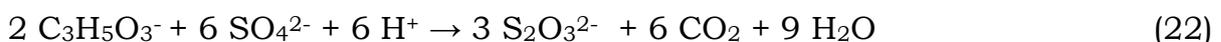
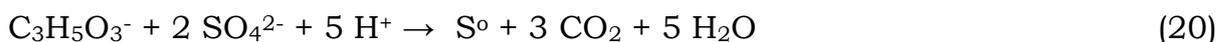
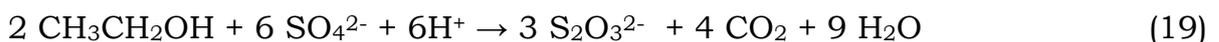
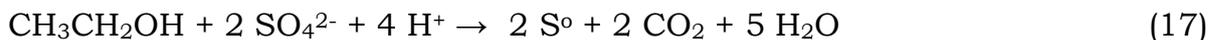
Para os reatores contendo formiato, uma redução de sulfato equivalente foi obtida nos reatores com pH 2,65, 4,15 e 7,05 (34% para pH 7, 38% para pH 4 e 3) e, um valor inferior para pH 6 (18% em pH 4), mostrando que a redução do pH para valores ácidos não afetou o

desempenho das BRS. Entretanto, em valores moderadamente ácidos, ou não ocorreu redução do meio (Reator FOR 5) ou a eficiência de remoção de sulfato foi reduzida (Reator FOR 6). Em todos os casos, não foi observado alta produção de sulfeto (Figura 5.14 c), demonstrando que o formiato como fonte de carbono não favoreceu as espécies sulfetogênicas, independentemente do pH estudado.

Assim, vias alternativas podem ter sido utilizadas pelas BRS durante a metabolização desta matéria orgânica, que resultaram em diferentes produtos de reação ao invés do sulfeto, como por exemplo, sulfito, enxofre elementar e tiosulfato, como demonstrado nas equações 14, 15 e 16:



A análise das Figuras 5.15 e 5.16, nos mostram que a redução do pH diminuiu significativamente a produção de sulfeto nos reatores ETA e LAC. Isto demonstra que a redução do pH não favoreceu as espécies sulfetogênicas nestes reatores, e vias alternativas podem ter sido utilizados para consumo do sulfato, como vias incompletas (Equação 12 e 13), e possível redução do sulfato a sulfito, enxofre elementar ou tiosulfato, como demonstrado nas equações 17 a 22:



Esta utilização de rotas alternativas pode ter sido causada pela alta toxicidade da molécula H_2S , que predomina em pH inferior a 7. Nesta forma, a molécula de sulfeto pode passar livremente para a membrana celular,

podendo ter os mesmos efeitos inibitórios as BRS que aqueles causados por ácidos orgânicos. Isto poderia acarretar a redução das taxas de crescimento e a diminuição da diversidade populacional, o que foi observado neste experimento, como constatado na Figura 5.18, que apresenta o DGGE para o domínio Bacteria nos reatores estudados (BIJMANS et al., 2008).

Church et al. (2014) estudou a remoção de sulfato em pH ácido através do cultivo de BRS proveniente de sedimento de local contendo DAM variando o pH de 4 a 7,5. Em condições de baixo pH foi identificada a presença de enxofre elementar, juntamente com uma baixa produção de sulfeto, inferior ao relatado neste experimento, apenas 0,55 mg/L em pH 4,35 e 0,2 mg/L em pH 3,97. Nestas condições, também não foi constatada elevação significativa no pH.

Lee et al. (2014) retratou a presença das espécies sulfeto e tiosulfato após o cultivo de BRS. A remoção do sulfato ocorreu já em dois dias de experimento, período em que foi constatado produção de sulfeto. Detectou-se também um aumento na concentração de tiosulfato, enquanto que a presença de sulfito não foi reportado.

Os resultados obtidos nesta etapa demonstram que a melhor fonte de carbono a ser utilizada durante o enriquecimento em condições de acidez consiste no formiato, uma vez que a eficiência de remoção de sulfato não foi afetada pela redução do pH. Entretanto, é importante salientar que estas condições não favoreceram o crescimento de espécies sulfetogênicas, tendo sido utilizadas vias alternativas pelas BRS para redução do sulfato. Desta forma, acredita-se que o enriquecimento em condições de neutralidade seja a alternativa mais eficaz para obter uma biomassa autóctone com viabilidade para aplicação no tratamento da DAM em reatores sulfetogênicos.

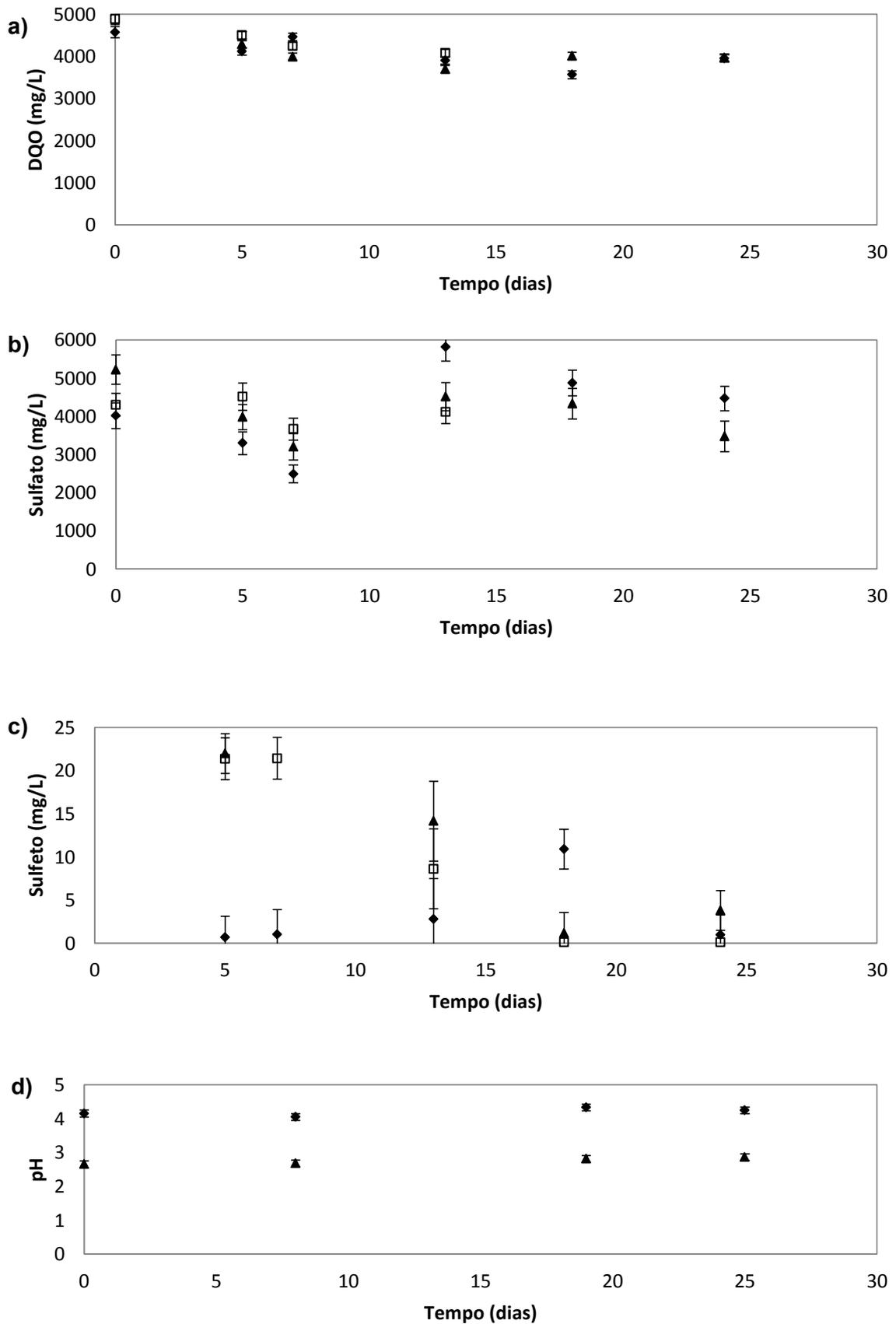


Figura 5.14 - Desempenho dos Reatores FOR 6 (□), FOR 4 (◆) e FOR 3 (▲): (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto (d) pH. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.

Fonte: Da autora.

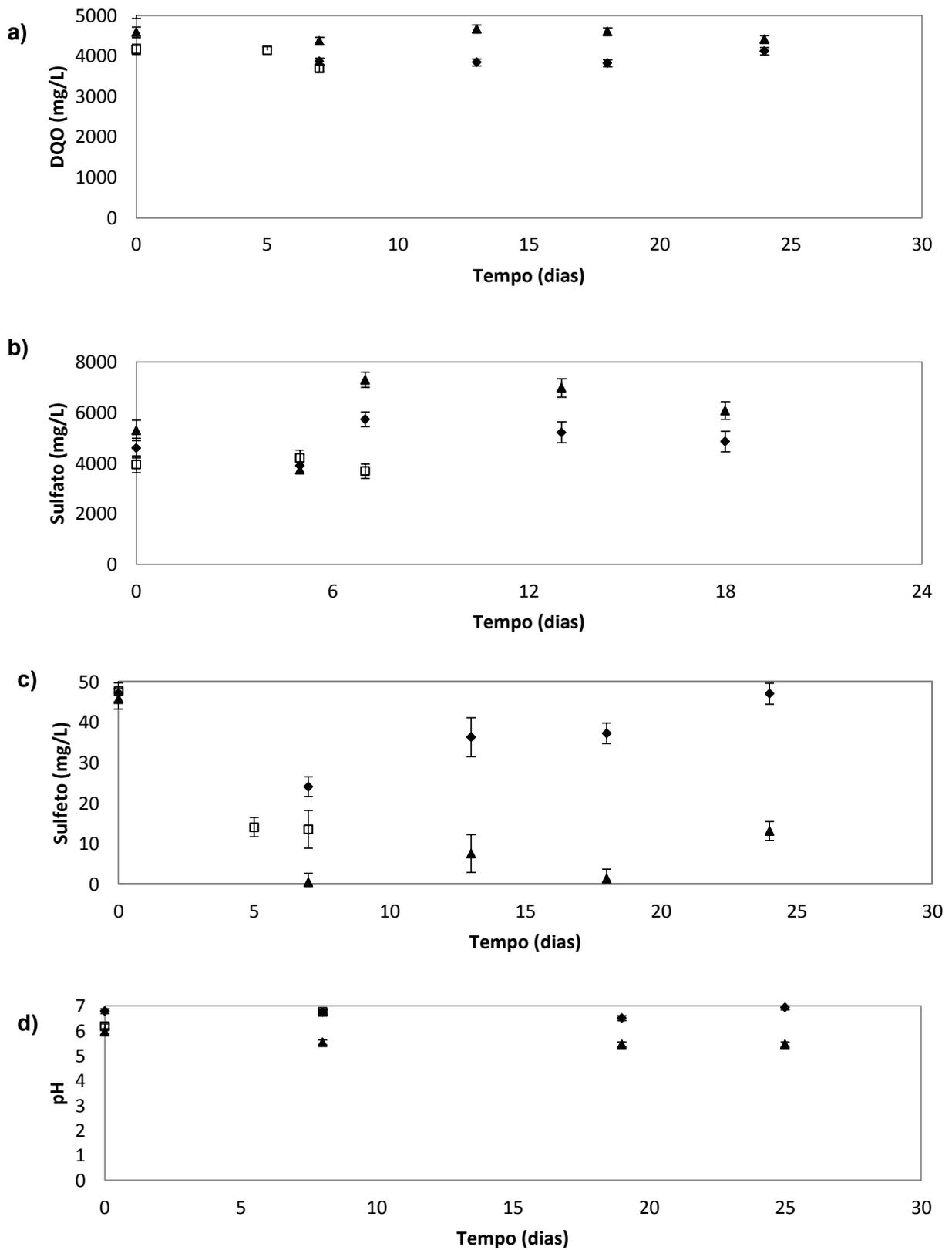


Figura 5.15 - Desempenho dos Reatores ETA 6 (◆), ETA 4(□), e ETA 3 (▲) (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto, (d) pH. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.

Fonte: Da autora.

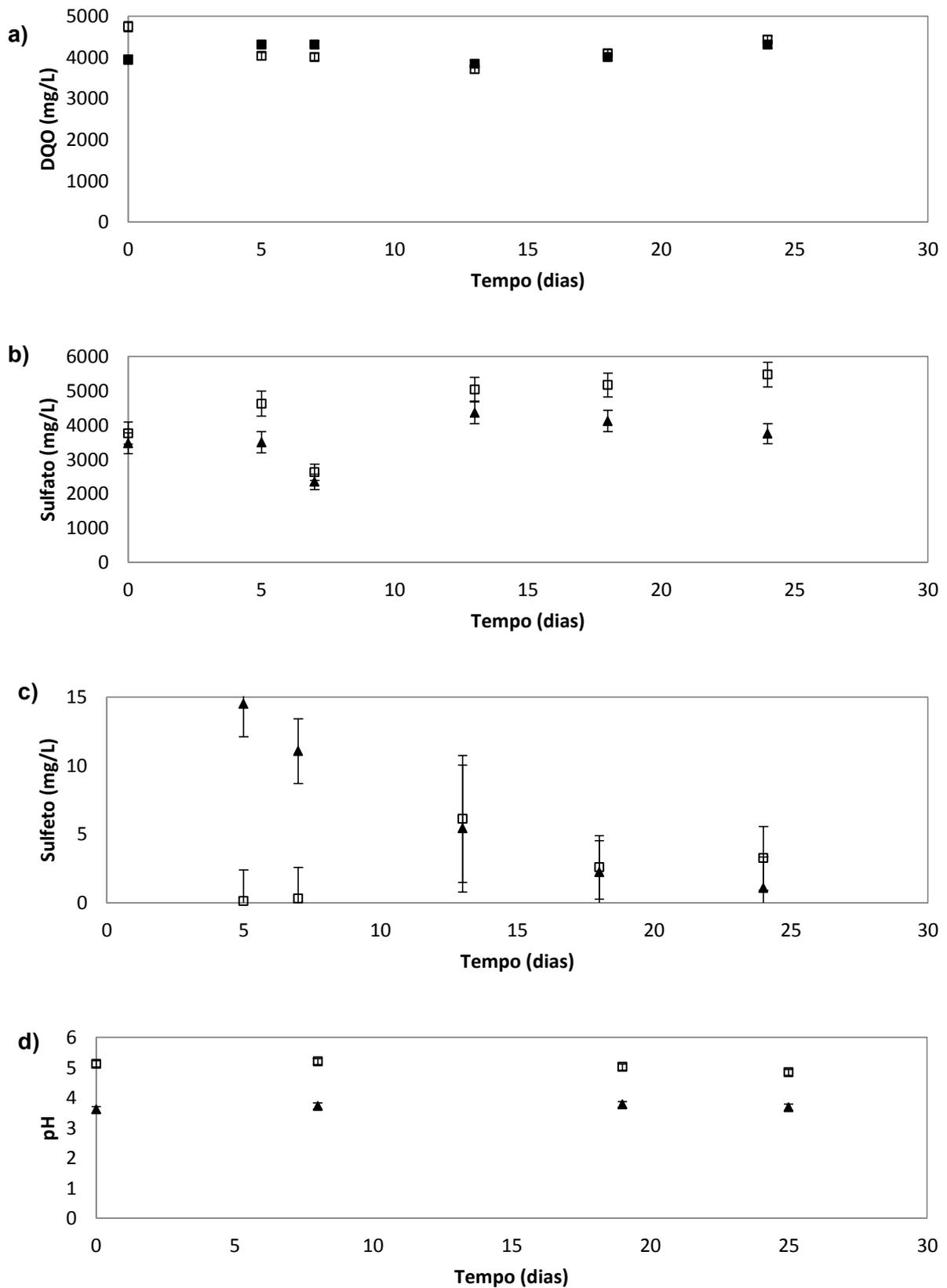


Figura 5.16 - Desempenho dos Reatores LAC 4 (□) e LAC 3 (▲): (a) Consumo de DQO, (b) Remoção de Sulfato, (c) Produção de Sulfeto (d) pH. As barras de erro correspondem ao erro da curva de calibração.

Fonte: Da autora.

5.2.3 Estudo da Comunidade Microbiana nos enriquecimentos em Postgate C modificado

Foi possível amplificar fragmentos de DNA das amostras previamente submetidas à extração de DNA de todos os reatores estudados nas Fases 2 e 3 (Figura 5.17). É possível constatar a diminuição da intensidade das bandas amplificadas para o Domínio Bacteria nos reatores submetidos à redução do pH, principalmente para os reatores ETA 3 e LAC 3, onde as bandas ficaram bem fracas. Devido a este produto de PCR ruim, provavelmente decorrente da baixa quantidade de DNA presente nestas amostras como efeito da redução do pH, foi necessário adicionar maiores quantidades de DNA amplificado destas para possibilitar o estudo da diversidade bacteriana pela técnica do DGGE.

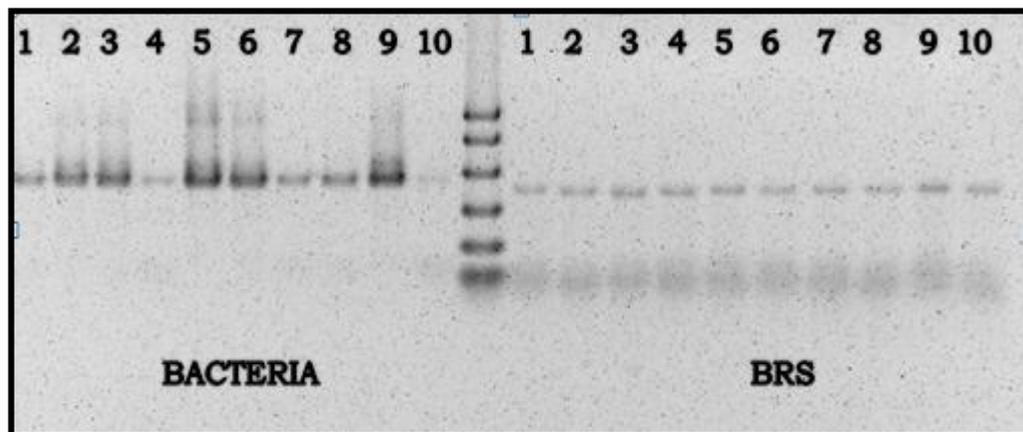


Figura 5.17 - Imagem negativa da eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% para o Domínio *Bacteria*: gene bacteriano rRNA 16 S e para o grupo das Sulfatorredutoras: gene *dsrB*. 1- ETA 7; 2- ETA 6; 3- ETA 4; 4-ETA3; 5.FOR7; 6-FOR6; 7-FOR4; 8-FOR3;9-LAC4;10-LAC3.

Fonte: Da autora.

Diferentes comunidades bacteriana foram observadas entre os reatores estudados (Figuras 5.18 e 5.19), mostrando que a fonte de carbono assim como o pH do meio afeta consideravelmente a população microbiana presente nos reatores, como reportado por Zhou et al. (2015). Segundo este estudo, diferentes grupos bacterianos podem se tornar dominantes em

biorreatores submetidos a diferentes condições, apesar do mesmo inóculo ser utilizado.

Os reatores FOR 3, FOR 4, LAC 3 e ETA 3 apresentaram 58% de similaridade entre si, e apenas 23% de similaridade com os demais reatores ETA, FOR (pH inicial próximo a 7), FOR 6, ETA 6 e ETA 4, demonstrando que o pH do meio afetou significativamente a população bacteriana, independente da fonte de carbono estudada.

Para os reatores FOR, foi observada alta similaridade bacteriana entre os reatores com baixo pH, FOR 4 e FOR 3 (71,4%) e, os reatores próximos a neutralidade, FOR e FOR 6 (77,1%). Para os reatores ETA, 61,8% de similaridade foi observada entre os reatores ETA 4 e ETA 6 e apenas 35 % de similaridade com o reator ETA. O reator LAC 3 apresentou uma alta similaridade de 77% com o reator ETA 3.

Observou-se uma significativa diminuição da diversidade bacteriana com a redução do pH (Figura 5.18). Uma exceção ocorreu para o reator ETA, o que coincidiu com os baixos valores de SVT reportados neste reator, onde uma baixa diversidade bacteriana foi observada apesar do pH do enriquecimento ter sido realizado próximo a neutralidade, demonstrando que esta fonte de carbono favoreceu o crescimento da espécies sulfetogênicas.

Alta diversidade bacteriana foi encontrada nos reatores FOR e FOR 6, ETA 6 e ETA 4, assim como no reator LAC 4 (Figura 5.18), indicando que as condições estabelecidas nestes reatores estimularam o crescimento de outras espécies além das BRS.

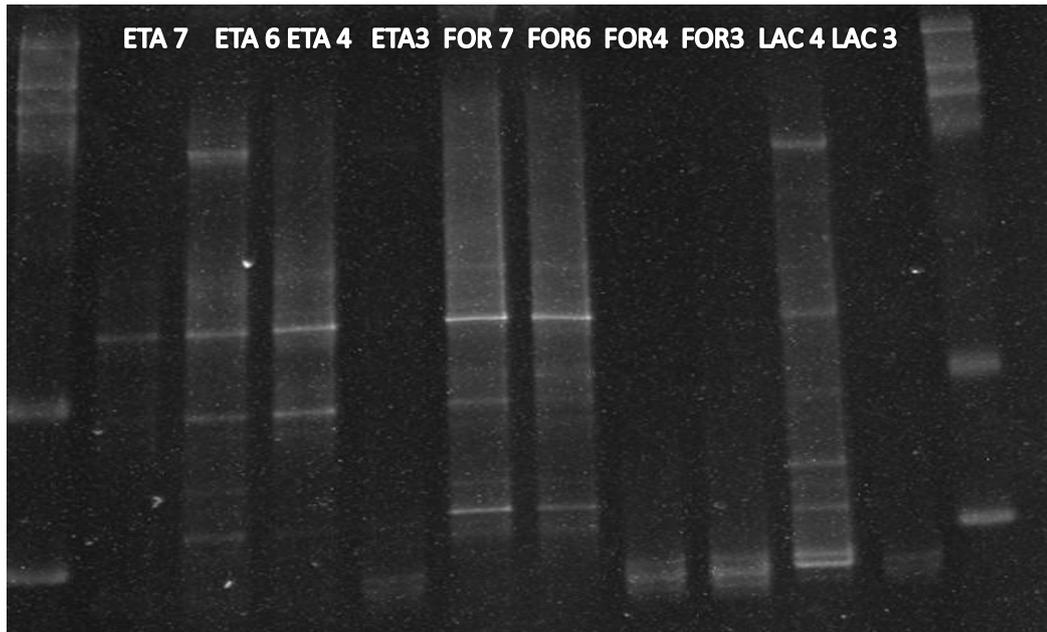


Figura 5.88 - Perfil de DGGE para o gene rRNA 16S na Fase 2.
Fonte: Da autora

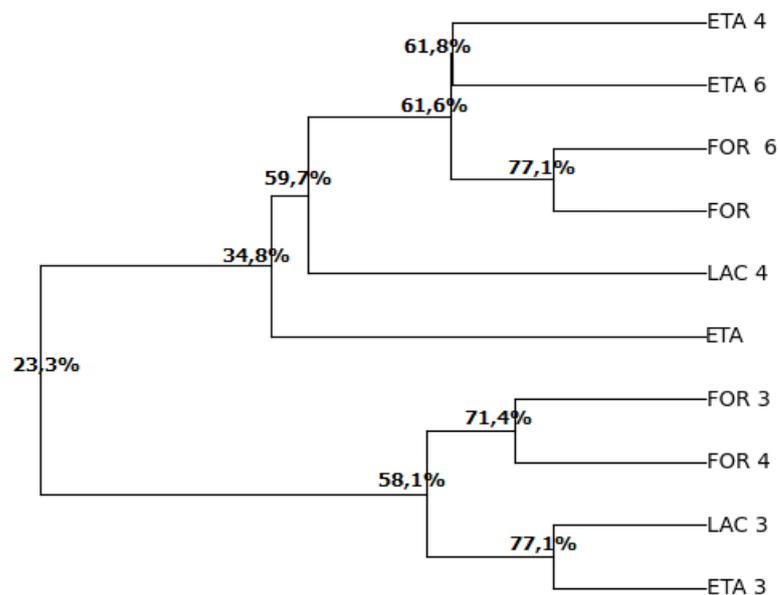


Figura 5.19 - Dendrograma de similaridade obtido através do programa, PyElph 1.4, usando o gel de DGGE para o Domínio Bacteria. O perfil de DGGE foi analisado utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA.

Fonte: Da autora

Uma uniformidade na diversidade de BRS foi observada para o grupo das sulfatorredutoras (Figura 5.20 e 5.21). Foi observada a presença de 3 bandas principais, diferenciando-se do inóculo AUT utilizado, que apresentou apenas uma banda predominante (Figura 5.6). As diferentes

condições de enriquecimento podem ter aumentado a diversidade de BRS nestes reatores. Apenas foi constatada menor similaridade para os reatores LAC 3 e LAC 4 e os demais reatores, apenas 25% foi observado.

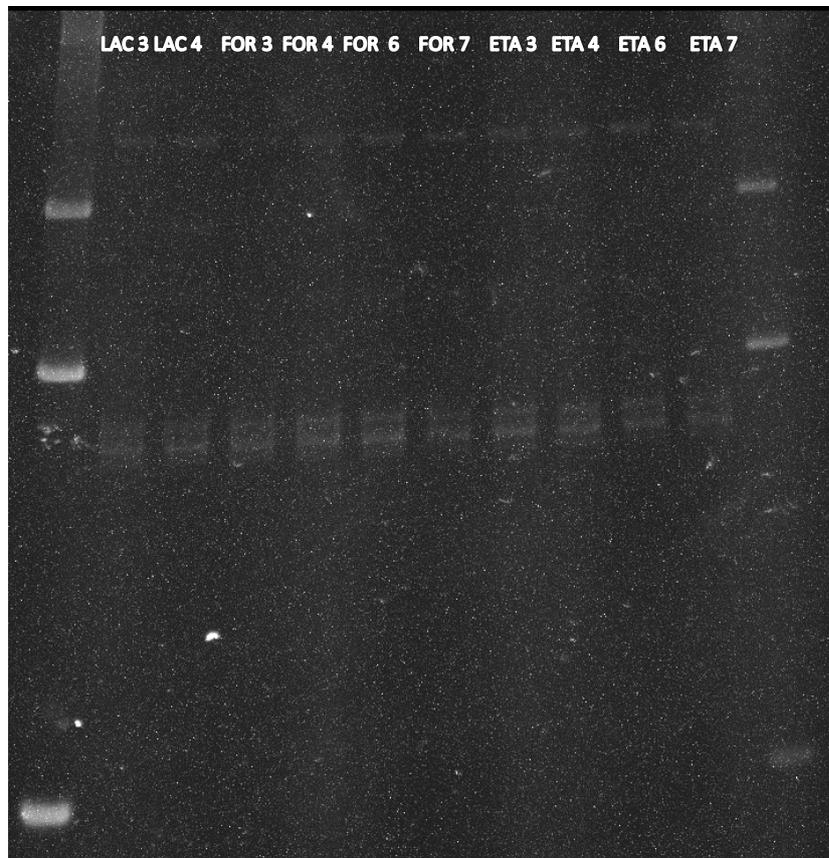


Figura 5.20 - Perfil de DGGE para o gene *dsrB* na Fase 2.

Fonte: Da autora.

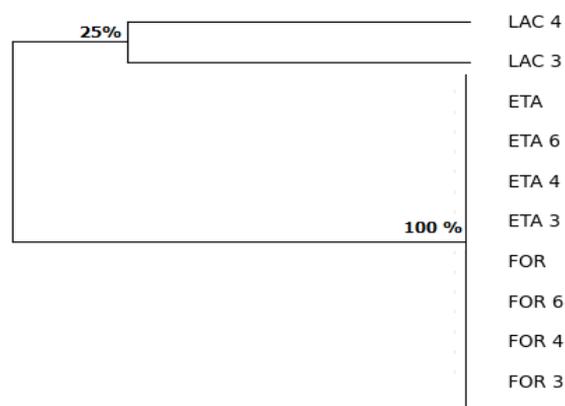


Figura 5.21 - Dendrograma de similaridade obtido através do programa, PyElph 1.4, usando o gel de DGGE para o grupo das sulfatorredutoras. O perfil de DGGE foi analisado utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA.

Fonte: Da autora.

6 CONCLUSÃO

Após o período de adaptação necessário para a população autóctone, observou-se que remoção de sulfato e produção de sulfeto foi similar para os reatores AUT e NÃO AUT, demonstrando que a biomassa AUT poderia ser usada para o tratamento da DAM em substituição a biomassa pré-adaptada não autóctone proveniente de reatores sulfetogênicos.

As análises de DGGE demonstraram que para ambos os reatores, a diversidade bacteriana e de BRS permaneceu praticamente estável durante todo o período de enriquecimento. Diferentes comunidades foram observadas nos reatores N-AUT e AUT tanto para o Domínio Bacteria, quanto para o grupo das sulfatorredutoras. Pouca diversidade foi encontrada no reator AUT em comparação ao reator N-AUT, entretanto, isto não afetou o potencial sulfetogênico deste reator.

O estudo do perfil filogenético indicou que a principal espécie representando a cultura AUT pertenceu ao genus *Desulfotomaculum*, enquanto que o reator N-AUT reator, apresentou maior similaridade com o genus *Desulfovibrio*.

Foi possível imobilizar a biomassa autóctone em espuma de poliuretano, demonstrando-se a viabilidade da utilização desta como inóculo de reatores que utilizam biomassa aderida, como o RAHLF, para o tratamento da DAM.

Em condições de neutralidade, o etanol se mostrou uma alternativa viável para ser utilizada como fonte de carbono durante o enriquecimento em substituição ao lactato devido à remoção de sulfato equivalente encontrada nos reatores ETA e LAC. Em contrapartida, o formiato não se mostrou um doador de elétrons eficaz para o processo de bioaugmentação das BRS.

Os resultados obtidos durante o ensaio de enriquecimento de BRS autóctones em diferentes pHs sugerem que o crescimento da cultura AUT é favorecido em condições de neutralidade. Entretanto, esta cultura mostrou-se tolerante a condições ácidas e moderadamente ácidas para todas as fontes de carbono estudadas. Estes resultados corroboram a possibilidade

de obter diversos avanços no tratamento da DAM ao utilizar-se microrganismos autóctones.

Em pH reduzido, a melhor fonte de carbono para realizar o processo de enriquecimento consistiu no formiato, já que ao utilizar esta fonte de carbono a eficiência de remoção de sulfato não foi afetada em condições de acidez.

A alteração da fonte de carbono e a redução do pH para valores ácidos alterou significativamente a diversidade bacteriana nos reatores estudados. Entretanto, uma uniformidade foi observada para o grupo das sulfatorredutoras, confirmando a presença e resistência destas em condições de acidez.

Por fim, acredita-se que a melhor alternativa para o processo de bioaugmentação destes microrganismos seja através do enriquecimento utilizando etanol como fonte de carbono em condições de neutralidade, com posterior redução gradativa do pH apenas durante a operação do reator sulfetogênico.

7 SUGESTÕES

As seguintes sugestões são propostas para trabalhos futuros relacionadas a tratamento da DAM utilizando biomassa autóctone:

- Testar lactose, resíduo de indústrias de alimento, como fonte de carbono para o processo de enriquecimento das BRS;
- Análise do precipitado de reatores contendo inóculo enriquecido em pH ácido para identificar as formas presentes do enxofre;
- Diminuir a concentração de DQO e de sulfato iniciais do meio de enriquecimento, mantendo a relação DQO/SO_4^{2-} do meio Postgate C, de forma a reduzir o substrato e sulfato residual;
- Inocular a biomassa enriquecida utilizando etanol como fonte de carbono em reator anaeróbio de biomassa aderida.

REFERÊNCIAS

- ACERBI, K. W. **Efeito do pH, relação DQO/Sulfato e fonte de carbono na biorremediação de Drenagem Ácida de Minas sob condições ácidas em reator UASB**. 2015. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2015
- ALMEIDA, S. K. **Detecção de Bactérias Redutoras de Sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio**. 2005. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.
- ALTUN, M.; SAHINKAYA, E.; DURUKAN, I.; BEKTAS, S.; KOMNITSAS, K. Arsenic removal in a sulfidogenic fixed-bed column bioreactor. **J Hazard Mater**, v.269, p.31–37, 2014.
- AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid mine drainage (AMD): causes, treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 1139-1145, 2006.
- AMORIM, A. K. B.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads. **Journal of Environmental Management**, v. 76, p. 319–325, 2005.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the examination for water and wastewater**. 20th ed. Washington, 2005.
- AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World J Microbiol Biotechnol**, v.32, p.180, 2016.
- BAI, H.; KANG, J.; QUAN, H.; HAN, Y.; SUN, J.; FENG, Y. Treatment of acid mine drainage by sulfate reducing bacteria with iron in bench scale runs. **Bioresource Technology**, v. 128, p.818–822, 2013.
- BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. **Microbiology Ecology**, v.44 p.139-152, 2003.
- BARALD, E. A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; MANFIO, G. P.; FORESTI, E.; VAZOLLER, R.F. Performance of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor and dynamics of the microbial community during degradation of pentachlorophenol (PCP). **Anaerobe**, v. 14, p. 268–274, 2008.
- BARBOSA, L. P. **Cultivo de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e sua aplicação na biorremediação de efluentes ácidos contendo metais**. 2009.

115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

BERTOLINO, S. M.; MELGAÇO, L. A.; SÁ, R. G.; LEÃO, V.A. Comparing lactate and glycerol as a single-electron donor for sulfate reduction in fluidized bed reactors. **Biodegradation**, v. 25, p. 719-733, 2014.

BERTOLINO, S.M.; RODRIGUES, I.C.B.; GUERRA-SÁ, R.; AQUINO, S.F.; LEÃO, V.A. Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. **J Environ Manage**, v.103, p.15.23, 2012.

BEKMEZCI, O.K.; UCAR, D., KAKSONEN, A. H.; SAHINKAYA, E. Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, p. 670–676, 2011.

BIJMANS, M. F. M.; DOPSON, M.; ENNIN, F.; LENS, P. N. L.; BUISMAN, C. J. N. Effect of Sulfide Removal on Sulfate Reduction at pH 5 in a Hydrogen Fed Gas-Lift Bioreactor. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.18, p.1809–1818, 2008.

BILEK, F.; WAGNER, S. Long term performance of an AMD treatment bioreactor using chemolithoautotrophic sulfate reduction and ferrous iron precipitation under in situ groundwater conditions. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 221–227, 2012.

BRUCHA, G. **Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo**. 2007. 237p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CAO, J.; ZHANG, G.; MAO, Z.; LI, Y.; FANG, Z.; YANG, C. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. **International Journal of Mineral Processing**, v.106–109, p. 58–64, 2012.

CABRERA, G.; PEREZ, R.; GOMEZ, J.M.; ABALOS, A.; CANTERO D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. **J Hazard Mater**, v.135, p.40-46, 2005.

CETIN, D.; DONMEZ, S.; DONMEZ, G. The treatment of textile wastewater including chromium(VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment. **Journal of Environmental Management**, v. 88, p. 76–82, 2008.

CHURCH, C. D.; WILKIN, R. T.; ALPERS, C. N.; RYE, R. O.; MCCLESKEY, R. B. Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine

Water. **Geochemical Transactions**, p. 1-14, 2007.

COLE, M.; WRUBEL, J.; HENEGAN, P.; JANZEN, C.; HOLT, J.; TOBIN, T. Development of a small-scale bioreactor method to monitor the molecular diversity and environmental impacts of bacterial biofilm communities from an acid mine drainage impacted creek. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, p. 96–104, 2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTA (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 07/03/2017.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Dynamics of sulfidogenesis associated to methanogenesis in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1050–1054, 2009.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; ZAIAT, M; FORESTI, E. Pentachlorophenol (PCP) dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4361–4367, 2009.

DOMINGUES, M. R. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas**. 164p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1669: Sampling Ambient Water for Trace Metals at EPA Water Quality Criteria Levels**. Washington, 1996. 35p.

FORTIN, D.; ROY, M.; RIOUX, J.; THIBAUT, P. Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p. 197-208, 2000.

GALLEGOS-GARCIA, M.; CELIS, L. B.; RANGEL-MENDEZ, R.; RAZO-FLORES, E. Precipitation and Recovery of Metal Sulfides From Metal Containing Acidic Wastewater in a Sulfidogenic Down-Flow Fluidized Bed Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 91-99, 2009.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 354 – 360, 2002.

GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D. V. D.; VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p. 194– 205, 2006.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O' DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Rapid method for co-extraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 66, p. 5488-5491, 2000.

GUSMÃO, V. R.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. **Journal of Hazardous Materials**, v. 139, p. 301-309, 2007.

HAO, T.; XIANG, P.; MACKEY, H. R.; CHI, K.; LU, H.; CHUI, H.; LOOSDRECHT M.C.M.V.; CHEN, G. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, v. 65, p. 1-21, 2014.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl Environ Microb**, v.63, p.3233-3241, 1997.

HEXIS. Tabela de Preços. 2017. Disponível em: <<http://www.hexis.com.br>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

HOSOKAWA, R.; NAGAI M., MORIKAWA M., OKUYAMA H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World J Microbiol Biotechnol**, v.25, p.1519-1528, 2009

ILHAM-SUNGUR, E.; CANSEVER, N.; COTUK, A. Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Dessulfovibrio* sp.) **Corrosion Science**, p.1097-1109, 2007.

JAIN, D. K. Evaluation of the semisolid Postgate's B medium for enumerating sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 22, p. 27-38, 1995.

JONG, T.; PARRY, D. L. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. **Water Research**, v. 37, p. 3379-3389, 2003.

JONG, T.; PARRY, D. L. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Water Research**, v. 40, p. 2561-2561, 2006.

KAKSONEN, A.H.; PLUMB, J.J.; ROBERTSON, W.J.; RIEKKOLA-VANHANEN, M.; FRANZMANN, P.D.; PUHAKKA, J.A. The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater. **Hydrometallurgy**, v. 83, p. 204-213, 2006.

KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J.A. Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. **Eng. Life Sci**, v. 7, p. 541-564, 2007.

KUEVER, J.; RAINEY, A.; HIPPE, H. Description of *Desulfotomaculum* sp. Groll as *Desulfotomaculum gibsoniae* sp. nova. **Int J Syst Bacteriol**, v.49, p.1801-1808, 1999.

KUEVER, J.; VISSER, M.; LOEFFLER, C.; BOLL, M.; WORM, P.; SOUSA, Z. D.; PLUGGE, M. C.; SCHAAP, J. P.; MUYZER, G.; PEREIRA, A. C. I.; PARSHINA, N.S.; GOODWIN, A. L.; KYRPIDES, C.N.; DETTER, J.; WOYKE, T.; CHAIN, P.; DAVENPORT, W.K.; ROHDE, M.; SPRING, S.; KLENK, H.; STAMS, J. M. A. Genome analysis of *Desulfotomaculum gibsoniae* strain GrollT a highly versatile Gram-positive sulfate-reducing bacterium. **Standards in Genomic Sciences**, v.9, p.821-839, 2014.

KWON, M. J.; O'LOUGHLIN, E. J.; BOYANOV, M. I.; BRULC, J. M.; JOHNSTON, E. R.; KEMNER, K. M.; ANTONOPOULOS, D. A. Impact of Organic Carbon Electron Donors on Microbial Community Development under Iron- and Sulfate-Reducing Conditions. **PLOS ONE**, p. 1-22, 2016.

LEE, D.; LIU, X. WENG, H. Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm. **Bioresource Technology**, v.156, p. 14-19, 2014.

LENS, P.; VALLERO, M.; ESPOSITO, G.; ZANDVOORT, M.. Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. **Environmental Science & Bio/Technology**, v.1, p. 311-325, 2002.

LI, Z.; KIM, D. D.; NELSON, O. D.; OTWELL, A. E.; RICHARDSON, R. E.; CALLISTER, S. J.; LIN, H. Molecular dissection of a putative iron reductase from *Desulfotomaculum reducens* MI-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.467, p. 503-508, 2015.

LOPEZ, M. V.; DIAS, A. C. F.; FASANELLA, C. C.; DURRER, A.; MELO, I.S.; KURAMAE, E.E.; ANDREOTE, F.D. Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. **Environmental Microbiology**, v.16, p. 845-855, 2014.

LU, J.; CHEN, T.; WUA, J.; WILSON, C.P.; HAO, X.; QIAN, J. Acid tolerance of an acid mine drainage bioremediation system based on biological sulfate reduction. **Bioresource Technol Miner Eng**, v.102, p.10401-10406, 2011.

LUPTAKOVA, A.; KUSNIEROVA, M. Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. **Hydrometallurgy**, v.77, p.97-102, 2005.

MARTINS, M.; FALEIRO, M. L.; BARROS, J. R.; VERÍSSIMO, A.R.; BARREIROS, M. A.; COSTA, M. C. Characterization and activity studies of

highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. **J Hazard Mater**, v.166, p.706–713, 2009.

MARTINS, M.; MOURATO, C.; MORAIS-SILVA, F. O.; RODRIGUES-POUSADA, C.; VOORDOUW, G.; WALL, J. D.; PEREIRA, I. A. C. Electron transfer pathways of formate-driven H₂ production in *Desulfovibrio*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, p. 8135-46 2016.

MARTINS, M.; SANTOS, E. S.; FALEIRO, M. L.; CHAVES, S.; TENREIRO, R.; BARROS, R. J.; BARREIROS, A.; COSTA, M.C. Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. **Int Biodeter Biodegr**, v.65, p.972-981, 2011.

MEIER, J.; PIVA, A.; FORTIN, D. Enrichment of sulfate-reducing bacteria and resulting mineral formation in media mimicking pore water metal ion concentrations and pH conditions of acidic pit lakes. **Fems Microbiol Ecol**, v.79, p. 69–84, 2012.

MOREAU, J. W.; ZIERENBERG, R. A.; BANFIELD, J. F. Diversity of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes (*dsrAB*) in a Salt Marsh Impacted by Long-Term Acid Mine Drainage. **Appl Environ Microb**, v. 76, p. 4819–4828, 2010.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 441-454, 2008.

NARDI, I. R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 587–592, 2005.

NGUYEN, Y.T.; KIEU, H. T. Q.; WEST, S.; DANG, Y. T.; HORN, H. Community structure of a sulfate-reducing consortium in lead-contaminated wastewater treatment process. **World J Microbiol Biotechnol**, v.33, p. 1-10, 2017.

O'FLAHERTY, V.; MAHONY, T.; O'KENNEDY, R.; COLLERAN, E. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 555-569, 1998.

OLIVEIRA, T. F. Structural Insights into Dissimilatory Sulfite Reductases: Structure of Desulforubidin from *Desulfomicrobium Norvegicum*. **Front Microbiol**, v.2, 2011.

ORBITAL. Tabela de Preços. 2017. Disponível em: <
<http://www.orbitallab.com.br/>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

OTWELL, A.E.; SHERWOOD, R.W.; ZHANG, S.; NELSON, O.D.; LI, Z.; LIN, H.; CALLISTER, S.J.; RICHARDSON, R.E. Identification of proteins capable

of metal reduction from the proteome of the Gram-positive bacterium *Desulfotomaculum reducens* MI-1 using an NADH-based activity assay. **Environ Microbiol**, v. 17, p. 1977–1990, 2015.

PARADIS, C. J.; JAGADAMMA, S.; WATSON, D. B.; MCKAY, L. D.; HAZEN, T. C.; PARK, M.; ISTOK, J. D. In situ mobility of uranium in the presence of nitrate following sulfate-reducing conditions. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.187, p.55–64, 2016.

PLUGGE, C.M.; ZHANG, W.; SCHOLTEN, J.C.M.; STAMS, A.J.M. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.2, p.1-8, 2011.

PURUSHOTHAMAN, J. G. C. S.; SHOUCHE, S. Y. Isolation and characterization of sulphate-reducing bacteria *Desulfovibrio vulgaris* from Vajreshwari thermal springs in Maharashtra, India. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 681–685, 2008.

RAMPINELLI, L. R.; AZEVEDO, R. D.; TEIXEIRA, M. C.; GUERRA-SA, R.; LEÃO, V.A. A sulfate-reducing bacterium with unusual growing capacity in moderately acidic conditions. **Biodegradation**, v.19, p. 613–619, 2008.

RZECZYCKA, M.; BŁASZCZYK, M. Growth and Activity of Sulphate-Reducing Bacteria in Media Containing Phosphogypsum and Different Sources of Carbon. **Pol. J. Environ. Stud.**, v. 14, n. 6, p. 891-895, 2005.

RODRIGUEZ, P. R. **Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas**. 2010. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SAHINKAYA, E.; GUNES, F.M.; UCAR, D.; KAKSONEN, A.H. Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water. **Bioresource Technol**, v. 102, p. 683–689, 2011.

SAHINKAYA, E.; YUCESAY, Z. Biotreatment of acidic zinc- and copper-containing wastewater using ethanol-fed sulfidogenic anaerobic baffled reactor. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 33, p. 989–997, 2010.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; SANZA, J. L.; BIJMANSC, M. F. M.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, p. 98–109, 2014.

SAHINKAYA, E.; GUNES, F. M.; UCAR, D.; KAKSONEN, A.H. Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 683–689, 2011.

SINGH, R.; KUMAR, A.; KIRROLIA, A.; KUMAR, R.; YADAV, N.; BISHNOI NARSI, R.; LOHCHAB RAJESH, K. Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in

simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study. **Bioresource Technol**, v.102, p.677–682, 2011.

SUN, J.; DAI, X.; WANG, Q.; PAN, Y.; NI, B. Modelling Methane Production and Sulfate Reduction in Anaerobic Granular Sludge Reactor with Ethanol as Electron Donor. **Scientific Reports**, p. 1-11, 2016.

TEBO, B. M.; OBRAZTSOVA, A. Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 193-198, 1998.

TSUKAMOTO, T.K.; KILLION, H.A.; MILLER, G.C. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. **Water Research**, v. 38, p.1405–1418, 2004.

VAINSHTEIN, M.; KUSCHKB, P.; MATTUSCHB, J.; VATSOURINA, A.; WIESSNERB, A. Model experiments on the microbial removal of chromium from contaminated groundwater. **Water Res**, v. 37, p. 1401–1405, 2003.

VERMA, A.; DUA, R.; SINGH, A.; BISHNOI, N. R.. Biogenic sulfides for sequestration of Cr (VI), COD and sulfate from synthetic wastewater. **Water Science**, v. 29, p. 19–25, 2015.

VIEIRA, B. F.; COUTO, P. T.; SANCINETTI, G. P.; KLEIN, B.; van-ZYL, D.; RODRIGUEZ, R. P. The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic process in anaerobic reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 51, p.1-5, 2016.

VITOR, G.; PALMA, T. C.; VIEIRA, B.; LOURENÇO, J. P.; BARROS, R. J.; COSTA, M. C. Start-up, adjustment and long-term performance of a two-stage bioremediation process, treating real acid mine drainage, coupled with biosynthesis of ZnS nanoparticles and ZnS/TiO₂ nanocomposites. **Miner Eng**, p. 75, v. 85–93, 2015.

WANG, H.; GUO, C. L.; YANG, C.F.; LU, G. N.; CHEN, M. Q.; DANG, Z. Distribution and diversity of bacterial communities and sulphate-reducing bacteria in a paddy soil irrigated with acid mine drainage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 196-206, 2016.

WOLICKA, D.; BORKOWSKI, A.; JANKIEWICZ, U.; STEPIEŃ, W.; KOWALCZYK, P. Biologically-Induced Precipitation of Minerals in a Medium with Zinc Under Sulfate-Reducing Conditions. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 149–155, 2015.

WOLICKA, D.; ZDANOWSKI, M. K.; ŻMUDA-BARANOWSKA, M. J.; POSZYTEK, A. e GRZESIAK, J. Sulphate Reducing Activity Detected in Soil Samples from Antarctica, Ecology Glacier Forefield, King George Island. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 443–450, 2014.

WU, W.; HICKEY, R. F.; ZEIKUS, G. J. Characterization of Metabolic Performance of Methanogenic Granules Treating Brewery Wastewater: Role of Sulfate-Reducing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3438-3449, 1991.

ZHANG, W.; WANG H. Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. **Miner Eng**: v. 92, p. 63–71, 2016.

ZHOU, J.; ZHOU, X.; LI, Y.; XING, J. Bacterial communities in haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors under different electron donors revealed by 16S rRNA MiSeq sequencing. **Journal of Hazardous Materials**: v. 295, p. 176 - 184, 2015.