

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**FRECIA MARIBEL MAMANI LICONA**

**ESTUDO DE BACTÉRIAS ACIDOFÍLICAS REDUTORAS DE SULFATO COM  
POTENCIALIDADE NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Poços de Caldas /MG

2019

**FRECIA MARIBEL MAMANI LICONA**

**ESTUDO DE BACTÉRIAS ACIDOFÍLICAS REDUTORAS DE SULFATO COM  
POTENCIALIDADE NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfnas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha  
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Brito

Poços de Caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca campus Poços de Caldas

L711e Liconá, Frecia Maribel Mamani.  
Estudo de bactérias acidofílicas redutoras de sulfato com  
potencialidade no tratamento de drenagem ácida de mina / Frecia  
Maribel Mamani Liconá. -- Poços de Caldas/MG, 2019.  
49 f. –

Orientador(a): Gunther Brucha.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) –  
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2019.  
Bibliografia.

1. Engenharia sanitária. 2. Drenagem ácida de minas. 3. Águas  
residuais. I. Brucha, Gunther. II. Título.

CDD – 628.16

**FRECIA MARIBEL MAMANI LICONA**

**ESTUDO DE BACTÉRIAS ACIDOFÍLICAS REDUTORAS DE  
SULFATO COM POTENCIALIDADE NO TRATAMENTO DE  
DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

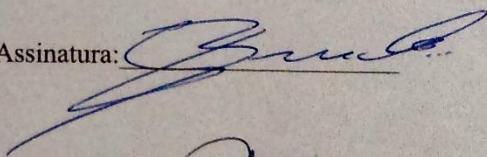
A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Tratamento de Efluentes.

Aprovada em: 30 de mês de julho 2019.

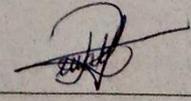
Prof. Dr. Gunther Brucha

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa Dra. Mercia R. Domingues Moretto

Instituição: UFABC

Assinatura: Mercia R. D. moretto

*Este trabalho é dedicado a quem foi minha  
irmã na terra e agora é meu anjo no céu...*

*Nancy (2018)*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por sempre estar presente na minha vida através das pessoas maravilhosas que já conheci e conheço cada dia.

Aos meus pais, Raúl e Encarnación, por seu apoio, amor incondicional e sua confiança em mim. Eles que me deram a força para me superar sempre, mesmo quando decidi estudar longe e morar sozinha.

Aos meus irmãos, Raul e Lisbet pelo companheirismo, amor e a inspiração para concluir mais uma etapa da minha vida com êxito.

Ao meu orientador Gunther por transmitir todo seu conhecimento e confiar em mim.

Às grandes amizades que eu fiz aqui no Brasil, começando pelos meus companheiros e amigos, ou seja, minha família do laboratório Bruna, Elis, Juliana, Carla, Livia, Tális, Rafael, Matheus, Mauro e Eduardo, por tornarem as horas no laboratório amenas e o trabalho mais produtivo compartilhando conhecimento mesmo com sotaques tão diversos. Muito sucesso para todos, simplesmente estou encantada de ter conhecido vocês.

Às secretarias da pós-graduação, Kênia pelo apoio nas informações desde quando cheguei em Poços, à Fernanda que salvou minha vida muitas vezes simplesmente a amizade surgiu de imediato e obrigada por toda a boa vontade em sempre me ajudar, à Andrea por todos os abraços quentinhos que me deu, sempre tão gentil, à Thais obrigada pelas dicas e a informações cruciais para finalizar este trabalho, sem vocês estaria perdida.

À OEA e Capes pelo apoio financeiro durante minha estadia no Brasil.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que essa jornada fosse concluída com êxito.

Muito obrigada!

## RESUMO

O impacto ambiental causado pela mineração afeta os ecossistemas, especialmente pelos impactos provenientes da drenagem ácida de minas (DAM), que acaba afetando as águas superficiais e subterrâneas, causando poluição e destruição dos ecossistemas. A DAM apresenta-se como um rejeito de difícil tratamento, pois apresenta alto teor de sulfato, baixíssimo pH e concentrações significativas de metais pesados. Portanto, o tratamento da DAM é um desafio biotecnológico. No entanto, existem microrganismos capazes de metabolizar sulfato. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são muito estudadas para realização de biorremediação, pois são capazes de crescer em ambientes ácidos, gerando alcalinidade removendo sulfato e precipitando metais pesados presentes na DAM. Nesta perspectiva, o objetivo deste estudo foi obter informação sobre as BRS autóctones existentes na bacia sedimentar da mina de urânio operada pelas Indústrias Nucleares do Brasil (INB) na cidade de Caldas - MG, com foco nas BRS acidofílicas que desenvolvem um papel importante nas aplicações biotecnológicas para tratamento de DAM como uma alternativa viável para reduzir o sulfato deste tipo de efluente e precipitar metais recuperáveis, no presente estudo elaborou-se enriquecimentos de BRS a diferentes condições em duas fontes de carbono (lactato e acetato) e diferentes valores de pH (2,3,4 e 5), os análises realizados por monitoramento físico-químico de remoção de sulfato e produção de sulfeto foram ótimas para os pH 3,4 e 5 e para saber a biodiversidade presente no enriquecimento foi realizada um análise de sequenciamento do gene 16S rDNA obtendo um reporte de 496 gêneros agrupados em 25 filos, ressaltando a presença de 7 BRS para os enriquecimentos com lactato e 5 BRS para os enriquecimentos com acetato, concluindo com possibilidade de caracterizar as BRS autóctones existente na bacia sedimentar da mina de uranio apesar das condições ácidas e a presença de metais pesados, o qual apoia a possível utilização em efluentes com esse tipo de características.

Palavras chave: Drenagem ácida de minas (DAM). Autóctones. Bactérias redutoras de sulfato. Tratamento de efluentes.

## ABSTRACT

The environmental impact caused by mining affects ecosystems, especially the impacts from acid mine drainage (DAM), which end up affecting surface and groundwater, causing pollution and destruction of ecosystems. DAM is a difficult waste to treat, as it has a high sulfate content, very low pH and significant concentrations of heavy metals. Therefore, the treatment of AMD is a biotechnological challenge. However, there are microorganisms capable of metabolizing sulfate. Sulfate-reducing bacteria (BRS) are widely studied for bioremediation, as they are able to grow in acidic environments, generating alkalinity removing sulfate and precipitating heavy metals present in DAM. In this perspective, the objective of this study was to obtain information about the native BRS existing in the sedimentary basin of the uranium mine operated by the Brazilian Nuclear Industries (INB) in the city of Caldas - MG, focusing on acidophilic BRS that play an important role in the applications. As a viable alternative to reduce the sulfate of this type of effluent and precipitate recoverable metals, in the present study BRS enrichments were made under different conditions in two carbon sources (lactate and acetate) and different pH values ( 2,3,4 and 5), the analyzes performed by physicochemical monitoring of sulfate removal and sulfide production were optimal for pH 3,4 and 5 and to know the biodiversity present in the enrichment, a sequencing analysis was performed. 16S rDNA gene reporting 496 genera grouped into 25 phyla, highlighting the presence of 7 BRS for lactate enrichment and 5 BRS for acetate enrichments, concluding with the possibility of characterizing the native BRS existing in the uranium mine sedimentary basin despite the acidic conditions and the presence of heavy metals, which supports the possible use in effluents with this type of characteristics.

**Keywords:** Acid mine drainage (AMD). Autochthonous. Sulfate reducing bacteria. Effluent treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa da localização da área de estudo na cidade de Caldas-MG, Brasil .	18
Figura 2- Fluxograma.....	19
Figura 3- Esquema de inoculação da técnica número mais provável .....	20
Figura 4- Esquema dos ensaios de Enriquecimento .....	22
Figura 5- Análises físico-químicas de sulfato e sulfeto - primeiro Enriquecimento....	26
Figura 6- Composição filogenética encontradas nas fontes de carbono em pH 3 ....	31
Figura 7- Esquema proposto da simbiose entre <i>Acidocella sp.</i> e <i>Desulfosporosinus sp.</i> .....	34
Figura 8- Diversidade microbiana dos enriquecimentos lactato e acetato em pH 3 ..	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização dos pontos de coleta na mina Osamu Utsumi .....	18
Tabela 2- Componentes de meio de Enriquecimento .....	21
Tabela 3- Resultados NMP de BRS provenientes do mix de Sedimentos da mina Osamu Utsumi.....	24
Tabela 4- Resultados das concentrações do sulfato e sulfeto (mg/L), obtidos pelos análises físico-químicos no primeiro enriquecimento.....	25
Tabela 5- Resultados das concentrações do sulfato e sulfeto (mg/L), obtidos pelos análises físico-químicos no segundo enriquecimento.....	27
Tabela 6- Resultados das concentrações de sulfeto (mM), obtidos pelos análises físico-químicos no primeiro e segundo enriquecimento.....	28
Tabela 7- Resultados de porcentagem de abundância relativa dos gêneros predominantes em lactato e acetato.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAM	Drenagem Ácida de Mina
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
INB	Indústrias Nucleares do Brasil
BF4	Bota fora 4
BF8	Bota fora 8
CM	Cava da mina
NMP	Número mais provável
Eh	Potencial de Oxi-Redução
pH	Potencial Hidrogeniônico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
	<b>ARTIGO 1- CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ACIDOFILICAS ENRIQUECIDAS PROVENIENTES DO SEDIMENTO DE UMA MINA DE URÂNIO NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL .....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
2.1.	FONTE DE INÓCULO.....	17
2.2.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	18
2.3.	QUANTIFICAÇÃO ESTIMATIVA DAS COMUNIDADES DE BRS .....	19
2.4.	ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO DE BRS ACIDÓFILAS EM DIFERENTES PH E FONTES DE CARBONO .....	21
2.5.	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA ENRIQUECIDAS POR SEQUENCIAMENTO DO GENE DO rDNA 16S .....	23
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
3.1.	QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE DE BRS .....	24
3.2.	ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO DE BRS ACIDÓFILAS EM DIFERENTES PHs E FONTES DE CARBONO .....	25
3.3.	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA ENRIQUECIDA (SEQUENCIAMENTO DO GENE DO rDNA 16S) .....	29
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO A – ARTIGO CONGRESSO.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As atividades de mineração são uma fonte de produção de energia e benefícios econômicos, com uma grande contribuição para o crescimento e desenvolvimento dos países. No entanto, eles também geram impactos negativos causando degradação ambiental, pelos rejeitos minerais gerados.

Os rejeitos de minérios são um subproduto sem valor econômico produzidos no longo da extração mineira como emissões de partículas, bota-foras, subprodutos químicos, e a drenagem ácida de mina (DAM), que apresenta-se como um rejeito de difícil tratamento, pois é caracterizada por grandes quantidades de sulfato, metais pesados dissolvidos e pH ácido (HEDRICH; JOHNSON, 2014; JOHNSON, 2003; LÓPEZ PAMO; O; BARETTINO, 2002). A liberação desses subprodutos tem um impacto significativo nas águas superficiais e subterrâneas, o ar e áreas terrestres.

Nas minas de urânio essas drenagens de água ácida são ainda mais perigosas, uma vez que são acompanhadas por outros metais pesados tóxicos e metaloides dissolvidos, aumentando consideravelmente a contaminação nos ecossistemas aquáticos, terrestres e na saúde humana (CAMPBELL; GALLEGOS; LANDA, 2015; LEITE; CARDOSO; MELLO, 2013; LÓPEZ PAMO; O; BARETTINO, 2002; MKANDAWIRE, 2013).

Na atualidade a DAM representa um problema importante na região de Mina Gerais, um exemplo do impacto causado pela drenagem ácida é representado pela mina de urânio Osamu Utsumi, Caldas - MG. Essa mina apresenta um alto potencial de geração de DAM devido à abundância de pirita que é susceptível à biolixiviação. Calcula-se que a taxa de fluxo de DAM gerada nessa mina pode alcançar  $160\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$  em época de chuva (MIEKELEY et al., 1992). Dessa maneira, é produzido uma grande quantidade de drenagem ácida com pH aproximado de 3,4 a 4,15, dependendo da época do ano, com uma concentração de sulfato em torno de  $890\pm 80\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (BENEDETTO et al., 2005; GIORDANI, 2017; NOGUEIRA et al., 2019; RODRIGUEZ, 2010), este fluxo de água ácida promove a dissolução de metais pesados próprios da mina que entram nas correntes de água atingindo os ecossistemas aquáticos e terrestres assim como ingressando na cadeia trófica impactando a todos os indivíduos dessa incluindo o homem.

O tratamento de DAM atualmente empregado na mina Otsamu Usumi, é o tratamento químico convencional que é baseado na neutralização do pH ácido por

adição do hidróxido de cálcio para elevar o pH e produzir a precipitação de metais (CIPRIANI, 2002). Entretanto, essas técnicas geram grandes quantidades de lodos, e elevados custos operacionais (AYANGBENRO; OLANREWaju; BABALOLA, 2018; GODOI et al., 2017; JOHNSON; HALLBERG, 2005), causando outro impacto para a disposição desse lodo contaminado com um baixo o nulo potencial de recuperação dos metais.

Uma possibilidade para o tratamento da DAM é o tratamento biológico anaeróbio, onde as bactérias redutoras de sulfato (BRS) desempenham um papel importante na geração de alcalinidade a partir da redução do sulfato à sulfeto, neutralizando a drenagem ácida e precipitando os metais como sulfetos metálicos (COHEN, 2006; JOHNSON; HALLBERG, 2005; SAHINKAYA et al., 2015), gerando uma menor quantidade de lodo e a possível separação de metais é maior.

Recentemente, diferentes configurações de reatores anaeróbios foram utilizados no tratamento da DAM (FERRAZ, 2019; GODOI et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2019; PEROSSI et al., 2018; RODRIGUEZ; ZAIAT, 2011). Uma das questões que chamam a atenção é a origem do inóculo utilizado para inoculação desses reatores. Os autores utilizaram inóculos consagrados de outros reatores anaeróbios metanogênicos utilizados para tratamento de efluente, por ter um volume disponível. Os trabalhos desenvolvidos visando o tratamento anaeróbio da DAM que utilizaram esse tipo de inóculo apresentaram bons resultados de eficiência de remoção de sulfato, entretanto, vale ressaltar que quando os reatores operavam com efluentes com pH entre 3 e 4 por longo período, a eficiência diminuía e/ou não resistia às condições impostas. Um outro fator a levar em consideração é o uso de drenagem sintética pelos autores. Uma questão que surge seria a adaptabilidade e resistência dos microrganismos às condições de DAM real, onde além do baixo pH, no caso da DAM da INB, a existência de radionuclídeos e terras raras que podem influenciar no metabolismo das BRS.

O presente trabalho faz parte do Projeto “Tratamento anaeróbio de drenagem ácida de mina utilizando microrganismos autóctones enriquecidos” apoiado pela FAPEMIG, onde está-se estudando a potencialidade dos microrganismos (BRS) provenientes da cava da mina ácida no tratamento da DAM. Nesse sentido o trabalho aqui apresentado foi o de enriquecer e caracterizar as comunidades de BRS acidófilas provenientes do sedimento da mina de urânio Osamu Utsumi (Caldas - MG) com grande potencial para utilização no tratamento biológico de drenagem

ácida de mina.

Optou-se por apresentar os resultados na forma de artigo científico, que será traduzido para o inglês e submetido ao periódico Plus One, que está com chamada para uma edição especial sobre Microrganismos extremófilos (Life in Extreme Environments).

Durante o desenvolvimento desse mestrado, também se operou um reator biológico de leito estruturado no tratamento da DAM real. Vale ressaltar que este reator é oriundo do doutorado da Elis Watanabe Nogueira e a autora do presente trabalho, foi responsável pela operação deste reator enquanto a doutoranda estava em seu estágio no Reino Unido. Os resultados desta operação, apontaram para a perda de eficiência do reator, quando a porcentagem de DAM real presente no afluente foi de 70%. Entretanto foi observado grande eficiência na remoção de terras raras durante o processo. Esses resultados estão no artigo em anexo, que foram apresentados na 16° Conferência Mundial de Digestão Anaeróbia (AD) em junho de 2019. Está em confecção do artigo sobre o tema para ser apresentado ao periódico Water Science and Technology.

## ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ACIDOFÍLICAS ENRIQUECIDAS PROVENIENTES DO SEDIMENTO DE UMA MINA DE URÂNIO NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL

### Resumo

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos exclusivos de ambientes anaeróbios, capazes de crescer em condições ácidas, atualmente são de grande interesse na ciência por sua habilidade de precipitar metais e gerar alcalinidade nas águas de drenagem ácida. Até o presente momento, poucos gêneros foram isolados de sedimentos ácidos, no entanto existem estudos de BRS extremófilas, com crescimento em torno de pH 3. O presente estudo teve como objetivo caracterizar as BRS autóctones presentes na bacia sedimentar da mina de urânio Osamu Utsumi. Os ensaios de enriquecimento testaram lactato e acetato como doadores de elétrons, em diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5). Os resultados revelaram crescimento de BRS nas duas fontes de carbono, em pH 3, 4 e 5, no entanto, observou-se que o pH foi um fator limitante apresentando ausência de crescimento em pH 2. A remoção de sulfato demonstrou uma atividade metabólica com uma porcentagem de remoção entorno de 98% para lactato e 97% para acetato no primer enriquecimento, entretanto, no segundo enriquecimento a remoção foi entorno de 67% e 55% para lactato e acetato respectivamente. Para o análise de biodiversidade realizou-se uma sequência do gene 16S rDNA pela técnica HiSeq, obtendo-se 496 gêneros agrupados em 25 filós, ressaltando-se a presença de 7 BRS para os enriquecimentos com lactato e 5 BRS para os enriquecimentos com acetato, advertindo-se uma abundância do gênero de BRS *Desulfosporosinus* (27%) para ambas fontes de carbono. Nos ensaios com acetato foi interessante observar uma abundância relativa do gênero *Acidocella* (39%), uma acetoclástica acidófila, e uma abundância do gênero *Desulfosporosinus* (27%) uma BRS de metabolismo incompleto incapaz de metabolizar acetato, no entanto existe a possibilidade de que ela modificou seu metabolismo para quimiolitotrófica, utilizando o hidrogênio como doador de elétrons e sulfato como aceptor de elétrons. A presença desses dois gêneros confirmou o possível sintrofismo entre esses dois microrganismos para sobreviver nas condições testadas, concluindo que poderia existir um possível sintrofismo entre as BRS autóctones existente na bacia sedimentar da mina de urânio e outros gêneros de bactérias demonstrando que o enriquecimento de bactérias acidofílicas seria uma alternativa viável para tratamento de DAM, já que, tem bactérias que estão mais adaptadas as condições reais de drenagem ácida ao provir de um inóculo sedimentar da própria bacia que se pretende tratar.

**Palavras-chave:** Extremófilos. Microrganismos autóctones. Remoção de sulfato.

### Abstract

Sulfate-reducing bacteria (BRS) are unique microorganisms from anaerobic environments capable of growing under acidic conditions, and are currently of great

interest in science because of their ability to precipitate metals and generate alkalinity in acid drainage waters. So far, few genera have been isolated from acidic sediments, however there are studies of extremophilic BRS with growth around pH 3. This study aimed to characterize the native BRS present in the sedimentary basin of the Osamu Utsumi uranium mine. Enrichment assays tested lactate and acetate as electron donors at different pH values (2, 3, 4, 5). The results showed BRS growth in both carbon sources, at pH 3, 4 and 5, however, it was observed that the pH was a limiting factor presenting absence of growth at pH 2. The removal of sulfate showed a metabolic activity with a percentage of removal around 98% for lactate and 97% for acetate in the first enrichment, however, in the second enrichment the removal was around 67% and 55% for lactate and acetate respectively. For the biodiversity analysis, a 16S rDNA gene sequence was performed by HiSeq technique, obtaining 496 genera grouped in 25 phyla, highlighting the presence of 7 BRS for lactate enrichment and 5 BRS for acetate enrichment, An abundance of the genus of BRS *Desulfosporosinus* (27%) is warned for both carbon sources. In the acetate trials it was interesting to observe a relative abundance of *Acidocella* (39%), an acidophilic acetoclastic, and an abundance of *Desulfosporosinus* (27%) a BRS of incomplete metabolism unable to metabolize acetate, however there is a possibility that it modified its metabolism to autotrophic chemilite, using hydrogen as an electron donor and sulfate as an electron acceptor. The presence of these two genera confirmed the possible syntrophism between these two microorganisms to survive under the tested conditions, concluding that there could be a possible syntrophism between the autochthonous BRS existing in the uranium mine sedimentary basin and other bacterial genera showing that the enrichment of acidophilic bacteria It would be a viable alternative for treating DAM, as it has bacteria that are better adapted to the actual conditions of acid drainage by coming from a sedimentary inoculum from the very basin to be treated.

**Keywords:** Extremophiles, autochthonous microorganisms, sulphate removal

## INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS), tem a habilidade de usar o sulfato como acceptor final de elétrons em condições anaeróbias, para a degradação de compostos orgânicos. Esta redução conduz a um consumo de prótons promovendo a elevação do pH e a formação de sulfetos, esses sulfetos podem reagir com os metais e metaloides existentes no meio e formar sulfetos metálicos insolúveis podendo ser separados por outros métodos químicos. (GODOI et al., 2017; JOHNSON, 1998, 2003; JOHNSON; HALLBERG, 2005; MUYZER; STAMS, 2008; RAMAMOORTHY et al., 2006; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013; STAMS et al., 1993).

Embora o nome de redutoras de sulfato, deve sua capacidade de usar sulfato como acceptor final de elétrons para o crescimento, também podem usar outros

aceptores como tiosulfato, sulfito, enxofre elementar, fumarato, algumas podem reduzir o nitrato e nitrito e têm a capacidade de crescer em diferentes substratos, de acordo com o metabolismo podem-se dividir em dois grupos: as bactérias que degradam os compostos orgânicos em forma incompleta à acetato, e as que degradam os compostos orgânicos em forma completa à dióxido de carbono (MUYZER; STAMS, 2008).

A maioria de BRS descritas crescem de maneira ótima em pH neutro entorno 6 – 8, no entanto, as BRS acidófilas são capazes de superar essas condições, crescendo em pH ácido entorno de 3 (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013).

Nos últimos anos, descreveram-se microrganismos acidófilos cujo metabolismo foi reportado em ecossistemas naturais de pH baixo como o rio Tinto (pH~ 2,3); e em sedimentos de lagoas ácidas de mina de carvão (Alemanha), urânio (México), oro (Francia) (pH~ 3-4). No entanto, as BRS não foram exclusivas em essas condições, identificaram-se os gêneros *Desulfosporosinus* sp., *Desulfurella* sp., *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Desulfitobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Acidiobacterium* sp., (ALAZARD et al., 2010; FLORENTINO et al., 2015, 2016; RAMAMOORTHY et al., 2006; ROBERTSON et al., 2001; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2011, 2013, 2014a)

A peculiaridade de sobreviver à pH baixo, em presença de metais e metaloides, e reduzindo o sulfato, considera-se importante para o tratamento de efluentes que apresentam este tipo de características, como a drenagem ácida de mina (DAM). No entanto, cave ressaltar que um fator limitante para a atividade microbiana dentro desse tipo de efluentes é a concentração baixa de matéria orgânica presente na DAM (AYANGBENRO; OLANREWAJU; BABALOLA, 2018; RODRIGUEZ; ZAIAT, 2011).

Um dos ambientes que apresenta esse tipo de efluente é a mina Osamu Utsumi (Caldas-MG, Brasil), foi uma mina de extração de urânio que esteve em operação durante os anos 1982 a 1995 que atualmente apresenta um alto potencial de geração de DAM devido a abundância de pirita ( $\text{Fe}_2\text{S}$ ) e outros minerais sulfetados que são susceptíveis à biolixiviação, dessa maneira, é produzido uma grande quantidade de drenagem ácida com pH entorno de 3; com uma concentração de sulfato em torno de  $890 \pm 80 \text{ mg.L}^{-1}$ , este tipo de efluente é de difícil tratamento por causa do pH e os metais pesados dissolvidos (BENEDETTO et al., 2005; GIORDANI

et al., 2019; NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008; NOGUEIRA et al., 2019).

Nesse contexto, levando em consideração os aspectos básicos do metabolismo do BRS, o objetivo do presente estudo foi caracterizar as bactérias redutoras de sulfato autóctones presentes nos sedimentos da mina de urânio Osamu Utsumi, na cidade de Caldas (MG), Brasil, assim como determinar a diversidade microbiana com potencial para gerar conhecimento e informações base para ser aplicados no tratamento de efluentes ácidos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1.1. FONTE DE INÓCULO**

A mina de Osamu Utsumi está localizada na cidade de Caldas, Minas Gerais, Brasil, pertencente à empresa “Indústrias Nucleares do Brasil” (INB), onde a extração de urânio foi realizada durante entre os anos 1982 a 1995, e desativada em 1998, sendo atualmente a responsável pelo monitoramento ambiental dessa área.

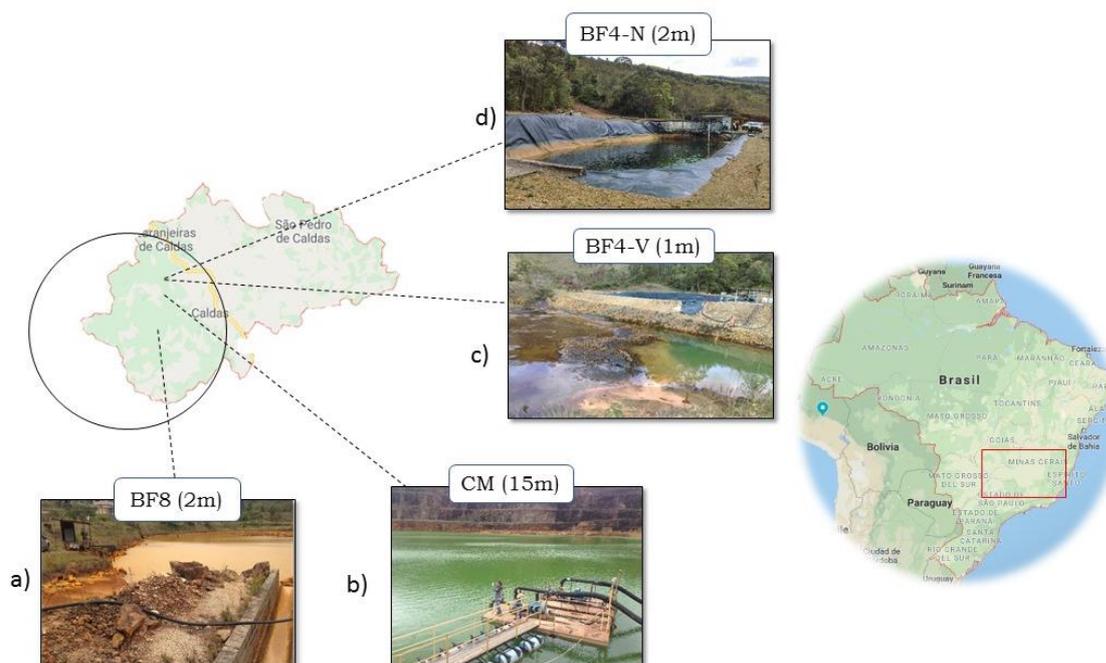
Atualmente apresenta quatro lagoas que serve para coletar a DAM produzido naturalmente por causa da biolixiviação, cada uma apresenta características físicas diferentes, a Bacia Ivan Antunes (BF8) apresenta um cor amarelo por causa da presença do ferro, a cava da mina (CM), é a maior e é rica em uranio, a Bacia Nestor Figueiredo (BF4), apresenta duas lagoas, uma antiga sem geomembrana (BF4-V), e uma nova com geomembrana (BF4-N).

A DAM coletada em cada lagoa é bombeada à pranta do tratamento da própria mina onde é realizado o tratamento químico convencional baseado na neutralização do pH ácido por adição do hidróxido de cálcio, elevando o pH, e precipitando os metais junto com o lodo.

As amostras de sedimento, foram coletadas em janeiro de 2018 (época de chuva na região), das quatro lagoas de água ácida. Os pontos de coleta CM, BF8, BF4-V, BF4-N, foram a diferentes profundidades de 15 m; 2,0 m; 1,0 m; 2,0 m, respetivamente, com auxílio de uma draga tipo Van Veen, acondicionados em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

Na Figura 1 pode ser visualizado o mapa da região onde foram coletados os sedimentos para o presente estudo.

Figura 1- Mapa da localização da área de estudo na cidade de Caldas-MG, Brasil



Em detalhe estão a circunferência que ocupa a mina e as imagens dos pontos de coleta: a) BF8; b) CM; c) BF4-V; e d) BF4-N.

Fonte: Da autora (2019).

Também foi caracterizado *"in situ"* a água acidadas lagoas com ajuda de uma sonda multiparametros Horiba® no local de coleta. A Tabela 1 apresenta as características de cada ponto de coleta.

Tabela 1- Caracterização dos pontos de coleta na mina Osamu Utsumi

	<b>BF8</b>	<b>BF4-N</b>	<b>BF4-V</b>	<b>CM</b>
<b>pH</b>	3,4	3,91	3,87	4,10
<b>Potencial Redox mV</b>	482	481	446	435,1
<b>Temperatura °C</b>	23,9	21,1	22,8	21,7
<b>altitude m</b>	1310	1301	1300	1330
<b>Coordenadas N</b>	03° 44' 03.5''	03° 46' 16.2''	03° 46' 18.8''	03° 45' 82.2''
<b>Coordenadas E</b>	75 ° 71' 07.6''	75° 73' 03.7''	75° 73' 03.7''	75° 72' 58.2''
<b>UTM</b>	23k			

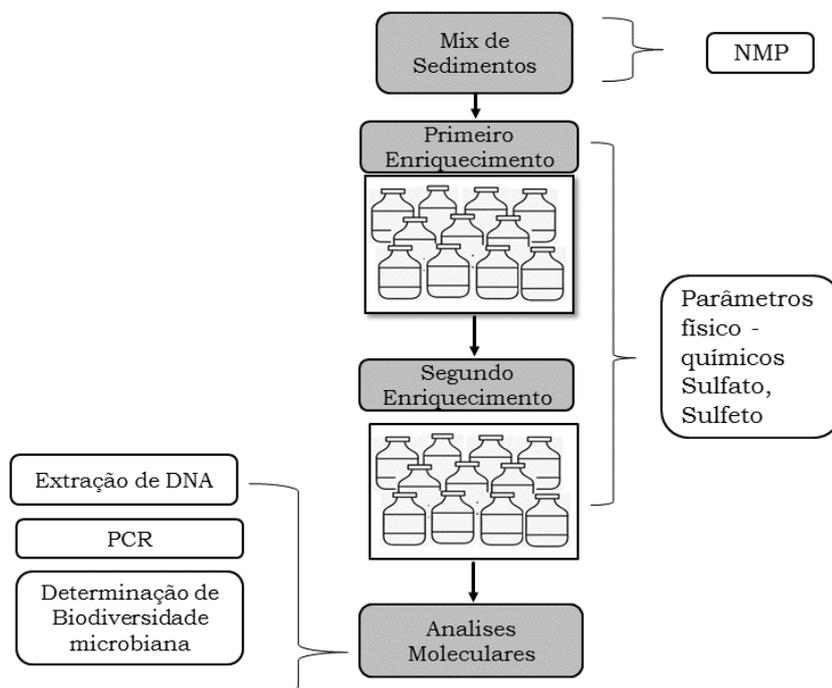
Fonte: Da autora (2019).

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foi realizado inicialmente um mix dos sedimentos coletados, com o objetivo de

potencializar nosso inóculo. A mistura dos sedimentos coletados consistiu de 20 mL de sedimento de cada ponto em 70 mL de solução anaeróbia de NaCl 0,9% (p/v), ao qual fluxionou-se nitrogênio gás durante 20 minutos para dar as condições anaeróbias. Na Figura 2 se observa os procedimentos de laboratório seguidos.

Figura 2. Fluxograma



Fonte: Da autora (2019).

## QUANTIFICAÇÃO ESTIMATIVA DAS COMUNIDADES DE BRS

Para a determinação concentração inicial de BRS, foi realizada uma quantificação através da técnica de Número Mais Provável (NMP).

Nessa técnica, utilizou-se um meio de cultura denominado Postgate C em pH 7,2 cuja composição tem como principal característica a abundância de íons sulfato ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,06 g/L;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  4,5 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,06 g/L; Lactato de Sódio 6 g/L; extrato de Levedura 1 g/L; citrato de Sódio 0,3 g/L; 1mL de solução de Resazurina) que favorece o crescimento de BRS (POSTGATE, 1984).

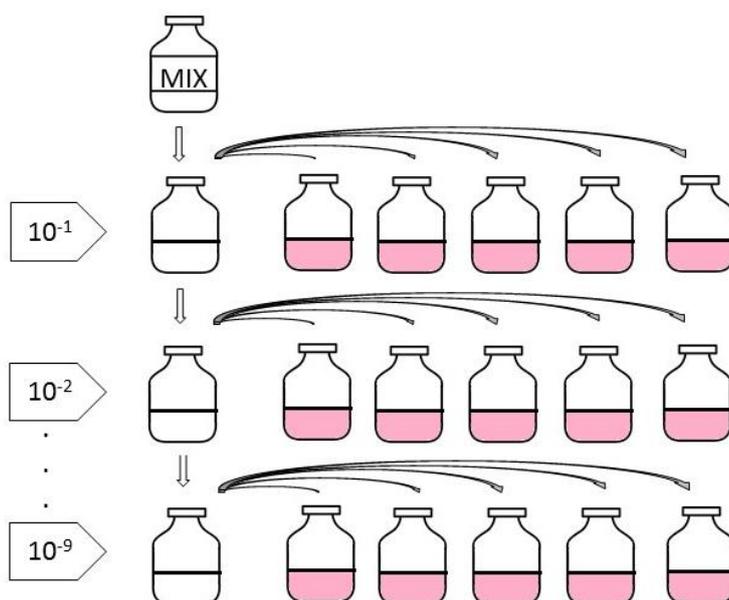
Foram utilizados frascos de antibiótico de 50 mL contendo: 8,8 mL de meio de cultura Postgate C; 0,1 mL das soluções de sulfato de sódio (0,4% m/v); 0,1 mL sulfato ferroso (1% m/v) e 1 mL de inóculo com um volume final de 10 mL.

Realizou-se uma diluição seriada do mix (1:10) em água de diluição

específica até a diluição  $10^{-9}$ .

Para a primeira diluição da série de NMPs, retirou-se uma alíquota de 1 mL do mix, e inóculou-se na água de diluição, continuando uma diluição seriada. Continuamente cada 1 mL de diluição foi inoculada em meio Postgate C em quintuplicada, como se observa na Figura 3, os frascos foram cultivados em condições anaeróbias à  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias.

Figura 3. Esquema de inoculação da técnica número mais provável



Fonte: Da autora (2019).

O crescimento de BRS foi verificado pela reação de sulfeto produzido nos reatores com a presença do sal ferroso dando origem a um precipitado preto que é o sulfeto de ferro, que causa a turbidez do meio de cultura. Quando isso ocorre, o crescimento de microrganismos é considerado positivo. Contando os frascos positivos em cada diluição de 1 ao 5 (já que, foi inoculado em cinco frascos para cada diluição), se conta os positivos de três diluições consecutivas, a combinação correspondente foi selecionada e o valor de NMP é obtido. Com esses dados, é possível calcular o valor de NMP para o experimento de acordo com a seguinte equação (APHA, 2012).

$$\frac{NMP}{100 \text{ mL}} = \text{valor de NMP (tabela)} \cdot \frac{10}{V} \quad (1)$$

Sendo V = menor diluição da série de combinações de tubos positivos.

## ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO DE BRS ACIDÓFILAS EM DIFERENTES PH E FONTES DE CARBONO

Os meios de enriquecimento foram baseados no protocolo de Stams et al. (1993) e Florentino et al. (2015). Esse meio foi composto pela combinação de um meio basal e soluções de metais e vitaminas descritas na tabela 2.

Tabela 2- Componentes de meio de Enriquecimento

<b>Solução</b>	<b>mL</b>
<b>Meio basal</b>	47,7
<b>Solução ácida</b>	0,05
<b>Solução alcalina</b>	0,05
<b>Solução de vitaminas</b>	0,01
<b>Fonte de carbono</b>	0,2
<b>Sulfato de Na 17 mM</b>	0,5
<b>Sulfato de Fe 36 mM</b>	0,5
<b>Inoculo</b>	1,0
	50 mL

Fonte: Baseados no protocolo de Stams et al. (1993) e Florentino et al. (2015)

O meio basal era composto de (g.L<sup>-1</sup>): 0,53 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0,41 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 NH<sub>4</sub>Cl; 0,11 CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O; 0,10 MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O; 0,3 NaCl; 0,1 BLL extrato de levadura; 1 mL solução de Resazurina 1%; 0,852 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

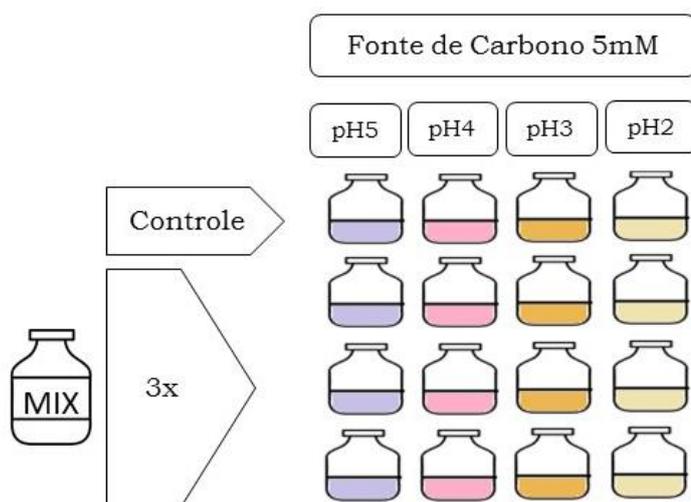
A solução ácida de elementos traços continha (g.L<sup>-1</sup>) 1,49 FeCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O; 0,062 H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 0,068 ZnCl<sub>2</sub>; 0,017 CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0,099 MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O; 0,119 CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O; 0,024 NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O; 1,825 mL HCl; Enquanto, a solução alcalina de elementos traços foi composta de (g.L<sup>-1</sup>) 0,0173 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; 0,033 Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>; 0,024 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,4 NaOH.

A solução de vitaminas foi formada por um mix de vitaminas, as quais são (g.L<sup>-1</sup>): 0,002 Biotina; 0,02 Niacina; 0,05 Piridoxina; 0,01 Riboflavina; 0,02 Tiamina; 0,01 Cianocobalamina; 0,01 ácido p-aminobenzóico; 0,01 ácido pantotênico. A solução redutora utilizada foi sulfeto de sódio 0.4% (p/v)

Os ensaios de enriquecimentos foram realizados sob anaerobiose em frascos fechados com septo de butila, lacrados e sob atmosfera de 1,5 atm N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v), para as condições dos enriquecimentos (fonte de carbono e pH), foram testadas 2 fontes de carbono, a saber: acetato e lactato (5mM concentração final) e o pH variou para o primer e segundo enriquecimento, cada condição teve um branco controle abiótico (sem inóculo) e os enriquecimentos foram realizados por triplicata.

A inoculação foi realizada com alíquotas de 1ml do mix de sedimentos apresentado anteriormente foram adicionadas como inóculo em cada frascos de antibióticos de 120 ml (reatores em batelada), preenchidos com 49 ml de meio de enriquecimento, como se representa no esquema da Figura 4.

Figura 4- Esquema dos ensaios de Enriquecimento



Fonte: Da autora (2019).

No primeiro enriquecimento, foram testados 4 diferentes pHs, (2, 3, 4 e 5). Os pHs foram ajustados com HCl antes da esterilização dos frascos com meios de cultivos. Para o segundo foram testados 3 diferentes pHs, (2, 3, e 4), com objetivo de aumentar a biomassa nessas condições. Para isso, alíquotas de 1.0 mL do primeiro enriquecimento foram utilizadas como inóculo.

Os enriquecimentos foram incubados estaticamente no escuro à 30°C por um período de 26 e 35 dias, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. O

monitoramento dos ensaios foi através de determinação de sulfato e sulfeto, seguindo os protocolos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012)

## CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA ENRIQUECIDAS POR SEQUENCIAMENTO DO GENE DO RDNA 16S

As amostras provenientes do segundo enriquecimento que obtiverem a melhores resultados de crescimento, foram escolhidas para análise da comunidade microbiana. Para isso, o DNA foi extraído com auxílio do KIT DNA Soil Extraction Mobio, seguindo as instruções do fabricante

A análise das sequências presentes foi realizada através de Hi-Seq. O DNA previamente extraído foi ajustado a uma concentração de  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  com auxílio de fluorímetro (Quibit® 2.0) para amplificação por PCR. A PCR foi feita em triplicata em um volume total de  $50 \mu\text{L}$  contendo tampão de PCR 1X HF, dNTPs  $0,2 \text{ mM}$ ,  $2 \text{ U} \mu\text{L}^{-1}$  de Phusion Hot start II DNA polimerase (Promega, Madison, WI),  $10 \mu\text{M}$  do primer 515F- 806R com diferentes “barcodes” para cada amostra,  $0,2\text{-}0,4 \text{ ng} \mu\text{L}^{-1}$  de DNA e água livre de nucleasse até o volume final. O programa de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação a  $98 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s, 25 ciclos de desnaturação a  $98 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 s, anelamento em  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 s e alongamento a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10s; e um passo de extensão final a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 min.

O tamanho dos produtos de PCR foi verificado por eletroforese num gel de agarose a 1% (p/v) contendo 1x SYBR® Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os produtos de PCR foram purificados com o MagBio Beads. Os produtos de PCR purificados foram misturados em quantidades equimolares numa concentração de DNA de  $100 \text{ ng} \mu\text{L}^{-1}$ . Os amplicones agrupados foram sequenciados usando Sequenciador do Genoma FLX em combinação com química de titânio (GATC-Biotech, Konstanz, Alemanha).

Todas as leituras de sequência foram processadas pelo pipeline de análise NGS SILVA rRNA (SILVAngs 1.0) (Quast, Pruesse et al., 2013). As leituras foram alinhadas usando o SINA v1.2.11 contra o SEDA SILR SSU rRNA e com qualidade controlada. Leituras idênticas foram identificadas, as leituras exclusivas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), aplicando critérios de identidade de 0,98. Para obtenção dos perfis taxonômicos, as sequências geradas

foram submetidas a análises computacionais utilizando o programa de bioinformática MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) e o programa Past3 para as análises multivariadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.1. QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE DE BRS

Os resultados encontrados no ensaio de quantificação das BRS presente no mix de sedimento através da técnica do NMP após o período de incubação (30 dias) podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados NMP de BRS provenientes do mix de Sedimentos da mina Osamu Utsumi.

	Diluições	Combinações Positivas	NMP/100ml	NMP (células /100mL)
<b>MIX INICIAL</b>	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-9</sup>	2-3-0	12	1.2 x 10 <sup>3</sup> /100mL

Fonte: Da autora (2019).

Os resultados indicam uma concentração de 1,2.10<sup>3</sup> NMP/100mL de BRS presente no mix de sedimentos das lagoas ácidas da INB e utilizado nos ensaios de enriquecimento. O valor observado foi muito superior aos obtidos por Benedetto et al. (2005) que realizaram um estudo das BRS utilizando amostras dos mesmos pontos do presente estudo na INB, mas a diferença de nosso trabalho, ele fez um análise separadamente, sem realizar um mix, e observou que os valores médios encontrados foram 1,95 NMP/mL; 0,2 NMP/mL; e 0,65 NMP/mL nos sedimentos das lagoas BF8, CM e BF4, respectivamente.

Baseado nessa técnica, observamos que comparando com o estudo anterior de Benedetto e colaboradores (2005) houve um aumento alto de BRS o que justifica que se nos juntamos os sedimentos das diferentes lagoas com diferentes características, vamos a ter um inóculo com maior potencial microbiano.

Pode indicar também uma adaptação da comunidade provavelmente devido a que são capazes de interatuar entre elas e sobreviver nessas condições, devido ao tempo de exposição prolongada de forma natural.

Esses resultados demonstram um potencial de sobrevivência presente nas amostras de sedimentos uma vez que já possível observar a presença de um número significativo de BRS e sua capacidade de sobreviver em condições extremas ao longo do tempo.

## ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO DE BRS ACIDÓFILAS EM DIFERENTES PHS E FONTES DE CARBONO

O crescimento das BRS nos reatores em batelada com as diferentes fontes de carbono (lactato e acetato) e diferentes valores de pH (2, 3, 4 e 5) foi monitorado através do consumo de sulfato e produção de sulfeto.

A Tabela 4 apresenta os resultados das médias das triplicatas realizadas no primeiro enriquecimento. A média das concentrações de sulfato inicial estiveram entorno de 576 mg/L para todos os reatores. Os resultados mostraram uma remoção de sulfato parecida nos pHs 5, 4 e 3 após 26 dias de incubação, chegando perto do 100% de remoção para lactato e acetato.

Esses resultados foram ótimos corroborando atividade microbiana em condições de pH baixo evidenciando o predomínio de microrganismos acidofílicos no sedimento. Por outro lado, embora não ter observado um crescimento visual no pH 2 houve uma remoção de sulfato sendo 35% para lactato e 44% para acetato, por isso se continuo um segundo enriquecimento nessa condição.

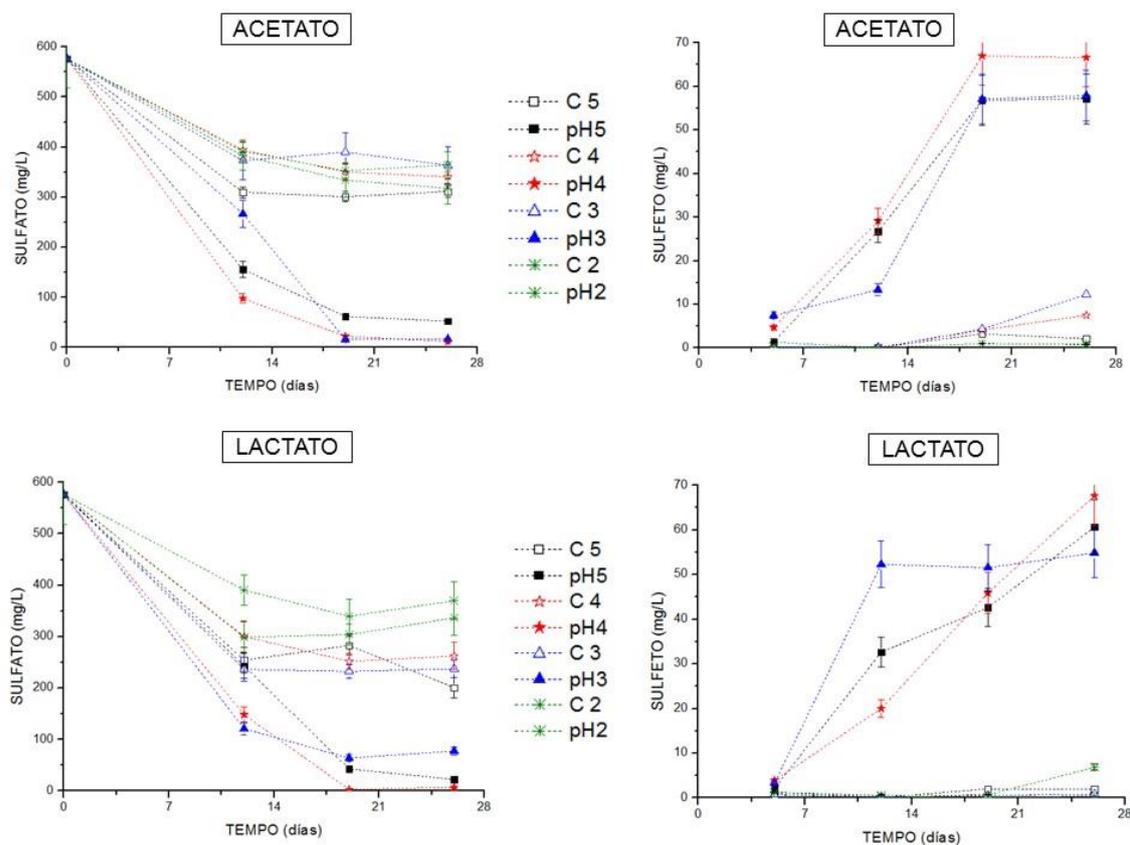
Tabela 4- Resultados das concentrações do sulfato e sulfeto (mg/L), obtidos pelos análises físico-químicos no primeiro enriquecimento.

Primeiro Enriquecimento - Concentração mg/L						
pH	Sulfato (mg/L)			Sulfeto (mg/L)		
	Inicial	Final	% Remoção	Final	mM	
<b>LACTATO</b>	pH 5	576± 57,6	22,2 ± 2,2	96,14 ± 9,6	60,66 ± 6,6	1,78 ± 0,18
	pH4	576± 57,6	7,27 ± 0,73	98,74 ± 9,8	67,68 ± 6,8	1,99 ± 0,2
	pH3	576± 57,6	77,63 ± 7,76	86,52 ± 8,6	54,87 ± 5,5	1,61± 0,16
	pH2	576± 57,6	369,9 ± 36,9	35,78 ± 3,6	6,9 ± 0,7	0,2 ± 0,02
<b>ACETATO</b>	pH 5	576± 57,6	52,47 ± 5,25	90,89 ± 9,1	57,18 ± 5,7	1,68 ± 0,17
	pH4	576± 57,6	11,88 ± 1,2	97,94 ± 9,8	66,6 ± 6,7	1,96 ± 0,2
	pH3	576± 57,6	16,94 ± 1,7	97,06 ± 9,7	57,9 ± 5,8	1,7 ± 0,17
	pH2	576± 57,6	318,04 ± 31,8	44,78 ± 4,5	0,774 ± 0,1	0,02 ± 0,01

Fonte: Da autora (2019).

Na Figura 5 é possível observar as concentrações de sulfato e sulfeto versus o tempo em dias de incubação, observando-se um consumo na concentração de sulfato os primeiros dezenove dias seguidos por uma fase de remoção mínima os dias seguintes.

Figura 5- Análises físico-químicas de sulfato e sulfeto - primeiro Enriquecimento



As figuras à esquerda mostram a remoção do sulfato, e a direita a produção de sulfeto do primeiro enriquecimento em pH 2,3,4 e 5 com os respectivos controles (C5, C4, C3, C2).

Fonte: Da autora (2019).

Observamos que nos resultados de remoção tanto para lactato como para acetato os valores de porcentagem de remoção ficaram muito próximo independente da fonte de carbono, e a produção de sulfeto também é parecido, não tem uma diferencia significativa entre as fontes de carbono nem os valores de pH.

No segundo ensaio de enriquecimento, os resultados mostram as concentrações iniciais de sulfato que foram medidas no dia da inoculação, os resultados da remoção de sulfato nos pHs de 4, 3 e 2 foram 67,5%; 63,5% e 38,9% para lactato; 55,7%; 57,3% e 0,44% para acetato, respectivamente. Os resultados podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5- Resultados das concentrações do sulfato e sulfeto (mg/L), obtidos pelos análises físico-químicos no segundo enriquecimento.

Segunda Etapa - Concentração mg/L						
		Sulfato (mg/L)			Sulfeto (mg/L)	
		Inicial	Final	% Remoção	Final	mM
<b>LACTATO</b>	pH4	494,59 ± 49,6	160,97 ± 16,1	67,45 ± 6,7	39,63 ± 3,96	<b>1,17 ± 0,117</b>
	pH3	301,13 ± 30,1	109,83 ± 11	63,53 ± 6,4	47,56 ± 4,8	<b>1,40 ± 0,14</b>
	pH2	213,19 ± 21,4	130,12 ± 13	38,96 ± 3,9	0,17 ± 0,02	<b>0,01 ± 0,001</b>
<b>ACETATO</b>	pH4	438,04 ± 43,8	194,3 ± 19,3	55,65 ± 5,6	43,62 ± 4,4	<b>1,28 ± 0,13</b>
	pH3	311,7 ± 31,2	133,1 ± 13,3	57,3 ± 5,7	30,36 ± 3,4	<b>0,89 ± 0,09</b>
	pH2	244,31 ± 24,43	243,23 ± 24,3	0,44 ± 0,04	0,27 ± 0,03	<b>0,008 ± 0,01</b>

Fonte: Da autora (2019).

Os segundos enriquecimentos demonstraram menor porcentagem de eficiência de remoção de sulfato em comparação com o primeiro enriquecimento provavelmente a devido que a quantidade de inóculo usado no segundo enriquecimento ter sido apenas 10% do primeiro enriquecimento, dessa maneira o número de bactérias presentes no inóculo foi menor assim como o consumo de sulfato.

Observamos uma remoção em pH 2 para lactato, mas não tem produção de sulfeto provavelmente a remoção de sulfato seja ao processo de adsorção da própria biomassa sem presença de atividade de BRS.

De acordo com a literatura, não era esperado uma atividade de BRS nos pH baixos devido a que, a maioria de BRS prosperam num ambiente anaeróbio perto da neutralidade, em uma faixa de pH de 6 - 8 (AYANGBENRO; OLANREWaju; BABALOLA, 2018; MUYZER; STAMS, 2008; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014a). No entanto, algumas BRS podem ser acidófilas e capazes de crescer também em pHs ácidos. Norris & Johnson (1998) descreveram como um acidófilo extremo, um microrganismo capaz de crescer em um pH ótimo em torno de 3, e acidófilos

moderados capazes de crescer otimamente entre pH 3 e 6. De acordo com a literatura, e os resultados de remoção de sulfato nesse estudo demonstraram, uma alta atividade de remoção nos pHs de 4 e 3, o que poderia indicar presença de BRS acidofílicas. Provavelmente devido ao fato de que o sedimento utilizado provir de lagoas ácidas com pH entorno de 3 - 4 resultou na seleção e enriquecimento de microrganismos acidofílicas que estiveram expostos à pH ácido por longo tempo.

Sanchez et al. (2014) foram capazes de isolar BRS acidófilas isoladas em condições de pH baixo, como a bactéria do gênero *Desulfosporosinus sp.* que foi isolada de um sedimento naturalmente ácido em Espanha. Florentino et al. (2017) também isolaram um gênero acidófilo, *Desulfurella sp.*, que cresceu em baixos intervalos de pH 3 e com tolerância a metais pesados, o que indica que é possível isolar bactérias acidófilas de ambientes naturalmente ácidos.

Os resultados obtidos da produção de sulfeto estão representados na tabela 6

Tabela 6- Resultados das concentrações de sulfeto (mM), obtidos pelos análises físico-químicos no primeiro e segundo enriquecimento.

<b>SULFETO</b>	<b>pH</b>	<b>Primeiro Enriquecimento</b>	<b>Segundo Enriquecimento</b>
<b>Concentração</b>		<b>mM</b>	<b>mM</b>
<b>LACTATO</b>	5	1,78 ± 0,18	-
	4	1,99 ± 0,2	1,17 ± 0,117
	3	1,61 ± 0,16	1,40 ± 0,14
	2	0,2 ± 0,02	0,01 ± 0,001
<b>ACETATO</b>	5	1,68 ± 0,17	-
	4	1,96 ± 0,2	1,28 ± 0,13
	3	1,7 ± 0,17	0,89 ± 0,09
	2	0,02 ± 0,01	0,008 ± 0,01

Fonte: Da autora (2019).

Com uma alta produção em pH 4 para lactato e acetato, no primeiro enriquecimento e no segundo enriquecimento tendo uma produção maior em pH 3 para lactato e 4 para acetato. Esses resultados corroboram com Florentino et al. (2015), que realizaram enriquecimentos para isolar BRS em pH baixos (2 a 5) com (hidrogênio, glicerol, metanol e acetato) como doadores de elétrons, detectando que os maiores níveis de produção de sulfeto foram em pH 3 para hidrogênio e pH 4 para acetato.

A produção de sulfeto apresenta um aspecto importante no tratamento de DAM, devido a que o sulfeto produzido pelas BRS é capaz de se ligar aos metais que também estão presentes nesse tipo de rejeito, formando sulfetos metálicos que são insolúveis e precipitam, essa precipitação facilita a remoção e possibilita, inclusive, sua reutilização como foi corroborado por Sahinkaya et al. (2015) avaliaram a redução de sulfato, As, Cu, Fe, Ni, e Zn através de um reator de fluxo ascendente anaeróbio, conseguindo a eliminação de sulfato em 99% e remoção de As entre 98% e 100% e 99% para Cu, Fe, Ni e Zn. Godoi et al. (2018) demonstraram uma precipitação e recuperação de sulfetos metálicos produzido em coletas periódicas no lodo após tratamento de drenagem ácida de minas num reator a escala laboratório, com metabolismo de BRS.

#### ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA ENRIQUECIDA (SEQUENCIAMENTO DO GENE DO RDNA 16S)

Para conhecer a microbiota envolvida em condições perto das características de uma drenagem ácida real, realizou-se um análise de diversidade em pH 3, já que se advertiu crescimento nos ensaios de enriquecimento, o estudo sobre caracterização da comunidade microbiana foi realizado em uma das amostras com maior precipitado de sulfeto de ferro observado nas duas fontes de carbono.

Foram sequenciadas uma média de 92.876 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A composição da comunidade mostrou que essas OTUs foram observados uma diversidade muito grande baseado na presença de 25 filos, 52 classes, 93 ordens e 496 gêneros.

Entre maior é a toxicidade da água residuária, maior vai ser a diversidade microbiana devido a que vai precisar de uma diversidade enzimática alta para quebrar todos os compostos presentes na água residuária, já que um só microrganismo não produz todas as enzimas necessárias para quebrar as moléculas complexas, por isso vai precisar de outros microrganismos para coexistir.

Essa riqueza que nós observamos justifica o presente trabalho considerando a característica do sedimento coletado com exposição de água ácida com metais e metaloides dissolvidos.

Para constatar que existia uma diversidade entre uma condição e outra, analisou-se um índice de diversidade muito utilizado que é o índice de Shannon que vai considerar a abundância de número de espécies avaliando o total de indivíduos.

A análise de diversidade através do índice de Shannon varia entre 0,5 e 5 (embora o valor normal está entre 2 – 3), o análise realizado mostrou uma diversidade média de  $1,76 \pm 0,26$  nos reatores que tiveram lactato e de  $1,48 \pm 0,13$  nos reatores que tiveram acetato como fonte de carbono.

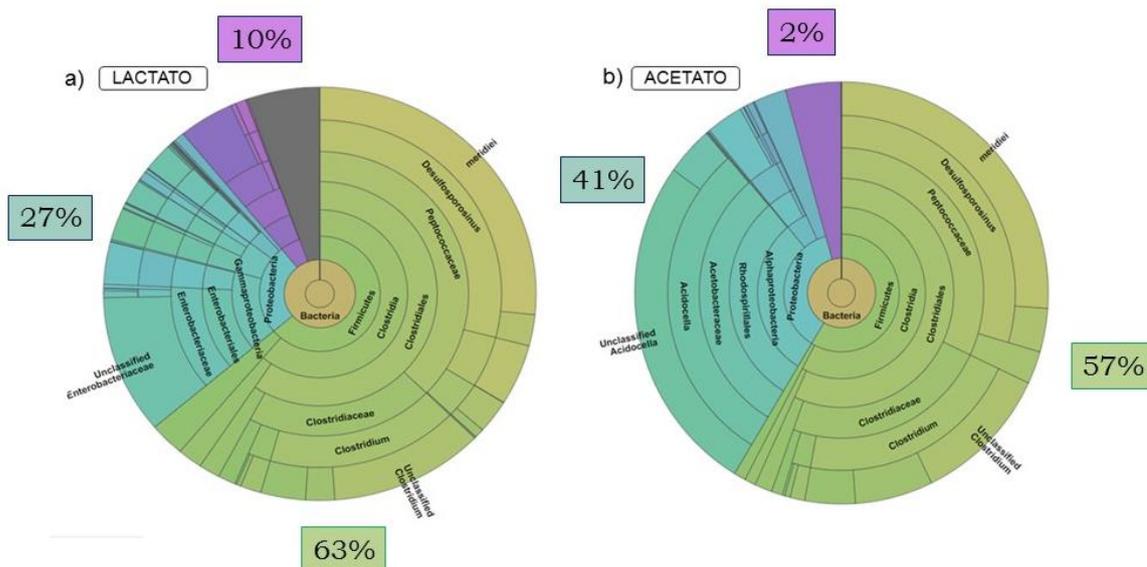
Os resultados apresentaram uma diversidade muito perto um do outro, relativamente maior para lactato, o que corrobora com a literatura, já que, diferentes estudos concluem que o lactato é preferencial como fonte de carbono para enriquecimentos de BRS.

As BRS podem utilizar mais de 100 substâncias orgânicas diferentes, embora demonstrou-se que o lactato é preferido como doador de elétrons (LEE; ROMANEK; WIEGEL, 2007, 2009; SONG et al., 1993; ZHAO; REN; WANG, 2008)

Por outro lado, Yong Jin et al. (2009) afirmaram que a espécie *Desulfosporosinus youngiae* isolada (cepa JW / YJL-B18T) preferiu lactato como fonte de carbono para reduzir fumarato, sulfato, sulfito e tiosulfato. Assim como, Zhao et al. (2008) analisaram o tratamento de águas residuárias sintéticas em um reator em batelada alimentado com lactato demonstrou uma eficiência de eliminação de sulfato de 99% e que os produtos finais principais foram sulfeto e acetato após de 20 dias.

Na Figura 6 é possível observar a composição filogenética mostrando de dentro para fora os grupos taxonômicos domínio, filo, ordem, família e gênero mais abundantes encontrados nas fontes de carbono lactato e acetato em pH 3.

Figura 6. Composição filogenética encontradas nas fontes de carbono em pH 3



Fonte: da autora

As diferentes tonalidades indicam os diferentes filos com maior predominância no filo *Firmicutes* (63%; 57%) para lactato e acetato respectivamente seguido por *Proteobacteria* com uma dominância de 27% para lactato e 41% para acetato, as bactérias não identificadas representaram o 10% em lactato e 2% em acetato.

As sequências encontradas no Filo *Firmicutes* apresentam maior abundância na classe *Clostridia*, sendo os gêneros, *Clostridium* spp. (8%; 14%), e *Desulfosporosinus* spp. (27%; 27%), como os mais abundantes, para lactato e acetato, respectivamente.

O gênero *Clostridium* são bacilos gram-positivos, estritamente anaeróbios, dentro da família *Clostridiaceae*, com células esféricas ou com formas ovaladas, geralmente quimiorganotróficas, podem metabolizar carboidratos, álcoois, aminoácidos, ou outros compostos orgânicos; algumas espécies fixam o nitrogênio atmosférico, e não são capazes de realizar redução dissimilatório de sulfato; a maioria de espécies são estritamente anaeróbios embora tem espécies com crescimento em presença de oxigênio (SPRING; ROSENZWEIG, 2006; WHITMAN et al., 2009).

Sánchez et al. (2011) observaram que a identificação de bactérias produtoras de  $H_2$ , como *Syntrophobacter* spp. e *Clostridium* spp., introduzem a possibilidade de um método biológico de produção desse gás.

Entretanto, algumas pesquisas falam que *Acetobacterium* e *Clostridium* são gêneros que abrangem espécies acetogênicas sintróficas com outras bactérias, (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014b). Esse fato corrobora com Yong Jin (2007) que isolou *Clostridium aciditolerans* (cepa JW/YJL-B3T), com diferentes fontes de carbono, mostrando que a cepa isolada produz acetato, butirato e etanol como produtos finais de fermentação a partir da glucose. Por outro lado, Florentino et al. (2015) descreveram a *Clostridium* e *Bacillus* como microrganismos fermentadores, enriquecidos notavelmente em acetato, o que apoia os resultados nesse estudo já que se obtiveram maior abundância do gênero *Clostridium* em acetato (14%) que em lactato (8%).

Por outro lado, o gênero *Desulfosporosinus spp.*, foi a BRS com maior abundância encontrado nos ensaios com lactato (27 %) e acetato (27%). Este gênero pertencentes à família *Peptococcaceae* são bacilos curvos, gram-variáveis (a maioria gram-negativo, mas também, alguns gram-positivos), estritamente anaeróbios, formadores de esporos (STACKEBRANDT, 2014).

Estudos prévios como, Sanchez et al. (2011) identificaram o gênero *Desulfosporosinus spp.*, no sedimento do Rio Tinto, como organismos extremamente anaeróbios, assim como, Whitman et al. (2009) afirmaram, que as *Desulfosporosinus spp.* estão envolvidas na redução de sulfato e tiosulfato em presença de lactato, mas não em acetato, pois são oxidadoras incompletas e o acetato é o produto final da fermentação. Alazard et al. (2010) isolaram, *Desulfosporosinus acidiphilus*, proveniente de sedimento de um tanque de decantação de DAM (pH 3) e também asseveraram que os substratos orgânicos testados foram oxidados de forma incompleta a acetato, e que o acetato não é utilizado como um substrato doador de elétrons.

Entretanto, o presente estudo demonstrou que esse gênero estava presente em uma alta abundância relativa (27%) nos ensaios com acetato, como fonte de carbono. Uma possível explicação para a ocorrência do gênero *Desulfosporosinus* em alta abundância, nos ensaios com acetato como doador de elétrons, é que este microrganismo apresenta a capacidade de crescer autotroficamente, utilizando o H<sub>2</sub> como doador de elétrons. Realmente das 8 espécies de *Desulfosporosinus* descritas até o momento, somente a *D. youngiae* e *D. hippei* não apresentam capacidade de utilizar o hidrogênio como doador de elétrons (ALAZARD et al., 2010; LEE; ROMANEK; WIEGEL, 2009; RAMAMOORTHY et al., 2006; ROBERTSON et al.,

2001; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014a).

Um outro fator importante que corrobora com esta proposição é a alta abundância do gênero *Acidocella* (39%) nos ensaios com acetato, e sua capacidade de resistir a diferentes concentrações de metais. A *Acidocella* é uma acetoclástica acidófila, gram-negativas, aeróbias, que pode crescer sintróficamente com bactérias sulfidogênicas acidolerantes em meios anaeróbios (GHOSH; MAHAPATRA; BANERJEE, 1997; HEDRICH; JOHNSON, 2014; JONES; HEDRICH; JOHNSON, 2013).

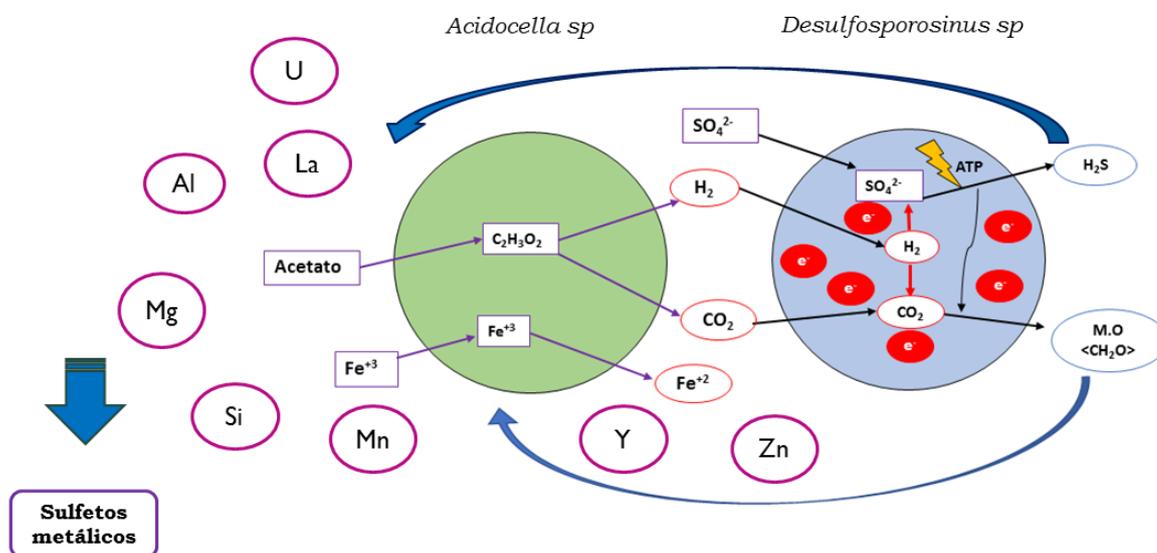
Ghosh (1997) indicou que a cepa heterótrofa acidófila GS19h do gênero *Acidocella* mostrou uma tolerância alta a  $\text{CdSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$ , com níveis variáveis de resistência a um ou mais de quatro metais: cádmio, cobre, níquel, e zinco, então é provável encontrar esse gênero em sedimentos com presença de metais como o inoculo do presente trabalho devido à resistência de esse gênero a diferentes metais.

Por outro lado, Hedrich & Johnson (2014) operaram um reator com glicerol e BRS para tratamento de DAM sintético, no processo observaram que as BRS predominantes foram do gênero *Desulfosporosinus*, que se sabe que é uma oxidante incompleta intervindo na eficiência do reator ao produzir ácido acético, para não perder a eficiência do reator adicionaram bactérias do gênero *Acidocella* que converteu o ácido acético em hidrogênio e dióxido de carbono, recuperando a eficiência do reator o que indica uma relação sintrófica com o gênero *Desulfosporosinus*.

Efetivamente, o sintrofismo entre microrganismos do gênero *Acidocella* e a *Desulfosporosinus* também foi advertido no presente trabalho, onde o acetato foi fornecido como doador de elétrons para o gênero *Acidocella*, metabolizado em  $\text{CO}_2$  e hidrogênio e o Fe férrico em Fe ferroso. A versatilidade metabólica de espécies de *Desulfosporosinus*, onde na ausência de matéria orgânica pode despertar a via quimioautotrófica utilizado  $\text{H}_2$  como doador de elétrons e o Sulfato como acceptor de elétrons. A energia gerada pela redução do sulfato é utilizada para transferência de elétrons reduzindo o  $\text{CO}_2$  à carbono orgânico e a redução de sulfato à sulfeto o qual pode reagir com os metais envolvidos no meio precipitando-os. (JONES; HEDRICH; JOHNSON, 2013).

Na Figura 7 é possível observar o esquema proposto da possível simbiose entre *Acidocella sp.* e *Desulfosporosinus sp.*, no presente trabalho.

Figura 7. Esquema proposto da simbiose entre *Acidocella sp.* e *Desulfosporosinus sp.*



Fonte: Da autora (2019).

Jones et al. (2013) observaram um co-cultivo de *Acidocella sp.* com uma bactéria sulfidogênica acidófila propondo uma associação simbiótica, o que apoia o presente estudo e por outro lado, Sánchez et al. (2014) advertiram que *Desulfosporosinus acididurans* poderia crescer em pH de 3 quando existisse consumo de acetato por microrganismos simbióticos. A prevalência desses dois gêneros no enriquecimento do presente estudo concorda com a possibilidade de uma simbiose.

No presente trabalho se observou uma abundância relativa de *Acidocella* em (39%) no reator com acetato que tem a possibilidade de fazer simbiose com outras bactérias sulfidogênicas, o que explica os resultados de abundância de *Desulfosporosinus* num 27%.

Por outro lado, as sequências dentro do filo *Proteobacteria* se filiaram a subgrupos diferentes de acordo com a fonte de carbono, nesse caso com o lactato temos maior abundância no subgrupo *Gammaproteobacteria* (4,4%), no entanto, em acetato o subgrupo abundante foi *Alphaproteobacteria* (40%) com uma importância do gênero *Acidocella spp.*, (39%) dentro da família de *Acetobacteraceae*, os

resultados notam que lactato apresenta maior diversidade de gêneros mas em contrapartida acetato que teve menor diversidade apresenta uma dominância superior.

Observou-se que dos 496 gêneros encontrados, 11% dos gêneros tiveram uma abundancia relativa acima de 0,1%. Tanto para lactato como para acetato, ressaltando a maior diversidade no lactato, dentro dos gêneros encontrados ressaltou-se a presença de 7 BRS (*Desulfosporosinus*, *Desulfomonile*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfatirhabdium*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*) para lactato e 5 BRS para acetato (*Desulfosporosinus*, *Desulfomonile*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Geobacter*).

Na tabela 7, observa-se os gêneros com maior abundancia relativa

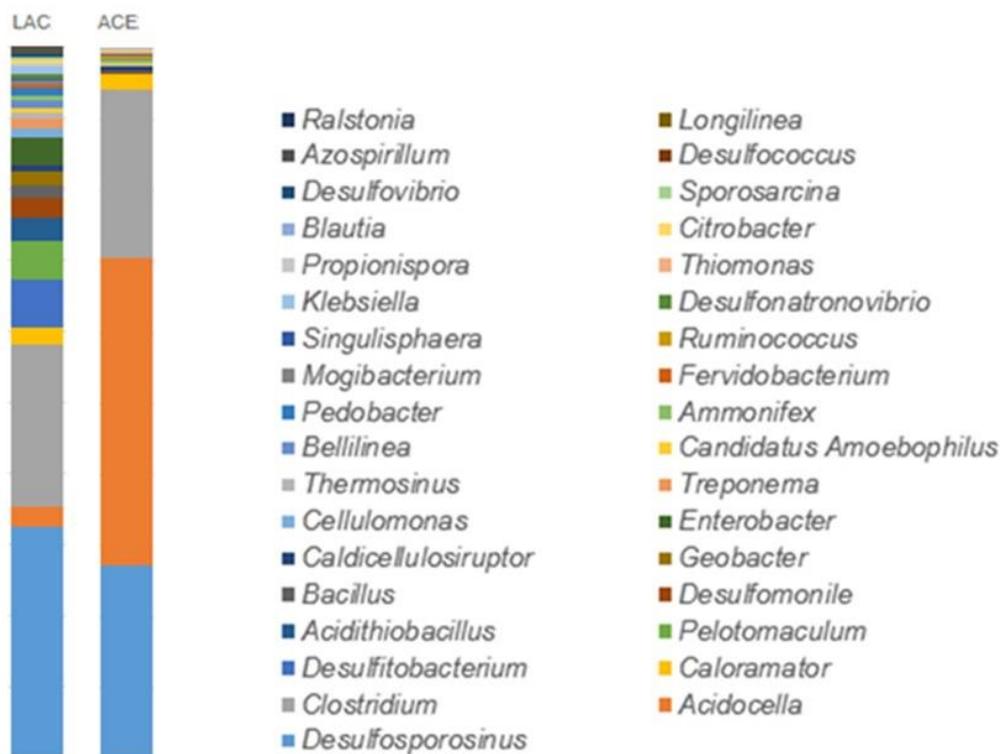
Tabela 7- Resultados de porcentagem de abundância relativa dos gêneros predominantes em lactato e acetato.

<b>GENERO</b>	<b>LACTATO (%)</b>	<b>ACETATO (%)</b>
<i>Acidocella</i>	9	39
<i>Desulfosporosinus</i>	27	27
<i>Clostridium</i>	8	14
<i>Cryptanaerobacter</i>	4	0.3
<i>Microbacter</i>	3	1.3
<i>Acidithiobacillus</i>	3	0.2
<i>Desulfomonile</i>	2	0.4
<i>Geobacter</i>	2	0.2
<i>Fonticella</i>	0.6	2
<i>Lutispora</i>	1.4	0.7
<i>Caloramator</i>	1.2	0.1
<i>Ruminiclostridium</i>	1.1	1.4
<i>Cellulomonas</i>	1.1	0.1
<i>Oxobacter</i>	1.0	0.8
<i>Desulfitobacterium</i>	0.7	0.1
<i>Desulfotomaculum</i>	0.0	0.1
<i>Desulfatirhabdium</i>	0.3	0.0
<i>Desulfovibrio</i>	0.2	0.0

Fonte: Da autora (2019).

Na Figura 8 podemos observar a biodiversidade dos gêneros abundantes para ambas fontes de carbono lactato e acetato, demonstrando a maior diversidade de gêneros no enriquecimento com lactato, com uma maior abundância em *Desulfosporosinus* (27%), *Clostridium*, (8%) e *Acidocella* (9%), enquanto em acetato houve maior abundância também do gênero *Desulfosporosinus* (27%), *Clostridium* (14%) e *Acidocella* (39%).

Figura 8. Diversidade microbiana dos enriquecimentos lactato e acetato em pH 3



Fonte: Da autora (2019).

Esse resultado novamente, confirmou com o fato do lactato ser um melhor doador de elétrons para enriquecimento de BRS (LEE; ROMANEK; WIEGEL, 2007; SONG et al., 1993). Um maior número de gêneros de BRS foi capaz de crescer com lactato como fonte de carbono, entre os mais importantes.

O gênero *Desulfitobacterium* (0,7% em lactato) contém a bactérias gram-positivas, com motilidade positiva, são bacilos ligeiramente curvos, formadoras de esporos, com um crescimento ótimo a 30 °C, numa faixa de pH de 6,5 até 7,5; podem crescer em acetato, fenol, tolueno, xileno como fontes de carbono e energia. (STACKEBRANDT, 2014), o que corrobora com Stams et al. (2013) afirmaram que

os gêneros de *Delsulfitobacterium* e *Desulfosporosinus*, representam bactérias que podem sobreviver na aridez durante meses, propriedade que faz dominar em condições adversas. Isto poderia explicar a presença nos sedimentos da mina de uranio Osamu Utsumi.

Também se identificou diferentes microrganismos implicados na oxidação de minerais que contêm ferro e sulfato para o crescimento como:

O gênero *Acidithiobacillus spp.*, (3% em lactato), são microrganismos quimiolíticos autótrofos que podem crescer a pH baixos, temperatura de 30°C, uma espécie destacada dentro desse gênero é *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que é um importante participante dos consórcios de microrganismos utilizados na recuperação industrial do cobre (biolixiviação ou biominificação). Ele prospera a um pH extremamente baixo (pH 1-2) e fixa carbono e nitrogênio na atmosfera. Solubiliza cobre e outros metais das rochas e desempenha um papel importante no ciclo biogeoquímico de nutrientes e metais em ambientes ácidos. (VALDÉS et al., 2008),

Florentino et al. (2016), reportaram *Acidithiobacillus ferrooxidans.*, como bactérias oxidadoras de enxofre com crescimento em pH mais baixo reportado até agora sendo de 1,3.

Por outro lado, *Thiomonas spp.* (0,4%) é um gênero que inclui neutrófilos e bactérias oxidantes de enxofre moderadamente acidófilas, conhecidas por oxidar o ferro ferroso (JOHNSON, 2003).

A presença desses gêneros poderia explicar outro tipo de sintrofia gerada para sobreviver em condições extremas nos sedimentos ácidos de mina.

## CONCLUSÕES

Os pHs 3, 4 e 5 apresentaram remoção de sulfato para ambas fontes de carbono, indicando que a microbiota presente foi acidofílicas.

A análise de diversidade demonstrou maior abundância de gêneros em lactato, entretanto a maior dominância de gêneros foi em acetato com *Desulfosporosinus* (27%), *Clostridium* (14%), *Acidocella* (39%).

Observou-se uma maior dominância dos gêneros *Acidocella* e *Desulfosporosinus* no enriquecimento com acetato como fonte de carbono, o que pode indicar uma sintrofia entre eles.

Se reportaram 7 gêneros de BRS para lactato e para o enriquecimento com

acetato obtivesse um reporte de 5 BRS.

Observou-se grande abundancia de BRS acidófilas com potencial para ser utilizadas no tratamento de DAM real empregando reatores em escala maior.

## REFERÊNCIAS

ALAZARD, D. et al. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp . nov .: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. **Extremophiles**, v. 14, p. 305–312, 2010.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

AYANGBENRO, A. S.; OLANREWaju, O. S.; BABALOLA, O. O. Sulfate-Reducing bacteria as an effective tool for sustainable acid mine bioremediation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–10, August 2018.

BENEDETTO, S. et al. Diagnostico do efluente ácido gerado na mina de uranio para subsidiar estudos de remediação biológica. In: ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E METALURGIA EXTRATIVA, 21., 2005, Natal. **Anais [...]**. Natal- RN, 2005. p. 64-68

CAMPBELL, K. M.; GALLEGOS, T. J.; LANDA, E. R. Applied geochemistry biogeochemical aspects of uranium mineralization, mining, milling, and remediation. **Applied Geochemistry**, v. 57, p. 206–235, 2015.

CIPRIANI, M. **Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio**. 2002. 332 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Administração e Política de Recursos Minerais) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.

COHEN, R. R. H. Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 1146–1157, 2006.

FERRAZ, R.M. **Efeito da origem do inóculo, do doador de elétrons e da imobilização em biorreatores**. 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2019.

FLORENTINO, A. P. et al. Sulfur reduction in acid rock drainage environments. **Environmental Science & Technology**, v. 49, 2015.

FLORENTINO, A. P. et al. Ecophysiology and application of acidophilic sulfur-reducing microorganisms. In: RAMPELOTTO, P.H. (Ed.). **Biotechnology of**

**extremophiles, grand challenges in biology and biotechnology.** Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 141–175.

GHOSH, S.; MAHAPATRA, N. R.; BANERJEE, P. C. Metal resistance in acidocella strains and plasmid-mediated transfer of this characteristic to *Acidiphilium multivorum* and *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4523–4527, 1997.

GIORDANI, A. **Avaliação do potencial de comunidades microbianas sulfato redutoras para tratamento de drenagem ácida de mina em reatores sulfetogênicos em escala de bancada.** 2017 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

GIORDANI, A. et al. Potential of autochthonous sulfate-reducing microbial communities for treating acid mine drainage in a bench-scale sulfidogenic reactor. **Minerals Engineering**, p. 32, 2019.

GODOI, D. et al. Down- flow fixed-structured bed reactor: an innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 597–604, 2017.

HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. Remediation and selective recovery of metals from acidic mine waters using novel modular bioreactors. **Environmental Science & Technology**, 2014.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. **Fems Microbiology Ecology**, v. 27, p. 307–317, 1998.

JOHNSON, D. B. Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines. **School of Biological Science**, p. 47–66, 2003.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of the Total Environment**, v. 338, p. 3–14, 2005.

JONES, R. M.; HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. *Acidocella aromatica* sp. nov. : an acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. **Extremophiles**, 2013.

LEE, Y.; ROMANEK, C. S.; WIEGEL, J. *Clostridium aciditolerans* sp. nov., an acid-tolerant spore-forming anaerobic bacterium from constructed wetland sediment. International. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 311–315, 2007.

LEE, Y.; ROMANEK, C. S.; WIEGEL, J. *Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a spore-forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2009, p. 2743–2746, 2009.

LEITE, C.; CARDOSO, L.; MELLO, J. Use of steel slag to neutralize Acid Mine Drainage (AMD) in sulfidic material from a uranium mine. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 37, p. 804–811, 2013.

LÓPEZ PAMO, E.; O, A.; BARETTINO, D. Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina : estado actual y perspectivas de futuro. Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. **Boletín Geológico y Minero**, v. 113, n.1, p. 3-21, 2002.

MIEKELEY, N. et al. Rare-earth elements in groundwaters from the Osamu Utsumi mine and Morro do Ferro analogue study sites, Poços de Caldas, Brazil. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 45, p. 365–387, 1992.

MKANDAWIRE, M. Biogeochemical behaviour and bioremediation of uranium in waters of abandoned mines. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 20, p. 7740–7767, 2013.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature**, p. 441–454, 2008.

NÓBREGA, F. A.; LIMA, H. M. DE; LEITE, A. DO L. Análise de múltiplas variáveis no fechamento de mina - Estudo de caso da pilha de estéril BF-4, Mina Osamu Utsumi, INB Caldas, Minas Gerais. **R. Esc. Minas**, v. 61, n. 2, p. 197–202, 2008.

NOGUEIRA, E. W. et al. Biological treatment removal of rare earth elements and yttrium (REY) and other metals from actual acid mine drainage. In: IWA WORLD CONFERENCE ON ANAEROBIC DIGESTION, 16., 2019, Holanda. **Anais [...]**. Holanda, 2019.

NORRIS, P.; JOHNSON, D. Acidophilic microorganisms. In: HORIKOSHI, K.; GRANT, W. D. (Ed.). **Extremophiles: microbial life in extreme environments**. New York: Wiley-Liss, 1998. p. 133–153.

POSTGATE, J. R. **The Sulfate-Reducing Bacteria**. 2nd. ed. Cambridge: University Press, 1984.

PEROSSI, M. et al. Long-term performance of a UASB reactor treating acid mine drainage: effects of sulfate loading rate, hydraulic retention time , and COD / SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio. **Biodegradation**, 2018.

RAMAMOORTHY, S. et al. Desulfosporosinus lacus sp . nov ., a sulfate- reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2729–2736, 2006.

ROBERTSON, W. J. et al. Desulfosporosinus meridiei sp. nov., a spore- forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 133–140, 2001.

RODRIGUEZ, R. P. **Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas**. 2010. 174 f. Tese (Doutorado-Programa

de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade São Paulo, São Carlos, 2010.

RODRIGUEZ, R. P.; ZAIAT, M. Influence of carbon source and inoculum type on anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam in reactors fed with acid mine drainage. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5060–5065, 2011.

SAHINKAYA, E. et al. Biotreatment of As-containing simulated acid mine drainage using laboratory scale sulfate reducing upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Minerals Engineering**, v. 75, p. 133–139, 2015.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6085–6093, 2011.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 672–678, 2013.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Desulfosporosinus acidurans sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. **Extremophiles**, 2014a.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, n. 3, p. 98–109, 2014b.

SCHLOSS, P.D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, p. 7537-7541, 2009

SONG, Y.-C. et al. Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 187–194, 1998.

SPRING, S.; ROSENZWEIG, F. The genera Desulfitobacterium and Desulfosporosinus: taxonomy. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3rd. ed. Singapore: Springer, 2006. p. 771–786.

STACKEBRANDT, E. The Emended Family Peptococcaceae and Description of the Families Desulfitobacteriaceae, Desulfotomaculaceae, and Thermincolaceae. In: ROSENBERG, E. et al. (Ed.). **The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes**. Germany: Springer International Publishing, 2014. p. 285-290.

STAMS, A. J. M. et al. Growth of Syntrophic Propionate-Oxidizing Bacteria with Fumarate in the Absence of Methanogenic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1114–1119, 1993.

VALDÉS, J. et al. Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism : from genome sequence to industrial applications. **BMC Genomics**, v. 9, n. 597, p. 1–24, 2008.

WHITMAN, W. B. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer International Publishing, 2009. v. 3.

ZHAO, Y.; REN, N.; WANG, A. Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. **Chemosphere**, v. 72, p. 233–242, 2008.

## ANEXO A – Artigo Congresso



**16<sup>TH</sup>**  
**IWA World Conference**  
 on Anaerobic Digestion  
 Accelerating natural cycles with anaerobic digestion

### Biological treatment removal of rare earth elements and yttrium (REY) and other metals from actual acid mine drainage

E W Nogueira\*, F M Licona\*\*, L A G Godoi\*, G Brucha\*\* and M H R Z Damianovic\*

\* Biological Processes Laboratory (LPB), São Carlos School of Engineering (EESC), University of São Paulo (USP), Av. João Dagnone, 1100, Santa Angelina, São Carlos, São Paulo, 13563-120, Brazil, email: eliswn@usp.br; leandro.godoi86@gmail.com; mdamianovic@sc.usp.br

\*\* Universidade Federal de Alfenas, Rodovia José Aurélio Vilela, 11999 (BR 267 Km 533) Cidade Universitária Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil, email: frecia95@hotmail.com; gunther.brucha@gmail.com

**Abstract:** An actual acid mine drainage (AMD) containing high concentration of sulfate (~1000 mg.l<sup>-1</sup>), dissolved metals, rare earth elements and yttrium (REY) was treated using down-flow fixed-structured bed biological reactor. The reactor was operated as a continuous flow for 175 days and temperature maintained to 30°C. Sugarcane vinasse was used as electron donor and influent pH of the reactor varied from 4.7 to 6.9. REY elements and transition metals was removed from the real AMD and precipitated in the down-flow fixed-structured bed reactor (DFSBR). Sulfate reduction achieved 67± 22% in Phase II and COD removal was superior to 56% in Phases I and II. Removal of La, Ce, Pr, Nd, Sm and Y was higher than 70% in both Phases II and III while Fe, Al, Si and Mn were removed with efficiencies of 79, 67, 48 and 25%, respectively. The results highlighted the robustness of this bioreactor configuration and opened perspectives for simultaneous sulfate-reduction and metal and REY recovery in a single-unity.

**Keywords:** Actual acid mine water; rare earth elements and yttrium; sulfidogenic bioreactor; sulfate reduction.

#### Introduction

Due to the high economic value, wide use of rare earth elements and yttrium (REY) in the various technological applicability and the extensive use of these elements by countries such as China, which now hold the majority of the REY production, there is a huge search for these elements. The presence of REY is abundant in acid mine drainage (AMD) and coal mine drainage (CMD), and the lowest pH of AMD, the highest is the concentration of REY and other metals such as Al, Mn, Cu and Zn released in the water (Cravotta, 2008; Stewart et al., 2017).

Acid mine drainage (AMD) is a serious environmental problem that affects aquatic and terrestrial ecosystems, as well as the human health. AMD is characterized as a low pH wastewater with high concentrations of sulfate and several metals. The problems associated with its inadequate disposal and the lack of treatment and recovery of metals represent an environmental challenge that can be aggravated by extensive disasters, such as occurred in Mariana-MG, Brazil (Hatje et al., 2017).

The flow rate of AMD generation in the city of Caldas - MG - Brazil can reach 160 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> in the rainy season. First described by Miekeley et al. (1992), due to the low pH around 3.3, the AMD used in this work are characterized with a high concentration of dissolved metals including high concentrations of REY, and may range from 0.5 to 71 mg.L<sup>-1</sup>. Based on the results found in the literature for the passive treatment of AMD, the objective of this work was to remove metals

Al, Fe, Mn, Si and REY from actual AMD using sulfidogenic bioreactor to precipitate metals due the generation of alkalinity from sulfate reduction in the system and neutralization of AMD.

## Material and Methods

### Bioreactor configuration

The DFSBR (Godoi et al., 2017a) was operated at 30 °C with HRT varying between 16 and 18.5 h (total volume of 1.9 L). The reactor was operated during 175 days distributed in four operational phases.

### Mine waters

The actual mine water was collected from an uranium mine deactivated in 1998 named BNF (BF4) located in Caldas, South Minas Gerais state, Brazil and operated by Industrias Nucleares Brasileiras (INB). It has been characterized with high concentration of dissolved transition metals and the highest concentration of REY in AMD described (Cravotta, 2008). The pH of the mine water was around 3 and the concentration of main elements are described in Table 1.

Table 1: Characterization of the actual mine water used for biological treatment.

Element	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )	REY	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )
Al	131.5 ± 6.6	La	40.1
Mn	75.6 ± 9.6	Ce	24.9
Fe	1.2 ± 0.1	Pr	3.6
Zn	10.9 ± 0.7	Nd	9.55
Mg	6.1 ± 0.4	U	4.15 ± 0.2
Si	17.2 ± 5.6	Y	4.10 ± 0.4
SO <sub>4</sub>	890±80		

### Wastewater and carbon source

The sugarcane vinasse, a waste material from ethanol production, was used as a carbon source to sulfate reduction and its composition is described (Table 2).

Table 2: Characterization of the sugarcane vinasse used as a carbon source.

Analyte	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )	Analyte	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )
Al	5.84	Cu	0.366
Mn	23.28	Ti	0.228
Fe	134.1	Ni	0.204
Zn	1.48	P	147.4
Mg	1907	S	2418
Si	53.5	Ca	1614
SO <sub>4</sub>	2400	COD	15.10 <sup>4</sup>

### Operational parameters

During the Phase I the bioreactor was fed with a mixture of sugarcane vinasse and a synthetic wastewater with high concentration of sulfate in order to adapt the sulfate-reducing biomass. During Phases II, III and IV the synthetic wastewater was gradually replaced by a real AMD until reach 20 % (Phase II), 50%(Phase III) and 75% (Phase IV) of the treated volume and the COD:Sulfate ratio applied ranged from 1.5 ± 0.4 to 1.8 ± 0.5. The influent pH in the start-up phase (treating synthetic sulfate-rich

wastewater) was  $6.9 \pm 0.6$ , whereas after the application of the real AMD, the influent pH was adjusted with NaOH and varied between 4.6 and 5.4 (Table 3). The solid precipitated were collected three times between the operational phases and sulfate and metal analyses conducted.

Table 3: Mean values of pH and influent of sulfate, COD and metals in DFSBR.

Phases	I (41 d)	II (18 d)	III (71 d)	IV (64 d)
Sulfate (mg.L <sup>-1</sup> )	980±180	1150±71	1020±70	985±144
COD (mg.L <sup>-1</sup> )	1530±556	2000±111	1980±519	1770±450
COD:Sulfate ratio	1.5±0.4	1.7±0.2	2.1±0.7	1.8±0.5
Influent pH	6.9±0.6	5.4±0.2	5.1±0.1	4.6±0.2
Influent (mg.L <sup>-1</sup> ) of:				
Al	-	25±11	71±27	96±18
Fe	-	8±4	11±8	6±2
Mn	-	15±2	31±2	62±5
Si	-	8±3	12±5	11±2
La	-	8±4	18±6	29±10
Ce	-	6±3	14±6	18±6
Pr	-	0.4±0.3	1±0.4	3±0.4
Nd	-	2±1	5±2	7±3
Sm	-	0.2±0.1	0.6±0.3	0.8±0.3
Y	-	0.8±0.5	2±0.7	3.2±0.4
U	-	1±0.6	3.7±2	3.2±1.4

### Analytical methods

The concentration of COD, sulfide and alkalinity were determined according to Standard Methods (APHA, 2005) and pH of the unfiltered samples was measured immediately after collection. Filtered samples were acidified with HNO<sub>3</sub> for the analysis of sulfate and major elements by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES).

## **Results and Discussion**

### COD and sulfate removal

The COD oxidation was achieved more efficiently in the first operational phase with  $62 \pm 14\%$  when the synthetic water was treated. During the Phase II, with 20% of real AMD, sulfate reduction and COD removal reached  $67 \pm 22\%$  and  $56 \pm 6\%$ , respectively (Figure 1). Although the low concentration of AMD didn't affect the performance at the beginning, in the middle of Phase III the COD removal was around 30% and very instable. The higher concentration of dissolved metals and the low pH (around 5) in Phase III and IV (50% and 75% of AMD) could be affected by the sulfidogenesis and both COD removal and sulfate reduction efficiencies dropped to 20% and  $10 \pm 10\%$ , respectively.

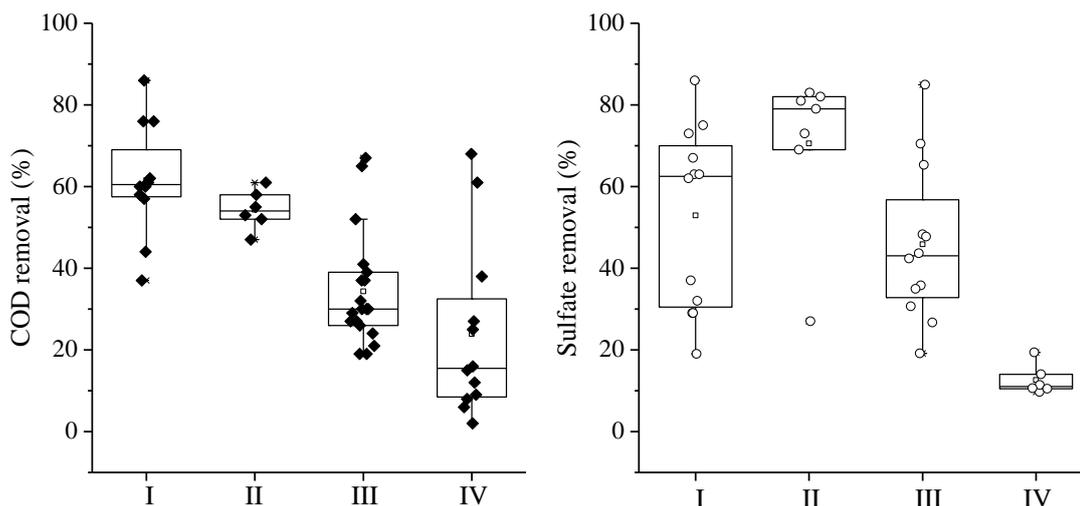


Figure 1- Boxplot analysis of COD removal (a) and sulfate removal (b) at different phases.

In the Phase I the sulfidogenesis was established in the system and sulfate reduction average was  $53 \pm 22\%$ , reaching 87% in the last few days and produced  $129 \pm 12 \text{ mg.L}^{-1}$  of dissolved sulfide. Sulfide concentration also decreased from  $210 \text{ mg.L}^{-1}$  in Phase II to  $117 \text{ mg.L}^{-1}$  in Phase III. Due low sulfate reduction, less than  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  of sulfide was generated in the system in Phase IV, when the sulfidogenesis was several affected and the sulfate concentration outflow remained instable.

The alkalinity produced due to sulfate reduction increased pH from 7 to 7.5 in Phase I, 5.4 to 7.4 in Phase II, from 5 to 6.4 in Phase III and from 4.7 to 5.2 in Phase IV (Figure 1.1). In Phase I (absence of dissolved metals)  $1456 \pm 190 \text{ mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$  was produced and although the addition of AMD did not affected sulfate reduction in Phase II, the alkalinity decreased to  $1331 \pm 96 \text{ mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$ . It is probably related with release of protons caused by the metal sulfide precipitation and the HS- consumption due metals sulfide precipitation form (Godoi et al., 2017b). During the Phase III, with an increasing in concentration of metals and the decreased efficiency of sulfate reduction, the alkalinity production dropped to  $629 \pm 287 \text{ mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$ . The IA/PA ratio (intermediary alkalinity / partial alkalinity) increased from  $0.4 \pm 0.1$  (Phase I and II) to  $0.7 \pm 0.4$  in Phase III, demonstrating the instability of the anaerobic digestion.

#### REY and metals removal from actual mine water

The treatment of 75% of actual AMD with high content of metals dissolved was possible due the establishment of sulfidogenesis in the first phase. The removal of transition metals and REY are presented in Figure 2 and Figure 3, respectively, and such results are probably due the increasing of internal pH in the system, making possible the metals precipitation in the DFSBR.

Although Mn precipitate around pH 9 (Ayora et al., 2016), during the Phase II and III the treatment was capable to remove an average amount of 35 and 20%, respectively, when outflow pH was higher than 6, but in the Phase IV when the pH drop to less than 6, Mn release in dissolved fraction. The incipient removal of Mn is probably due to higher solubility product ( $K_{sp}$ ) of MnS compared to other sulfides and the complexity of the interactions governing Mn solubility (Bekmezci et al., 2011). The element Al and Fe, widely associated with AMD (Sun et al., 2012; Ayora et al., 2016; Kefeni et al., 2017), presented similar behavior with efficiency removal around 70% in phases II and III but dropped in the last phase to less than 40%. According to Aluminium pKa, pH between 1.5 and 6 the Al speciation in AMD is presented as sulfate complexes and above it, it is present as hydroxide complexes (Sánchez-Espaná 2007) and Falagán et al., 2017 found the Al in a hydroxysulfate form and other forms under pH 5. The high concentration of dissolved sulfide generated in the medium probably favored the formation of metal sulfide, precipitating partially with transition metals.

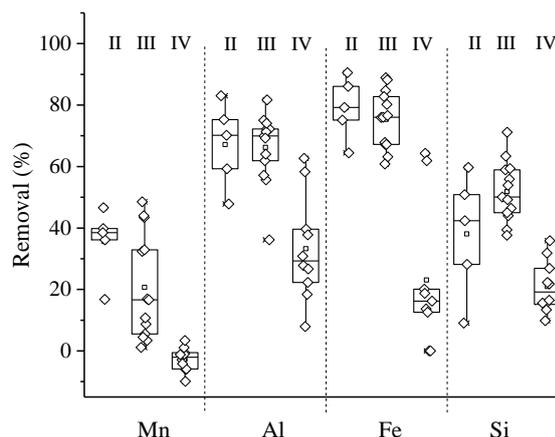


Figure 2: Boxplot analysis of transition metals removal in Phases II, III and IV.

Regarding REY, La, Ce, Nd and Y were removed with average value superior to 70% and Pr and Sm superior to 80% in Phase II (Figure 3). Comparing to another AMD and coal mine drainage (CMD) with REY compositions, the DFSBR was able to treat the highest concentration of REY ever described (Miekeley et al., 1992; Zhao et al., 2007; Sun et al., 2012 and Stewart et al., 2017). The obtained removal of REY suggests that they could be coprecipitated with aluminum or ferric iron (Stewart et al., 2017) or directly as  $\text{RE}(\text{OH})_3$  (Ziemkiewicz et al., 2016). The uranium behavior differs to the other elements and its efficiency removal increased throughout the treatment. Although great results were achieved in Phases II and III, with 75% of actual mine water the efficiency started to decline until the bioreactor collapsed. This collapse can be related with both: inflow pH drop and high concentration of metals.

REY and other metals were efficiently removed and after each discharge of the biomass precipitated analysis was possible to confirm that they accumulated in their solid phase at the bottom conical shape of the bioreactor.

According to Zhao et al., 2007, the speciation modeling for the AMD samples indicated that the rare earth elements (REE) sulfate complexes are the main form of dissolved REE concentration in mine waters, representing more than 60% of total amount, followed by free metal species form. The high concentration of REY and sulfate and low pH of actual AMD treated in the present study suggest that the main formation of dissolved REY was probably represented by sulfate-form due its stable form. Once the sulfidogenesis was established and the internal pH increased, it made possible the precipitation of REY elements.

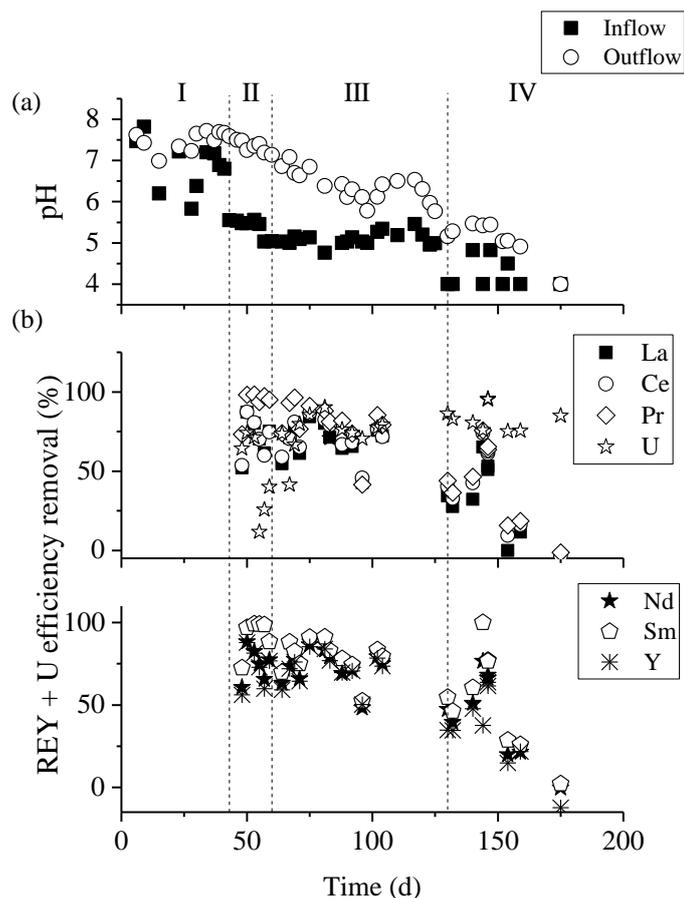


Figure 3: Inflow and outflow pH (a), REY and U removal from the dissolved fraction (b).

Based on the concentration of REY elements in the currently mine water (Table 1) and estimating that with anaerobic treatment 50% of total REY can precipitate in the bioreactor, to each 100 m<sup>3</sup> of AMD treated 4, 1, 0.5, 0.2 kg of La, Ce, Nd and Y, respectively, could be recovery. The price of Lanthanum oxide, Cerium oxide, Neodymium oxide and Yttrium oxide in 2018 was around 2, 2, 51 and 3 US\$.kg<sup>-1</sup>, respectively (U.S. Geological Survey, 2018). The price of REY can achieve more than 500 times the price of iron ore, for example, and yttrium is the most valuable REY element analyzed in this study. More than 2400 m<sup>3</sup> of AMD is generated per day at BF4 and this volume is higher during the running seasons. Currently, the company has been spending more than 200 thousands of dollar with chemicals to increase the pH and neutralize the mine water in order to comply the environmental laws. In addition to the environmental advantage, the biological treatment has economic benefits as well and looks promising to recovery valuable elements from AMD.

## Conclusion

The wastewater vinasse used as a carbon source for the biological treatment of actual AMD enabled the sulfidogenesis in the bioreactor. The alkalinity generated by sulfidogenesis was capable to increase the pH and remove the metals Al, Fe, Mn, Si, U and REY elements from dissolved phase. The chemical elements precipitated and accumulated in the bottom conical part of the bioreactor. It's conical shape in the bottom facilitated the discharge of biomass and metals accumulated after each phase.

This is the first study described using a sulfidogenic bioreactor to treat actual vinasse and actual AMD rich in REY and uranium, two wastewater, that was capable to remove efficiently valuable chemical elements.

The results highlighted the robustness of this bioreactor configuration and opened perspectives

for simultaneous sulfate-reduction and metal and REY recovery in a single-unity.

## References

- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed. DC, Washington.
- Ayora, C., Macías, F., Torres, E., Lozano, A., Carrero, S., Nieto, J.M., Pérez-López, R., Fernández-Martínez, A., Castillo-Michel, H. 2016 Recovery of rare earth elements and yttrium from passive-remediation systems of acid mine drainage. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 8255–8262. DOI: 10.1021/acs.est.6b02084
- Bekmezci, O.K., Ucar, D., Kaksonen, A. H., Sahinkaya, E. 2011 Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. *J. Hazard.Mater*, **189**, 670–676. DOI:10.1016/j.jhazmat.2011.01.087
- Cravotta III, C. A. 2008 Dissolved metals and associated constituents in abandoned coalmine discharges, Pennsylvania, USA. Part I: Constituents quantities and correlations. *Appl. Geochem.*, **23**, 166–202. DOI:10.1016/j.apgeochem.2007.10.011
- Falagán, C., Yusta, I., Sánchez-españa, J., Johnson, D. B. 2017 Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. *Minerals Engineering*, **106**, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.09.028>
- Godoi, L.A.G.; Foresti, E.; Damianovic, M.H.R.Z. 2017a Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. *J. Environ. Manage.*, **197**, 597–604.
- Godoi, L.A.G.; Dos Santos, C. E. D., Foresti, E.; Damianovic, M.H.R.Z. 2017b Evaluating and refining alkalinity calculations dueto sulfide and bicarbonate accessed by titration in anaerobic sulfate-reducing bioreactors. *Water Air Soil Pollut.* **228**, 322. DOI 10.1007/s11270-017-3518-y
- Hatje, V., Pedreira, R.M.A, Rezende, C. E., Schettini, C.A.F, Souza, G.C, Marin, D.C, Hackspacher, P.C. 2017 The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific Reports*, **7**: 10706. DOI:10.1038/s41598-017-11143-x
- Kefeni, K. K., Msagati T. A. M., Manba, B. B. 2017 Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. *Journal of Cleaner Production*, **151**, 475–493.
- Miekeley, N., Coutinho de Jesus, H., Porto da Silveira, C.L. 1992 Rare earth elements in groundwater from the Osamu Utsumi mine and Morro do Ferro analogue study sites, Poços de Caldas, Brazil. *J. Geochem. Explor.*, **45**, 365–387.
- Sánchez-España, J. 2007 The Behavior of Iron and Aluminum in Acid Mine Drainage, (December 2007). <https://doi.org/10.1016/B978-044452707-3/50009-4>
- Stewart, B.W., Capo, R.C., Hedin, B.C., Hedin, R.S. 2017 Rare earth element resources in coal mine drainage and treatment precipitates in the Appalachian Basin, USA, *Int. J. Coal Geol.*, **169**, 28–39.
- Sun, H., Zhao, F., Zhang, M. and Lin, P. 2012 Behavior of rare earth elements in acid coal mine drainage in Shanxi Province, China. *Environ. Earth Sci.*, **67**, 205–213. DOI 10.1007/s12665-011-1497-7
- Zhao, F., Cong, Z., Sun, H. and Ren, D. 2007 The geochemistry of rare earth elements (REE) in acid mine drainage from the Sitai coal mine, Shanxi Province, North China. *Int. J. Coal Geol.*, **70**, 184–192.
- Ziemkiewicz, P., He, T., Noble, A. and Liu, X. 2016 Recovery of rare earth elements (REEs) from coal mine drainage. Proc. 37th W. Virginia Surface mine Drainage Task Force Symposium :pp. 43–50. <https://wvmdtaskforce.com/past-symposium-papers/2016-symposium-papers/>.