

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAEL MARÇAL FERRAZ

**EFEITO DA ORIGEM DO INÓCULO, DO DOADOR DE  
ELÉTRONS E DA IMOBILIZAÇÃO EM BIORREACTORES  
SULFETOGENÍCOS ACIDOFÍLICOS**

Poços de Caldas/MG

2019

RAFAEL MARÇAL FERRAZ

**EFEITO DA ORIGEM DO INÓCULO, DO DOADOR DE ELÉTRONS E DA  
IMOBILIZAÇÃO EM BIORREATORES SULFETOGÊNICOS ACIDOFÍLICOS**

Dissertação apresentada  
como parte dos requisitos  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciência e  
Engenharia Ambiental pela  
Universidade Federal de  
Alfenas *campus* Poços de  
Caldas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata  
Piacentini Rodriguez

Poços de Caldas/MG

2019

F381e Ferraz, Rafael Marçal.

Efeito da origem do inóculo, do doador de elétrons e da  
imobilização em biorreatores sulfetogênicos acidofílicos / Rafael  
Marçal Ferraz . -- Poços de Caldas/MG, 2019.

94 f. –

Orientador(a): Renata Piacentini Rodriguez.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) –  
Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.

Bibliografia.

1. Águas residuais – Tratamento biológico. 2. Lactato. 3. Etanol. I.  
Rodriguez, Renata Piacentini. II. Título.

CDD – 628.16

**RAFAEL MARÇAL FERRAZ**

**EFEITO DA ORIGEM DO INÓCULO, DO DOADOR DE ELÉTRONS E  
DA IMOBILIZAÇÃO EM BIORREATORES SULFETOGENICOS  
ACIDOFÍLICOS**

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.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2019.



Prof (a) Dr (a). Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL



Prof (a) Dr (a). Lucas Tadeu Fuess

Instituição: Universidade de São Paulo - USP



Prof (a) Dr (a). Giselle Patrícia Sancinetti

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Aos meus pais, Sávio e Tereza,  
meus maiores incentivadores:  
Dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo seu amor diário sendo demonstrado através da vida das pessoas especiais que me rodeiam e por me dar forças para acordar todos os dias e ir correr atrás dos meus sonhos. Sem Ele não seria possível concluir mais uma etapa da minha vida com êxito.

Aos meus pais, Sávio e Tereza, por estarem do meu lado em todos os momentos, sem medir esforços para me ver bem. Sem vocês eu não conseguiria alcançar voos tão altos. Obrigado pelo amor incondicional, por acreditarem no meu potencial e serem meu maior alicerce. Essa conquista também é de vocês!!

Aos irmãos, Amanda e Gabriel, pelo apoio, incentivo e sempre estarem dispostos a me ajudar. Desde criança vocês sempre foram meu espelho e fonte de inspiração. Aos cunhados, Luciano e Mariana, pelo companheirismo e amizade. Obrigado por estarem do meu lado e, principalmente, pelos maiores presentes que alguém poderia me dar: meus afilhados Daniel e Maria, dois anjinhos que vieram pra abençoar ainda mais nossa família.

Ao meu namorado, Luiz Guilherme, por não sair do meu lado (mesmo a 8.263,49 Km de distância), pelo companheirismo, pela paciência e, principalmente pelo amor. Obrigado por sempre acreditar em mim, me colocar pra cima e me mostrar que eu posso muito mais do que eu imagino.

E de uma maneira muito especial eu agradeço a minha orientadora, Renata, por estar presente em cada passo da minha vida acadêmica desde a primeira iniciação científica, sempre sendo uma verdadeira doutora, transmitindo todo seu conhecimento, confiando em mim e, me ensinando dentre muitas coisas acadêmicas, a confiar em mim mesmo, batalhar pelos meus sonhos e lutar com unhas e dentes para atingir metas com sucesso. Você se tornou muito mais que orientadora nesses 24 meses de mestrado, hoje te considero uma amiga. Obrigado por estar presente nos momentos difíceis e de muita dúvida com a mão estendida disposta a ajudar, sempre com uma palavra amiga, de conforto e de

perseverança. Obrigado por me mostrar que mesmo quando tudo está escuro e não conseguimos enxergar a luz no fim do túnel, a luz está dentro de nós. Serei eternamente grato por tudo que você fez por mim, principalmente nos 5 meses de “USA life”, poder conhecer o lado humano por trás da doutora foi, sem sombra de dúvidas, um dos maiores presentes que a vida nos Estados Unidos me trouxe. Agradeço também ao Gustavo, e aos irmãos mais novos (rs), Sofia e Simon, por tornarem meus dias mais alegres e cheios de vida. Obrigado por tudo!

Aos professores Giselle, Rafael Brito, Gunther, Leandro Lodi, Zaiat e Damasceno, por todos conhecimentos transmitidos.

Aos companheiros de BIOTEC (de todas as gerações rs), Mira, Angel, Marina, Josiel, Rafaela, Mauro, Leticia, Paty, Cláudio, Luiz, Bruna, Elis, Alessandra, Frecia, Pizzo, Talis, Du e Carla, por tornarem mais fácil a rotina de trabalho, por todo conhecimento dividido e por compartilhar momentos de desespero, reatores entupidos e lavagem de frascos de NMP. Todo sucesso do mundo a vocês!

À Livia, por toda ajuda, desde as caronas, lavagem de frascos de NMP, cuidado com meus reatores, NMPs até toda a amizade e parceria: por me ouvir e compartilhar dos desesperos rotineiros, pela companhia desde as missas do padre Bruce até a mesa do bar. Você foi uma peça fundamental para que esse trabalho fosse concluído com sucesso. Tenho certeza que com toda essa inteligência e com esse coração gigante que você tem, você vai muito longe!

To all my co-workers at Argonne National Laboratory, Ken, Ted, Pam, Kelly, Carla, Xiaoqin, Yanghao, Limin and Tianliang, you made my nine months working in this great laboratory easier and more fun. Thanks for all the help and knowledge shared. And, a special thanks to Ed, who was a co-worker that after some months became my adviser and in the end turn into my friend. Thanks for everything you did for me, specially your knowledge, great conversations and all the help. You are an awesome human being!

Aos amigos, sejam eles de infância, de Dores, de Poços, do CsF ou os mais recentes da “USA life”, obrigado por tornarem essa caminhada mais leve, com mais risos e momentos inesquecíveis.

E, de uma maneira um pouco mais especial eu agradeço às amigas Andri, Bia e Clau, por se tornarem meu porto-seguro numa etapa difícil da minha vida. Obrigado por todo carinho, amor e amizade nos meus 9 meses nos Estados Unidos, vocês foram essenciais para que eu conseguisse vencer mais essa etapa da minha vida!

Aos familiares que se fizeram presentes nessa etapa.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro do projeto e à CAPES pela bolsa durante meu período no Brasil e nos Estados Unidos.

A todos que de alguma forma contribuíram para que essa jornada da minha vida fosse concluída com êxito, o meu muito obrigado, ninguém vence sozinho!

*“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso,  
mas nunca me levei realmente a sério;  
é que tem mais chão nos meus olhos  
do que o cansaço nas minhas pernas,  
mais esperança nos meus passos,  
do que tristeza nos meus ombros,  
mais estrada no meu coração  
do que medo na minha cabeça”.*

*(Cora Coralina)*

## RESUMO

O descarte de efluentes contendo altas concentrações de sulfato em corpos hídricos é responsável por provocar graves problemas ambientais. Uma alternativa promissora é o tratamento biológico utilizando bactérias redutoras de sulfato (BRS), microrganismos responsáveis pela redução do sulfato e geração de alcalinidade. Dessa maneira, o presente estudo avaliou a eficiência no tratamento e a estrutura das comunidades microbianas em 8 reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais tratando efluente sintético rico em sulfato com pH 4,0 utilizando quatro diferentes fontes de inóculo, imobilizados ou não, operados em duas fases, alternando entre elas o doador de elétrons. O percentual de remoção de sulfato com lactato variou entre  $67\pm 3\%$  e  $80\pm 2\%$  e com etanol entre  $37\pm 11\%$  e  $67\pm 3\%$ . A remoção de DQO com lactato variou de  $34\pm 9\%$  a  $70\pm 4\%$  e com etanol de  $31\pm 2\%$  a  $65\pm 5\%$ . Exceto por um reator, todos os outros apresentaram alta produção de alcalinidade (principalmente na fase lactato) e conseqüentemente atingiram valores de pH de efluente acima de 5,50. A remoção de ferro em todos os reatores foi acima de 90%. As análises de pirosequenciamento mostraram um aumento na abundância relativa de BRS nos reatores ao longo da operação, com a presença dos gêneros: *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium* e *Syntrophobacteraceae*. A análise dos índices de diversidade mostrou que houve uma diminuição da riqueza microbiana ao longo da operação. O gênero *Desulfovibrio* apresentou uma considerável abundância em todos os reatores imobilizados na fase etanol, enquanto que o gênero *Desulfobulbus* se destacou quando lactato foi o doador de elétrons. Este trabalho demonstrou através dos parâmetros operacionais e abundância microbiana que é possível obter sucesso na aclimação de um lodo com perfil metanogênico para a remoção de sulfato.

Palavras-chave: Bactérias redutoras de sulfato (BRS). Origem do inóculo. Imobilização. Lactato. Etanol. Riqueza microbiana.

## ABSTRACT

The disposal of sulfate-rich wastewaters is responsible for causing serious environmental problems. A promising alternative is the biological treatment using sulfate reducing bacteria (SRB), which is a specific type of bacteria responsible for reducing sulfate and generates alkalinity. Thus, the present study evaluated the efficiency of the biological removal of sulfate and the structure of the microbial communities in 8 anaerobic reactors operated in sequential batches treating synthetic sulfate rich wastewater with pH 4.0 using four different sources of inoculum, immobilized or not, operated in two phases, alternating the electron donor. The percentage of sulfate removal in the lactate phase ranged from  $67\pm 3\%$  to  $80\pm 2\%$  and in the ethanol phase between  $37\pm 11\%$  and  $67\pm 3\%$ . The removal of COD in the lactate phase ranged from  $34\pm 9\%$  to  $70\pm 4\%$  and in the ethanol phase from  $31\pm 2\%$  to  $65\pm 5\%$ . Except for the ETI2-I reactor, all reactors presented high alkalinity production (mainly in the lactate phase) and consequently reached effluent pH values above 5.50. Iron removal in all reactors was above 90%. The pyrosequencing analysis showed an increase in the relative abundance of SRB in the reactors during the operation, with the presence of the following genera: *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium* and *Syntrophobacteraceae*. The analysis of diversity indexes showed that there was a decrease in microbial richness throughout the operation. The *Desulfovibrium* genus showed considerable percentages in all the reactors immobilized in the ethanol phase, while the *Desulfobulbus* genus was present in the lactate phase of all the reactors. This work showed through the operational parameters and microbial abundance that it is possible to achieve success in the acclimatization of a sludge with methanogenic profile for the removal of sulfate.

Keywords: Sulfate reducing bacteria (SRB). Source of inoculum. Immobilization. Lactate. Ethanol. Microbial diversity.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no trabalho.....   | 37 |
| Figura 2 - Reator anaeróbio em batelada.....   | 38 |
| Figura 3 - Esquema de diluição seriada.....  | 46 |
| Figura 4 - Concentração de sulfato no afluente e no efluente ao longo do tempo, com incerteza de 10%.....  | 53 |
| Figura 5 - Porcentagem de remoção de sulfato.....  | 56 |
| Figura 6 - Espumas de poliuretano após a operação dos reatores.....  | 58 |
| Figura 7 - Concentração de DQO no afluente e no efluente ao longo do tempo, com incerteza de 5%.....       | 60 |
| Figura 8 - Porcentagem de remoção de DQO.....  | 61 |
| Figura 9 - Concentração de sulfeto no efluente ao longo do tempo, com incerteza de 10%.....                | 65 |
| Figura 10 - Distribuição das espécies de sulfeto em função do pH.....                                      | 66 |
| Figura 11 - Porcentagens de distribuição das médias das espécies de sulfeto..                              | 67 |
| Figura 12 - Variação de pH do afluente e do efluente ao longo do tempo, com incerteza de 5%.....           | 70 |
| Figura 13 - Alcalinidade parcial, intermediária e total do efluente.....                                   | 74 |
| Figura 14 - NMP inicial, intermediária e final dos reatores.....   | 78 |
| Figura 15 - Análise de abundância do Lodo ETE 1 e reatores ETE1-S e ETE1-I nas fases lactato e etanol..... | 84 |
| Figura 16 - Análise de abundância do Lodo ETE 2 e reatores ETE2-S e ETE2-I nas fases lactato e etanol..... | 86 |
| Figura 17 - Análise de abundância do Lodo ETI 1 e reatores ETI1-S e ETI1-I nas fases lactato e etanol..... | 88 |
| Figura 18 - Análise de abundância do Lodo ETI 2 e reatores ETI2-S e ETI2-I nas fases lactato e etanol..... | 90 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Principais gêneros de BRS e aceptores de elétrons.....  | 22 |
| Tabela 2 - Termodinâmica das reações mediados por BRS e AM.....  | 25 |
| Tabela 3 - Parâmetros cinéticos para BRS e AM.....   | 26 |
| Tabela 4 - Vantagens e desvantagens da utilização de lactato e etanol como<br>doadores de elétrons para BRS..... | 28 |
| Tabela 5 - Organização e montagem dos reatores.....  | 39 |
| Tabela 6 - Fases operacionais dos reatores.....  | 40 |
| Tabela 7 - Composição do meio reacional.....   | 41 |
| Tabela 8 - Composição do meio de cultura Postgate C.....   | 44 |
| Tabela 9 - Composição da água de diluição.....   | 44 |
| Tabela 10 - Faixas de diluição utilizadas para cada reator.....  | 45 |
| Tabela 11 - Remoção de sulfato, DQO, produção de sulfeto e pH.....   | 50 |
| Tabela 12 - Aumento de pH estequiometricamente.....  | 73 |
| Tabela 13 - Remoção média de ferro para cada etapa experimental.....   | 75 |
| Tabela 14 - Quantificação da população de BRS através da técnica NMP.....  | 77 |
| Tabela 15 - Índices de riqueza e diversidade microbiana.....   | 80 |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                      | 14 |
| 2     | <b>OBJETIVOS</b> .....                                       | 16 |
| 2.1   | <b>Objetivo Geral</b> .....                                  | 16 |
| 2.2   | <b>Objetivos Específicos</b> .....                           | 16 |
| 3     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                           | 17 |
| 3.1   | <b>Redução biológica de sulfato</b> .....                    | 17 |
| 3.2   | <b>Tratamento anaeróbio de águas ricas em sulfato</b> .....  | 21 |
| 3.3   | <b>Competição entre BRS e arqueias metanogênicas</b> .....   | 22 |
| 3.4   | <b>Condições ambientais e operacionais</b> .....             | 24 |
| 3.4.1 | <b>Doador de elétrons</b> .....                              | 24 |
| 3.4.2 | <b>Imobilização</b> .....                                    | 27 |
| 3.4.3 | <b>Origem do inóculo</b> .....                               | 29 |
| 3.5   | <b>Considerações gerais</b> .....                            | 31 |
| 4     | <b>MATERIAIS E MÉTODO</b> .....                              | 33 |
| 4.1   | <b>Fluxograma experimental</b> .....                         | 33 |
| 4.2   | <b>Reatores em batelada alimentada e inóculo</b> .....       | 35 |
| 4.3   | <b>Meio de cultura</b> .....                                 | 37 |
| 4.4   | <b>Análises físico-químicas</b> .....                        | 38 |
| 4.5   | <b>Análise dos dados e cálculo do erro estatístico</b> ..... | 39 |
| 4.6   | <b>Avaliação da população de BRS</b> .....                   | 39 |
| 4.7   | <b>Sequenciamento e análise de abundância</b> .....          | 43 |
| 5     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                          | 45 |
| 5.1   | <b>Performance Geral dos Reatores</b> .....                  | 45 |
| 5.1.1 | <b>Sulfato</b> .....   | 48 |
| 5.1.2 | <b>DQO</b> .....   | 55 |
| 5.1.3 | <b>Sulfeto</b> .....   | 59 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.1.4 | <b>pH</b> .....                                     | 63 |
| 5.1.5 | <b>Alcalinidade e Ferro</b> .....                   | 68 |
| 5.2   | <b>Quantificação das Populações</b> .....           | 70 |
| 5.3   | <b>Sequenciamento e análise de abundância</b> ..... | 72 |
| 6     | <b>CONCLUSÃO</b> .....                              | 85 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                            | 86 |

## 1 INTRODUÇÃO

Processos biológicos que envolvem a remoção de sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) ocorrem majoritariamente por meio das bactérias redutoras de sulfato (BRS), que são microrganismos anaeróbios que utilizam sulfato como principal receptor de elétrons na oxidação de compostos orgânicos. A redução do sulfato tem como principal produto o sulfeto ( $S^{2-}/H_2S/HS^-$ ) e esse processo proporciona a geração de alcalinidade com a liberação de íons bicarbonato ( $HCO_3^-$ ). Existem dois grandes grupos de BRS, as que fazem a oxidação completa e as que fazem a oxidação incompleta da matéria orgânica. O primeiro grupo tem como produto final gás carbônico ( $CO_2$ ), enquanto que o segundo grupo, o acetato ( $CH_3COO^-$ ) (MUYZER; STAMS, 2008).

Por mais que o sulfato seja um dos ânions mais abundantes na natureza, são as atividades antropogênicas as grandes responsáveis pelas contaminações nos corpos hídricos. Essas emissões podem ser domésticas ou industriais, onde apenas a segunda é considerada preocupante, uma vez que a quantidade de sulfato emitida no esgoto doméstico é proporcionalmente inferior. Dentre as indústrias que produzem efluentes contendo sulfato, podem-se destacar os processos relacionados à produção de papel e celulose, de álcool (fermentação), indústria farmacêutica, petroquímica, atividades mineradoras, etc. (HAO et al., 2014; NAGPAL et al., 2000).

Sérios danos podem ser causados ao meio ambiente por consequência de altas concentrações de sulfato nos corpos hídricos. Na ausência de oxigênio e nitrato, o sulfato pode atuar como o único receptor de elétrons, sendo convertido a sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). O sulfeto de hidrogênio por sua vez produz mau odor, é corrosivo e extremamente tóxico aos seres humanos (LENS et al., 1998). Dessa forma, os efluentes ricos em sulfato devem ser tratados previamente para evitar qualquer tipo de problema ambiental.

Dessa maneira, além de exercerem um papel crucial no ciclo do enxofre, as BRS podem auxiliar na biorremediação de efluentes ricos em sulfato, uma vez

que esses microrganismos, além de reduzirem o sulfato, também permitem o aumento do pH do efluente devido a geração de alcalinidade, e o sulfeto gerado pode atuar como um agente precipitante de metais. Em função de fatores econômicos e de eficácia, a utilização das BRS constitui uma alternativa viável quando se trata de águas residuárias ácidas e na presença de metais pesados, como por exemplo, a drenagem ácida de minas (DAM) (ANAWAR, 2013).

No tratamento anaeróbio de efluentes ricos em sulfato, inúmeros fatores podem influenciar a eficiência do processo, bem como a partida de sistemas biológicos. Dentre os muitos fatores, alguns exemplos são: tempo de detenção hidráulica, relação DQO/sulfato, origem do inóculo, pH, temperatura de operação, doador de elétrons, tipo de reator, material suporte, etc. (HAN, 2016; ZHANG; WANG).

A partida da grande maioria dos reatores anaeróbios em escala plena requer elevados volumes de biomassa para início do processo. No caso de reatores sulfetogênicos, esse requisito se torna uma dificuldade, visto que não existe um grande número de reatores sulfetogênicos em operação que poderiam atuar como fonte de inóculo para novos sistemas. Dessa maneira, uma das alternativas para a partida de reatores anaeróbios em grande escala tratando efluentes ricos em sulfato é a utilização de um inóculo metanogênico. Nesses casos, espera-se um período inicial de adaptação do lodo de forma a selecionar a comunidade microbiana rica em BRS, o que se constitui um parâmetro importante na escolha da fonte de origem do inóculo. Além da influência da origem, deve-se buscar sempre formas mais baratas e acessíveis de fonte de carbono, visando a maior eficiência do processo em termos operacionais e financeiros, sem deixar de ser uma boa estratégia para o desenvolvimento das BRS.

O presente estudo avaliou a eficiência da biorremediação de águas ricas em sulfato com base na remoção deste e de ferro, bem como a estrutura das comunidades microbianas de bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios operados em batelada utilizando-se quatro diferentes fontes de inóculo, imobilizados e não imobilizados, e duas fontes de carbono separadamente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência da origem do inóculo, da imobilização ou não da biomassa e do doador de elétrons sobre a eficiência da remoção de sulfato e a estrutura da comunidade microbiana de reatores sulfetogênicos operados em batelada sequencial em condições ácidas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Determinar a eficiência da remoção de sulfato, demanda química de oxigênio (DQO) e ferro em função do inóculo (dois oriundos de reatores tratando efluentes industriais e dois de reatores tratando esgoto), imobilização microbiana ou não em espuma de poliuretano e utilização de dois doadores de elétrons (etanol e lactato);
- b) Avaliar e quantificar o crescimento da população de bactérias redutoras de sulfato em função da origem do inóculo, da imobilização ou não da biomassa e dos doadores de elétrons;
- c) Determinar a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas nos domínios Bactéria e do grupo de Bactérias Redutoras de Sulfato por meio de sequenciamento e análise de abundância.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são apresentados dados para a contextualização da pesquisa realizada, abrangendo os itens redução biológica do sulfato, tratamento anaeróbio de águas ricas em sulfato, competição entre BRS e arqueias metanogênicas, condições ambientais operacionais (incluindo doador de elétrons, imobilização e origem do inóculo) e condições gerais.

#### 3.1 Redução biológica de sulfato

Bactérias redutoras de sulfato são microrganismos procariontes anaeróbios encontradas geralmente em ambientes com ausência de oxigênio e que obtêm energia para síntese e crescimento de células por meio da oxidação de compostos orgânicos ou hidrogênio molecular ( $H_2$ ), também conhecidos como doadores de elétrons, e por meio da redução de sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) a sulfeto ( $S^{2-}/H_2S/HS^-$ ) (LOVLEY, 2006). O interesse nesse grupo específico de microrganismos tem crescido desde a descoberta de suas funções que auxiliam desde a remediação ambiental até o funcionamento dos ecossistemas. Portanto, além da participação no ciclo do enxofre, as BRS exercem uma variedade de funções, como: biodegradação de efluentes clorados aromáticos, metilação do mercúrio e ciclagem da matéria orgânica (ATKINSON; SHERWOOD, 1995; RODRIGUEZ et al., 2016; VIEIRA et al., 2016).

Após muitos anos de investigações e pesquisas, mais de 120 espécies e 40 gêneros pertencentes a três filos diferentes de bactérias e um filo no Domínio Archaea foram registrados (BARTON; HAMILTON, 2007). Dentre esses 40 gêneros, podem-se dividi-los em dois tipos distintos em relação à oxidação de compostos orgânicos: completa ou incompleta (Tabela 1), em que as que realizam a oxidação completa da matéria orgânica têm como produto final o  $CO_2$ , enquanto que as que realizam a oxidação incompleta tem como produto final o acetato

(HAO et al., 2014). As BRS que fazem a oxidação completa dos compostos orgânicos comumente também utilizam o acetato como substrato destinado ao crescimento, podendo utilizar duas rotas metabólicas diferentes para sua oxidação: ciclo do ácido cítrico modificado (série cíclica de reações que resultam na conversão do acetato em dióxido de carbono e NADH) ou rota do acetil-CoA (via autotrófica de fixação de dióxido de carbono e oxidação de acetato) (MUYZER; STAMS, 2008). Normalmente, as BRS que fazem a oxidação incompleta auto competem com as que fazem a oxidação completa por substratos disponíveis no sistema, e as incompletas acabam se tornando dominantes da rota metabólica. Uma vez utilizadas no tratamento de efluentes, as BRS responsáveis pela oxidação incompleta podem gerar acúmulo de acetato e prejudicar o descarte do efluente em questão pelo excesso de matéria orgânica (HAO et al., 2014).

A oxidação da matéria orgânica por meio da redução do sulfato permite que oito elétrons sejam recebidos pela molécula de sulfato e apenas quatro sejam doados, em termos equivalentes de demanda química de oxigênio, pela molécula de oxigênio, o que gera uma equivalência de dois mols de oxigênio para cada um mol de sulfato. Considerando-se a massa molar, tem-se a relação de 0,67 g de  $O_2$  por grama de  $SO_4^{2-}$ . Essa relação de matéria orgânica (DQO)/sulfato igual a 0,67 significa que haverá sulfato suficiente para remover toda a matéria orgânica (DQO) presente no efluente pelas BRS (LENS et al., 1998). Dessa maneira, quando essa relação for inferior a 0,67, haverá uma quantidade insuficiente de DQO para que todo sulfato seja reduzido. O contrário se aplica quando essa relação for superior a 0,67, significando que o excesso de matéria orgânica demandará a presença de outros microrganismos para que todo consumo de DQO seja realizado, evitando-se excesso de matéria orgânica no efluente (LENS et al., 1998).

Tabela 1 – Principais gêneros de BRS e aceptores de elétrons

| Gênero                        | Aceptor de Elétrons utilizados para crescimento<br>(além do $SO_4^{2-}$ ) |
|-------------------------------|---|
| <i>Desulfovibrio</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/Fumarate/Fe(III)/MnO_2/NO_2^-/NO_3^-/O_2$          |
| <i>Desulfomicrobium</i>       | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/Fumarate/NO_2^-/DMSO$                              |
| <i>Desulfohalobium</i>        | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfonatrum</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfobotulus</i>         | $SO_3^{2-}$   |
| <i>Desulfocella</i>           | -   |
| <i>Desulfofaba</i>            | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulforegula</i>          | Desulfovirdin   |
| <i>Desulfobulbus</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/Graphite/Fe(III)/NO_2^-/NO_3^-/O_2$                |
| <i>Desulfocapsa</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfofustis</i>          | $SO_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulforhopalus</i>        | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/NO_3^-$  |
| <i>Desulfotalea</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0/Fe(III)$ -citrato                              |
| <i>Thermodesulfobacterium</i> | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Thermodesulfovibrio</i>    | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/Fe(III)$ -Arsenate                                 |
| <i>Desulfosporosinus</i>      | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0/Fe(III)$                                       |
| <i>Desulfotomaculum</i>       | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfomonile</i>          | 3-clorobenzoato/Fumarato/ $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0/NO_3^-$              |
| <i>Desulfothermus</i>         | $SO_3^{2-}$   |
| <i>Desulfobacter</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfobacterium</i>       | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/Fumarate$  |
| <i>Desulfobacula</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfococcus</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfofrigus</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/Fe(III)$ -citrato                                  |
| <i>Desulfonema</i>            | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/NO_3^-$  |
| <i>Desulfosarcina</i>         | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfospira</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfotignum</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/CO_2$  |
| <i>Desulfatibacillum</i>      | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfarculus</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulforhabdus</i>         | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfovirga</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfobacca</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |
| <i>Desulfospira</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfacinum</i>           | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfonauticus</i>        | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0$   |
| <i>Desulfonatronovibrio</i>   | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}/S^0/O_2$   |
| <i>Thermodesulforhabdus</i>   | $SO_3^{2-}$   |
| <i>Thermodesulfobium</i>      | $S_2O_3^{2-}/NO_2^-/NO_3^-$   |
| <i>Archaeoglobus</i>          | $SO_3^{2-}/S_2O_3^{2-}$   |

Fonte: Adaptado de HAO et al. (2014).

O sulfato é o receptor de elétrons terminal para o crescimento das BRS, porém, quimicamente o sulfato é um receptor desfavorável do ponto de vista termodinâmico, uma vez que seu  $E_{SO_4^{2-}-SO_3^{2-}}^{0'}$  (potencial de redução) é muito negativo ( $E_{SO_4^{2-}-SO_3^{2-}}^{0'} = -516$  mV), o que impossibilita a redução pelos mediadores

de elétrons intracelulares que estão presentes nas BRS: ferroxidina e NADH. Dessa maneira, o íon sulfato é ativado pela enzima ATP sulfurilase, de forma que o par  $SO_4^{2-}/SO_3^{2-}$  possui um potencial de redução maior, o que permite a redução pela ferroxidina e NADH. Posteriormente, com auxílio de outra enzima dependente de ATP, o APS será convertido no sulfito, que é mais reduzido que o sulfato ( $E_{SO_3^{2-}-S^{2-}}^{0'} = -116$  mV) e possui um potencial de redução menor, favorecendo a formação de sulfeto (MUYZER; STAMS, 2008). Portanto, são necessárias duas moléculas de ATP para a redução de uma molécula de sulfato, o que significa um ganho líquido de um quarto a um terço de molécula de ATP por molécula de sulfato reduzida.

As BRS têm a capacidade de utilizar outros aceptores de elétrons para crescimento ou fermentação de substratos na ausência de aceptores inorgânicos de elétrons, entre eles o tiosulfato, sulfito e enxofre podem atuar como receptores de elétrons. Outros compostos que podem ser utilizados como aceptores de elétrons são nitrito, nitrato, amônio, compostos orgânicos, ferro III, uranila, cromato, etc. (Tabela 1). Portanto, nem todos esses aceptores de elétrons associam o processo de redução ao processo de crescimento (MUYZER; STAMS, 2008).

Com o desenvolvimento de análises filogenéticas utilizando sequências do rRNA e dos genes *dsrAB* (presentes em todas BRS) que são responsáveis pela codificação de enzimas importantes na respiração dissimilatória do sulfato, novas espécies vêm sendo descobertas. As BRS são agrupadas em quatro grupos distintos: BRS mesófilas gram negativas não formadoras de esporos, BRS gram positivas formadoras de esporos, BRS termofílicas e RS Arqueia (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).

### 3.2 Tratamento anaeróbio de águas ricas em sulfato

A descarga indiscriminada de águas residuais ricas em sulfato interfere diretamente no ciclo do enxofre, além de ser prejudicial à qualidade da água. Para regulamentar e fiscalizar existem as resoluções CONAMA 430/11 e 357/05 que estabelecem restrições para lançamento de efluentes no meio ambiente. As indústrias de papel e celulose, petroquímicas, produtoras de álcool, têxtil, curtumes, mineração e fundições são as principais emittentes de efluentes ricos em sulfato. Várias formas de tratamento vêm sendo utilizadas, como: precipitação química, separação por membranas, troca iônica e osmose reversa. Porém, a redução biológica do sulfato é vista como uma alternativa promissora, uma vez que, além de remover sulfato, produz alcalinidade e ainda remove metais pesados tornando o processo eficaz e economicamente favorável. Portanto, além do papel fundamental exercido pelas BRS no ciclo de enxofre, esses microrganismos podem ser bastante úteis na biorremediação de efluentes ricos em sulfato.

As BRS atuam na biorremediação por meio da redução de sulfato e produção de sulfeto de hidrogênio (Equação 1), na precipitação de metais por meio da formação de sulfetos metálicos (MeS) (Equação 2) e na geração de alcalinidade por meio da liberação de íons de bicarbonato (Equação 3).



Além de versáteis em relação a variedade de aceptores e doadores de elétrons que elas podem utilizar, as BRS também sobrevivem a uma gama diversa de condições ambientais. Já se detectou/isolou BRS de sedimentos marinhos,

fontes hidrotermais, vazamentos de hidrocarbonetos e vulcões de lama, locais com valores extremos de pH, campos de petróleo, sedimentos de água doce e usinas de tratamento anaeróbio de efluentes (MUYZER; STAMS, 2008).

Portanto, por mais que o pH ótimo para desenvolvimento de BRS seja entre 6-8, percebe-se que esses microrganismos tem a capacidade de crescimento em ambientes extremos e desfavoráveis, como em pH ácido, por exemplo (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

Porém, as BRS também podem causar graves problemas para indústrias petroquímicas e agroindustriais, por exemplo. Sua problemática na área agroindustrial se dá no tratamento dos resíduos oriundos desse setor, uma vez que a presença desses microrganismos pode reduzir o percentual de metano no biogás, o que energeticamente é considerada uma desvantagem. Já nas indústrias petroquímicas o problema se dá pela formação do sulfeto de hidrogênio que pode causar corrosão e problemas de segurança de trabalho para funcionários desse ramo da indústria que trabalham em plataformas marítimas (MUYZER; STAMS, 2008).

### **3.3 Competição entre BRS e arqueias metanogênicas**

Ambientes anaeróbios com baixos potenciais de oxirredução e ricos em sulfato proporcionam a competição entre as BRS e as arqueias metanogênicas (AM) (microrganismos anaeróbios responsáveis pela produção de metano) pelos substratos disponíveis no meio.

Ao contrário das BRS, as arqueias metanogênicas usam um número limitado de substratos para o crescimento, como hidrogênio, acetato e gás carbônico. Não há registros do uso de ácidos orgânicos (lactato, butirato, propionato, por exemplo) para crescimento das AM, o que as tornam dependentes de outros microrganismos que degradam esses compostos gerando os produtos que são substratos para elas (MUYZER; STAMS, 2008).

Dessa maneira, em ambientes ricos em sulfato, hidrogênio e acetato serão alvo da competição entre BRS e AM. Cineticamente, a oxidação realizada pelas BRS ocorre a uma velocidade maior do que a realizada pelas AM, uma vez que as BRS possuem variações na energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) mais negativas, o que significa que são termodinamicamente favorecidas na competição por substratos com as arqueias metanogênicas, como pode ser comparado através da Tabela 2 (CHERNICHARO, 2007; MUYZER; STAMS, 2008).

Tabela 2 – Termodinâmica das reações mediados por BRS e AM

| Equação   | $\Delta G^\circ$ (kJ/reação) |
|---|------------------------------|
| Bactérias Redutoras de Sulfato                      |                              |
| $4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$   | -151,9                       |
| $Acetato^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$ | -47,6                        |
| Arqueias Metanogênicas                              |                              |
| $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$     | -135,6                       |
| $Acetato^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$       | -31,0                        |

Fonte: Adaptado de MUYZER e STAMS (2008).

Outros dois fatores que favorecem as BRS na competição por substratos são sua maior produção de biomassa e taxa de crescimento específico como pode ser visualizado na Tabela 3 (HILTON; OLESZKIEWICZ, 1987; OMIL et al., 1997). A competição entre BRS e AM pode ser influenciada também por fatores ambientais/operacionais, como pH, presença de nutrientes, temperatura e relação DQO/ $SO_4^{2-}$ .

As BRS, além de competirem com as AM, também podem competir entre si quando a quantidade de sulfato for insuficiente para a completa oxidação dos compostos orgânicos. E, na ausência de acetato, as BRS precisam coexistir com as bactérias homoacetogênicas.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos para BRS e AM

| Parâmetro Cinético                                       | BRS   | AM    |
|--|-------|-------|
| $\mu_{MÁX}$ (d <sup>-1</sup> )                           | 0,120 | 0,041 |
| Taxa de Crescimento Específico (gSSV/g acetato removido) | 0,050 | 0,025 |

Fonte: Adaptado de OMIL et al. (1997).

As BRS, além de competirem com as AM, também podem competir entre si quando a quantidade de sulfato for insuficiente para a completa oxidação dos compostos orgânicos. E, na ausência de acetato, as BRS precisam coexistir com as bactérias homoacetogênicas.

### 3.4 Condições ambientais e operacionais

Há uma série de fatores que podem influenciar/afetar a eficiência de bioprocessos envolvendo a redução biológica de sulfato, podendo eles serem microbiológicos, operacionais e/ou relacionados à composição do afluente. O primeiro está relacionado à origem do inóculo e aos microrganismos ali presentes. O segundo dependerá da concentração de sulfato, presença ou não de metais pesados e/ou outras substâncias e o pH. E o terceiro pode incluir o substrato e sua concentração, temperatura, concentração de  $H_2S$ , tempo de detenção hidráulica, entre outros.

#### 3.4.1 Doador de elétrons

A presença de doadores de elétrons no tratamento de águas residuárias ricas em sulfato é essencial para que aconteça o tratamento biológico por meio de BRS. Alguns desses efluentes já possuem altas concentrações de DQO, satisfazendo a condição de doadores de elétrons, porém outros possuem baixa carga de matéria orgânica. Sabe-se que para que a redução de sulfato ocorra de forma eficiente, é

necessário que se respeite, no mínimo, a relação mássica DQO/sulfato estequiométrica de 0,67. Portanto, muitas vezes é necessário que se adicione uma fonte externa de carbono para auxiliar na redução completa de sulfato.

Os doadores de elétrons oxidados pelas BRS são, normalmente, aqueles com baixo peso molecular. Porém, variados tipos de substâncias orgânicas complexas vêm sendo implementadas como fonte de carbono e doadores de elétrons, como vinhaça, esterco bovino, soro de leite (GODOI et al., 2017; RIBEIRO, 2017). Compostos orgânicos sintéticos de baixo peso molecular como lactato, butirato, acetato, propionato, etanol e outros álcoois também são usualmente empregados (VISSER et al., 1993).

Diferentes doadores e receptores de elétrons resultam em diferentes rendimentos de crescimento de biomassa de BRS. A utilização de  $H_2$  como doador de elétrons é menos eficiente no crescimento de BRS quando comparado com a utilização de acetato, por exemplo (SPEECE, 1996). A velocidade de consumo de substratos pelas BRS depende tanto da concentração de doadores de elétrons quanto da concentração de receptores de elétrons. E essas concentrações afetam diretamente o sistema, principalmente a competição entre as BRS e as AM.

A escolha do doador de elétrons para a redução biológica de sulfato se baseia em três grandes considerações: eficiência e/ou habilidade do doador de elétrons em reduzir ou remover completamente a presença de sulfato no efluente, o custo desse doador de elétrons por unidade de sulfato convertida a sulfeto e a facilidade de obtenção, manuseio e segurança.

Dentre os muitos doadores de elétrons frequentemente utilizados para auxiliar na remoção de sulfato, apenas será aprofundado nessa revisão os que foram utilizados para o desenvolvimento desse trabalho, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens da utilização de lactato e etanol como doadores de elétrons para BRS

| Substrato | Vantagens   | Desvantagens  |
|-----------|---|---|
| Lactato   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fonte de carbono e doador de elétrons preferencial;</li> <li>- Alto rendimento do crescimento da biomassa;</li> <li>- Alta produção de alcalinidade;</li> <li>- Menos suscetível à toxicidade causada pelo sulfeto;</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto custo;</li> </ul>   |
| Etanol    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Custo relativamente barato;</li> <li>- Facilmente oxidado pelas BRS;</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixo crescimento de BRS;</li> <li>- Oxidação incompleta não produz alcalinidade suficiente e gera acúmulo de acetato no sistema;</li> </ul> |

Fonte: Adaptado de KAKSONEN e PUHAKKA (2007).

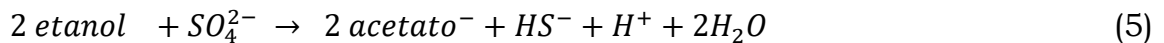
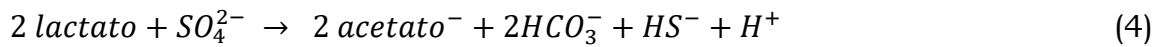
O lactato é amplamente empregado como um substrato orgânico no crescimento das redutoras de sulfato pelo fato de ser utilizado como um doador de elétrons e também ser uma fonte de carbono para muitas espécies desse grupo de microrganismos. A redução de sulfato utilizando lactato como doador de elétrons está descrita nas Equações 4 e 6.

A Equação 4 representa a redução de sulfato associada a oxidação incompleta do lactato, tendo como um dos produtos finais o acetato. Enquanto que a Equação 6 representa a redução de sulfato a partir da oxidação do acetato.

Algumas espécies, como a *Desulfovibrio desulfuricans*, por exemplo, fazem a oxidação completa da matéria orgânica, levando lactato a  $CO_2$  (OKABE; CHARACKLIS, 1992). Porém, a oxidação completa do lactato não é realizada pela maioria das espécies *Desulfobacter* e *Desulfobacterium*. E espécies como a *Desulfonema magnum* não crescem em lactato (WIDDEL, 1988).

O etanol é outro doador de elétrons atrativo para as BRS. Uma eficiência de conversão de sulfato de até 80% foi alcançada com altos valores de carga de sulfato utilizando etanol como doador de elétrons (BARNES et al., 1991; CUNHA et al., 2018; VIEIRA et al., 2016). De acordo com Nagpal et al. (2000), algumas

espécies de BRS como *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfobacter postgatei* são capazes de realizar a oxidação completa do etanol levando-o a  $CO_2$ . Porém, algumas espécies utilizam a rota incompleta para degradação do etanol, como demonstrado nas Equações 5 e 6.



A utilização do etanol faz com que as limitações na transferência de massa se tornem insignificantes quando comparado com outros doadores de elétrons (Stucki et al., 1993; van Houten et al., 1994). Porém, assim como todas as outras fontes de carbono, o crescimento das BRS acaba sendo menor pelo fato da inibição causada ao consórcio microbiano devido ao  $H_2S$  não dissociado.

Tanto lactato quanto etanol podem ser oxidados por rotas incompletas, ocasionando um aumento na concentração de oxigênio dissolvido na forma de DQO no efluente final por acúmulo de acetato. Porém, esse problema pode ser revolido pela presença de AM que podem utilizar o acetato como substrato em seu metabolismo em sistemas biológicos que operam com consórcios microbianos (NAGPAL et al., 2000).

### 3.4.2 Imobilização

Outro fator importante no desenvolvimento de sistemas anaeróbios no tratamento de efluentes ricos em sulfato é a formação ou não de biofilmes. Biofilmes constituem-se ambientes favoráveis onde consórcios de microrganismos operam de forma sinérgica em relação a utilização de

subprodutos (RIBEIRO et al., 2005). Os principais responsáveis pela integridade estrutural e funcional dos biofilmes, devido às forças coesivas que exercem, são as moléculas de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que são excretadas por microrganismos que compõe essa estrutura simbiótica e tornam possível a estruturação e desenvolvimento da arquitetura matricial (FLEMMING; WINGENDER, 2001).

Existem diversas formas de imobilização de biomassa que proporcionam a formação de biofilmes, seja por meio da utilização de materiais suporte, como: areia, espumas de diferentes materiais poliméricos, materiais cerâmicos, etc, ou por meio de processo de auto imobilização, como, por exemplo, a formação de grânulos. Devido à vasta gama de possíveis materiais suporte, muitos estudos são conduzidos com intuito de avaliar o baixo custo comercial desses materiais suporte (CAMARGO; NOUR, 2001; CHENG et al., 1992) ou até mesmo o grau de adesão em diversos tipos de materiais com ênfase nos aspectos fundamentais que governam a formação de biofilmes (VANDEVIVERE; KIRCHMAN, 1993; VARRIER et al., 1987). Ambas abordagens são importantes para o desenvolvimento de tecnologias na área do tratamento anaeróbio de efluentes, uma vez que combinam teoria e prática. Um dos grandes motivos pelos quais se opta pela utilização de células imobilizadas na operação de reatores é o fato de essas serem mais tolerantes à compostos tóxicos quando comparadas com as células livres. As camadas exteriores protegem as camadas interiores contra esses agentes tóxicos devido à resistência a transferência de massa entre camadas (GANTZER, 1989).

A espuma de poliuretano tem sido vastamente empregada como material suporte em muitos estudos envolvendo tratamento de efluentes e, de forma geral, tem sido amplamente utilizada em reatores de leito fixo (RIBEIRO et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2016; SILVA et al., 2002). Rodriguez e Zaiat (2011) avaliaram a influência da fonte de carbono e da origem do inóculo na dinâmica de adesão da biomassa em reatores anaeróbios tratando DAM. Observou-se nesse trabalho que a concentração de biomassa esteve diretamente ligada ao tamanho da molécula de cada substrato, sendo que a combinação de do ácido fórmico como

fonte de carbono e inóculo oriundo de reator metanogênico do tipo UASB resultou na maior concentração final de biomassa. Entretanto, as velocidades máximas de colonização foram dependentes da origem do inóculo, tanto para etanol quanto para lactato, sendo que com sedimento da mineração obteve-se resultados mais relevantes para esse parâmetro.

Varesche et al. (1997) avaliaram a fixação de biomassa em espumas de poliuretano em reator anaeróbico de fluxo horizontal tratando substrato a base de glicose. Observaram-se três diferentes matrizes de microrganismos na espuma de poliuretano: micro grânulos, biofilmes multicelulares médios e células individuais. A utilização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizada nesse trabalho possibilitou inferências na composição bacteriológica da biomassa aderida ao suporte, formada por diferentes tipos morfológicos, conferindo uma significância ecológica para as matrizes dentro das estruturas. De maneira geral, esse estudo comprovou que as matrizes do poliuretano oferecem condições ótimas de crescimento e retenção dos microrganismos anaeróbios devido ao favorecimento para o fluxo de substrato e produtos gerados pelas estruturas do biofilme.

### **3.4.3 Origem do inóculo**

Em se tratando de partida de reatores anaeróbios, um dos fatores cruciais para que se tenha uma partida eficiente é a origem do inóculo utilizado. Alguns exemplos de inóculos utilizados em reatores anaeróbios, são: dejetos de ruminantes, rúmen, cama de frangos, sedimentos de cavas de minas, lodo anaeróbico oriundo de reatores que já estão em operação, entre outros (HAO et al., 2014).

Porém, para o tratamento biológico de águas residuárias ricas em sulfato, devido à alta especificidade do efluente, utilizam-se normalmente lodos anaeróbios oriundos de reatores previamente em operação. Esses lodos podem ser procedentes de tratamento de efluente doméstico ou de tratamento de

efluentes industriais, o que pode exigir um período de adaptação para tratamento de efluentes ricos em sulfato.

Considerando que o esgoto sanitário é um tipo de efluente que contém basicamente matéria orgânica e alguns nutrientes, o lodo proveniente dos reatores que tratam esse tipo de água residuária tende a ser mais diversificado e menos específico (principalmente no que se diz a adaptação para redução de sulfato). Por outro lado, devido a vasta diversidade de processos industriais, cada efluente de cada tipo de indústria possui características físico-químicas diferentes, o que significa que a biomassa oriunda de reatores anaeróbios industriais vai possuir uma fauna microbiana conveniente às características do efluente a ser tratado. Isso significa que quanto maior a similaridade das características do efluente tratado com o inóculo escolhido, melhor será o desempenho e eficiência do reator, principalmente no período inicial de adaptação.

Além do tipo de efluente tratado pela biomassa, outros dois fatores que podem ser determinantes na escolha de um inóculo para iniciar a operação de um reator são a temperatura e o pH de operação. A temperatura de operação de um reator determinará se os microrganismos ali presentes serão em sua maioria mesófilos ou termófilos. O primeiro grupo vive sob temperaturas entre 20° e 40° C, enquanto que o segundo grupo sobrevive entre 40° e 65° (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003). Dessa maneira, a temperatura do lodo a ser selecionado como inóculo deve ser feita baseada na temperatura que será operado o reator em questão, sabendo que um inóculo adaptado a temperatura de início de operação pode proporcionar uma partida mais eficaz do sistema de tratamento.

A escolha de um inóculo adequado também deve se basear no pH do efluente previamente tratado, uma vez que isso determina se a microbiota será em maioria neutrófila ou acidófila (CHERNICHARO, 2007). A primeira é consequência de um ambiente onde o pH é neutro, enquanto que para segunda, o pH possui valores mais baixos (ácido). Portanto, durante a escolha de um inóculo, se o pH do efluente for ácido, por exemplo, a escolha de um lodo que opere nas mesmas condições proporcionará uma partida mais segura e, inicialmente, mais eficaz,

uma vez que o tempo de adaptação de uma comunidade mesofílica para valores de pH mais baixos pode demorar um tempo maior e, em alguns casos, nem acontecer efetivamente.

A escolha de um lodo para dar início ao tratamento de um efluente específico pode ser facilitada quando se encontra uma biomassa já adaptada às suas condições de operação. Infelizmente muitas vezes não se consegue encontrar uma fonte de inóculo específica para cada situação ou em quantidades suficientes. Mesmo ao se buscar lodos proveniente de processos industriais, a maioria ainda são sistemas metanogênicos, visto que a matéria orgânica se constituiu o maior problema, mesmo em efluentes industriais. Entretanto, a adaptação do lodo é factível em diversas situações envolvendo microrganismos anaeróbios. Belmont et al. (2006) avaliaram uma lagoa anaeróbia tratando efluente da indústria de papel e celulose contendo altas concentrações de ácidos resínicos, principalmente ácido abiético. Os resultados oriundos dos experimentos contínuos e batelada mostraram que a biomassa anaeróbia foi capaz de degradar o ácido abiético, e as remoções foram melhorando ao longo do tempo, o que comprovou a aclimatação do lodo para esse tipo de efluente.

Um outro tipo de adaptação de lodos anaeróbios foi desenvolvido por Kettunen e Rintala (1997), o qual os autores testaram a atividade metanogênica de lodo anaeróbio de tratamento de esgoto utilizando diferentes tipos de substrato e diferentes temperaturas (mais baixas que as ideais para esses tipos de microrganismos), e os resultados foram positivos, sugerindo que a adaptação da biomassa possibilitou uma alta capacidade de tratamento no processo anaeróbio, mesmo em condições psicrófilicas.

### **3.5 Considerações gerais**

Distintos trabalhos têm sido desenvolvidos abrangendo processos anaeróbios de remoção de sulfato envolvendo bactérias redutoras de sulfato, entretanto,

ainda existem muitas lacunas científicas a serem investigadas, principalmente relacionadas a influência do inóculo.

Dessa maneira, o propósito deste trabalho é entender melhor quão relevante é a fonte do inóculo na partida e no desenvolvimento de um reator. Para ajudar na avaliação desse parâmetro, decidiu-se implementar aos experimentos o efeito da imobilização e da mudança da fonte de carbono. A escolha de ambos fatores pode ser justificada pelos efeitos que podem influenciar diretamente na estrutura das comunidades microbianas. A escolha pela avaliação do efeito da imobilização foi baseada na eficiência de remoção de sulfato e matéria orgânica, enquanto que a mudança da fonte de carbono de lactato para etanol se justifica por ser o etanol uma alternativa mais economicamente viável em sistemas de escala real.

## **4 MATERIAIS E MÉTODO**

O procedimento experimental foi realizado nos laboratórios de Biotecnologia Anaeróbia e Microbiologia Ambiental no Instituto de Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas/MG – campus Poços de Caldas e no *Argonne National Laboratory* em Lemont/IL nos Estados Unidos.

### **4.1 Fluxograma experimental**

A Figura 1 representa o fluxograma com todas as etapas envolvidas na metodologia desse trabalho.

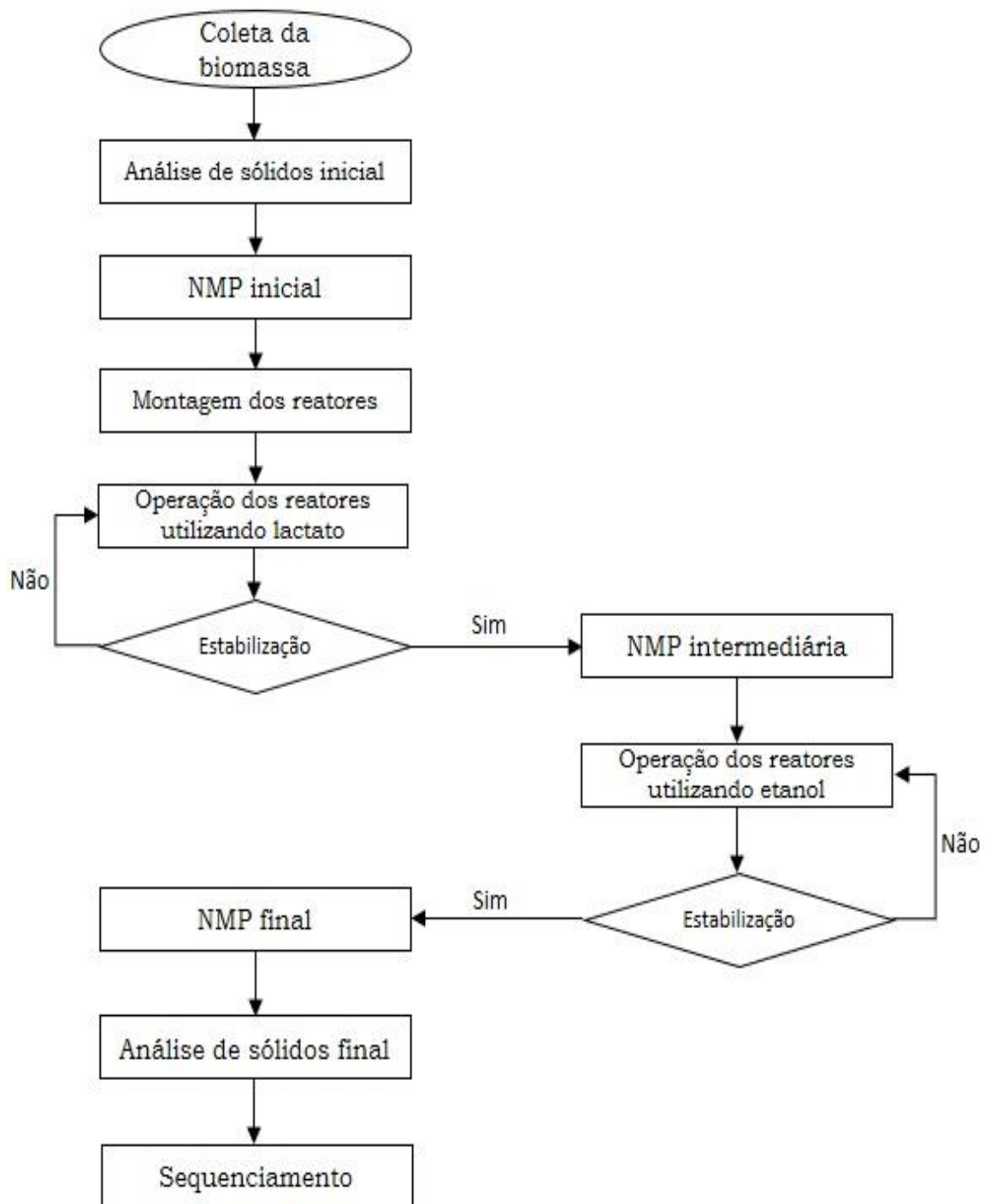


Figura 1 – Detalhamento das etapas realizadas no trabalho  
Fonte: Do autor.

## 4.2 Reatores em batelada alimentada e inóculo

Foram montados oito reatores em frascos de vidro de borosilicato de 500mL, contendo 350 mL de meio de cultura inorgânico (Tabela 7), como demonstrado na Figura 2. Os reatores foram mantidos em mesa agitadora a 150 rpm e 30° C. O tempo de ciclo da operação foi de 48h.



Figura 2: Reator anaeróbico em batelada

Fonte: Do autor.

Utilizaram-se dois inóculos provenientes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e dois oriundos de estações de tratamento de efluentes industriais (um de tratamento de resíduos de abatedouro de aves e o outro de indústria de refrigerante), todos provenientes de reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Bed* - reator anaeróbico de manta de lodo). Cada um dos reatores foi operado com uma concentração inicial de sólidos voláteis totais de 5 gSVT/L. O parâmetro operacional que diferiu os dois reatores contendo o mesmo inóculo foi a imobilização ou não da biomassa, que foi feita utilizando-se 75 cubos de 1 cm<sup>3</sup>

de espuma de poliuretano. O esquema de montagem dos reatores pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 – Organização e Montagem dos Reatores

| Reator       | ETE1-<br>S | ETE1-<br>I | ETE2-<br>S | ETE2-<br>I | ETI1-<br>S | ETI1-<br>I | ETI2-<br>S | ETI2-<br>I |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Inóculo      | ETE 1      |            | ETE 2      |            | ETI 1      |            | ETI 2      |            |
| Imobilização | Não        | Sim        | Não        | Sim        | Não        | Sim        | Não        | Sim        |

FONTE: Do autor.

A siglas ETE representam reatores inoculados com lodo oriundo de estação de tratamento de esgoto doméstico, enquanto que ETI significa que foi inoculado com lodo proveniente de estação de tratamento de efluente industrial. Os números 1 e 2 são para diferenciar entre os lodos de mesma origem (esgoto 1 e 2 ou industrial 1 e 2). A letra S e I após o hífen significa suspenso e imobilizado, respectivamente.

A imobilização da biomassa na espuma de poliuretano foi realizada por meio da imersão dos cubos de espuma em lodo (previamente batido em liquidificador), mantidos em imersão por 24h em geladeira (adaptado de Zaiat et al., 1994). Para os reatores com biomassa não imobilizada, a biomassa macerada foi diretamente suspensa em meio líquido.

Os reatores foram mantidos em mesa agitadora a 150 rpm e temperatura de 30° C. Trabalhou-se com duas fases de operação, a primeira utilizando como doador de elétrons e fonte de carbono lactato de sódio e a segunda utilizando etanol. A escolha de começar a operação utilizando lactato foi pelo fato de ser a fonte de carbono preferencial para BRS e a mudança para etanol foi pelo fato do etanol ser economicamente mais viável levando em consideração uma operação em escala industrial (Tabela 6). O meio reacional era trocado três vezes por semana e a cada troca os reatores eram submetidos ao fluxo de nitrogênio por um tempo aproximado de cinco minutos.

A fase lactato dos reatores inoculados com lodo oriundo de tratamento de esgoto doméstico tiveram uma duração de 87 dias, enquanto que a mesma fase para os reatores inoculados com lodo oriundo do tratamento de efluente industrial tiveram duração de 186 dias. Já as fases etanol dos respectivos reatores, tiveram duração de 44 dias para os inoculados com lodo doméstico e 118 dias para os inoculados com lodo industrial.

Tabela 6 – Fases operacionais dos reatores

|         | ETE1-S | ETE1-I | ETE2-S | ETE2-I | ETI1-S | ETI1-I | ETI2-S | ETI2-I |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Fase I  |        |        |        |        |        |        |        |        |
|         |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Fase II |        |        |        |        |        |        |        |        |

Fonte: Do autor.

### 4.3 Meio de cultura

Os reatores eram alimentados com uma concentração inicial de sulfato de 1500 mg/L, operando com uma relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1, o que significa que a concentração de DQO inicial também era de 1500 mg/L (Tabela 7).

Tabela 7 – Composição do meio reacional

| Constituinte                                       | Concentração (mg/L) |
|--|---------------------|
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O               | 213                 |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O               | 496                 |
| ZnCl <sub>2</sub>                                  | 42                  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                    | 1832                |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | 34                  |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O               | 20                  |
| NH <sub>4</sub> Cl                                 | 58                  |

Fonte: Adaptado de VIEIRA et al. (2016).

A composição do meio reacional se baseou nos procedimentos descritos por Vieira et al. (2016). O pH inicial (afluente) era ajustado para 4,0 com auxílio de uma solução de HCl 4M, e o ajuste era feito após a pesagem dos sais, diluição e adição da fonte de carbono. As concentrações iniciais dos metais eram 100 mg/L, 20 mg/L e 5 mg/L de ferro, zinco e cobre, respectivamente.

#### **4.4 Análises físico-químicas**

As análises físico-químicas do afluente e do efluente foram realizadas no início e no fim de cada ciclo, seguindo os protocolos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al., 2012). Foram feitas as seguintes análises: pH, sulfato, sulfeto, DQO, ferro e alcalinidade.

A análise de pH utilizou o método 4500 – H<sup>+</sup> B. Para análise de sulfato utilizou-se o método turbidimétrico 4500 -  $SO_4^{2-}$ , onde o íon sulfato é precipitado por cloreto de bário em meio aquoso contendo ácido acético, formando micro cristais de sulfato de bário. A determinação da concentração se dá através da absorção da luz a 420 nm medida em espectrofotômetro. A quantificação do sulfeto dissolvido foi através do método colorimétrico por espectrofotômetro utilizando o *Kit Hach* específico para análise de sulfeto no comprimento de onda de 665 nm.

O método colorimétrico 5220 D foi utilizado para DQO, pela reação com dicromato em meio ácido, a quente. A quantidade produzida de íons de Cr<sup>3+</sup> é que vai determinar a concentração de DQO. Sua coloração é absorvida pela luz do espectrofotômetro no comprimento de 620 nm. Para a determinação de ferro utilizou a orto-fenantrolina como agente cromogênico. Esse método se baseia na redução dos íons férricos a ferrosos por meio da hidroxilamina (agente redutor) e complexação dos mesmos por meio da orto-fenantrolina. E as análises de alcalinidade foram feitas através do método de Ripley (RIPLEY et al., 1986).

#### 4.5 Análise dos dados e cálculo do erro estatístico

Devido ao período de fase lag (período no qual não se obteve resultados apresentando a mesma faixa de valores indicando estabilização do sistema) observado na maioria dos reatores durante o início da operação e após a mudança de fase, decidiu-se estabelecer a média das últimas seis análises (antes da troca de fases ou fim da operação) como a média de cada fase de operação, uma vez que nesse período notou-se consistência e maior linearidade dos resultados, sendo esse o motivo pelo qual foi decidido trocar de fase ou desativar os reatores.

Uma vez que para pequenas amostras a utilização do desvio padrão não é indicada, utilizou-se a distribuição de t-Student (Equação 7) para avaliar o erro estatístico entre os resultados.

$$\text{Erro estatístico} = t * \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

Onde n é o número de componentes na amostra, s é o desvio padrão da amostra e t é um valor encontrado na tabela da distribuição de t-Student baseado no grau de liberdade (n-1) e no intervalo de confiança adotado (no caso desse trabalho, 95%).

#### 4.6 Avaliação da população de BRS

A quantificação das BRS foi realizada no inóculo, entre as duas fases de operação e ao final da operação de cada reator por meio da técnica de Número Mais Provável (NMP) como ferramenta de quantificação. Essa técnica consiste na avaliação da quantidade de microrganismos que cresce em um meio seletivo, o que permite inferências quantitativas a respeito da população alvo.

Para o crescimento de BRS, utilizou-se o meio de cultura denominado Postgate C (representado na Tabela 8), cuja composição tem como principal característica a abundância de íons sulfato.

Utilizou-se água ultra purificada para solubilização dos sais e o ajuste de pH para 7,2 foi feito com auxílio de uma solução de NaOH 15 g/L. Após distribuído nos frascos, estes foram fluxionados com N<sub>2</sub> e autoclavados. Uma solução de sulfato ferroso (1,0 % m/v) foi adicionada aos frascos autoclavados com a finalidade de precipitar o sulfeto produzido pelas BRS e sulfeto de sódio (0,4 % m/v) foi adicionado como agente redutor.

Tabela 8 - Composição do meio de cultura Postgate C

| Sais e Reagentes                     | Composição (g/L)                      |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| NH <sub>4</sub> Cl                   | 1,00                                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,50                                  |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 0,10                                  |
| CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 0,06                                  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 4,50                                  |
| MgSO <sub>4</sub>                    | 0,06                                  |
| Lactato de Sódio                     | 6,00                                  |
| Extrato de Levedura                  | 1,00                                  |
| Citrato de Sódio                     | 0,30                                  |
| Solução de Resarzurina               | 1,00mL para cada<br>1,00 L de solução |

Fonte: (POSTGATE, 1984).

A diluição seriada da biomassa foi realizada em água de diluição específica conforme a composição da Tabela 9.

Para o preparo da amostra para a primeira série de NMPs (a partir do inóculo), retirou-se uma alíquota de 20 mL e macerou-se com auxílio de um cadinho e almofariz para desmanchar dos grânulos. Após a maceração, transferiu-se uma alíquota de 10 mL para um frasco de antibiótico de 30 mL contendo 5 g de pérolas e agitou o frasco com biomassa e pérolas manualmente, em ângulo de 45° por

20 minutos com intuito de homogeneizar a amostra e auxiliar no rompimento dos grânulos.

Tabela 9 – Composição da água de diluição

| Reagentes                               | Volume (q.s.p. 250 mL) |
|---|------------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M) | 1 mL                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 M) | 0,25 mL                |

Fonte: (POSTGATE, 1984).

Para o preparo das amostras para a série intermediária e final de NMPs, utilizaram-se diferentes procedimentos para a extração da biomassa dos reatores suspensos e imobilizados. Para os reatores com biomassa suspensa, homogeneizou-se bem o reator e retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi adicionada diretamente no frasco contendo água de diluição. Para os reatores imobilizados, retirou-se um cubo de espuma (cujo volume equivale a 1 cm<sup>3</sup> = 1 mL) e adicionou em um béquer contendo 9 mL de água ultra purificada. Com auxílio de um bastão de vidro, amassou e pressionou bem o cubo de espuma de poliuretano para extrair o máximo possível de biomassa presente nele. Após a extração, retirou-se uma alíquota de 1 mL e adicionou-se no frasco já contendo água de diluição.

Para este trabalho utilizaram-se diversas faixas de diluição seriada descritas na Tabela 10 e todas as diluições foram feitas em quintuplicatas, como demonstrado na Figura 3.

A contagem e quantificação foi feita após o período de incubação a 30°C por 30 dias. O crescimento de BRS foi avaliado pela presença de turbidez. Combinações entre respostas positivas foram a base de cálculo para estimar o NMP, através da tabela padrão de probabilidade, que confere o limite de confiança de 95% (APHA et al., 2012). A Equação 8 expressa o valor de BRS em Número Mais Provável de células por mililitro de amostra (NMP/mL).

Tabela 10 – Faixas de diluição utilizadas para cada reator

| Reator | Diluições              |                        |                        |
|--------|------------------------|------------------------|------------------------|
|        | Inicial                | Intermediária          | Final                  |
| ETE1-S | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-7}$ a $10^{-16}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETE1-I | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-7}$ a $10^{-16}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETE2-S | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-6}$ a $10^{-15}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETE2-I | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-6}$ a $10^{-15}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETI1-S | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETE1-I | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETI2-S | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |
| ETI2-I | $10^{-3}$ a $10^{-12}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ | $10^{-4}$ a $10^{-13}$ |

Fonte: Do autor.

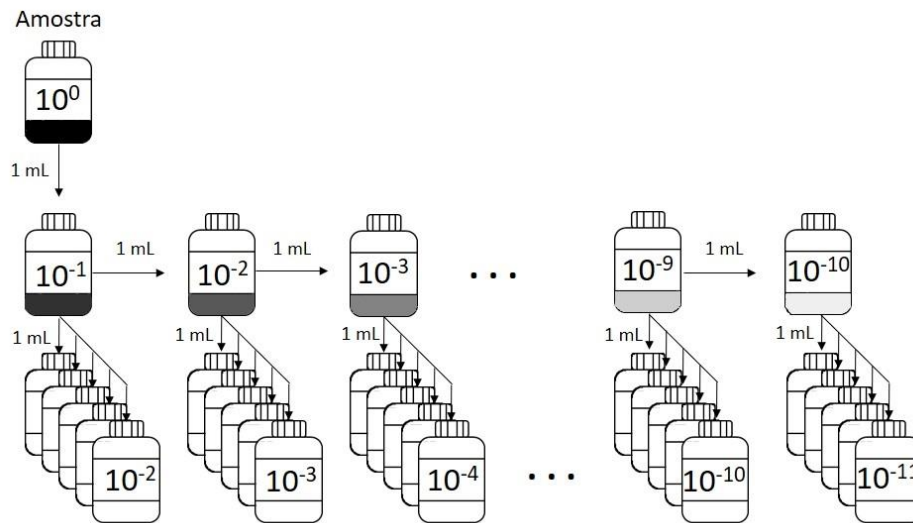


Figura 3 - Esquema de diluição seriada

Fonte: Do autor.

$$\frac{NMP}{100mL} = \text{Valor de NMP (tabelado)} * \frac{10}{V} \quad (8)$$

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

#### 4.7 Sequenciamento e análise de abundância

Foi extraído o DNA total da comunidade de amostras de cada um dos reatores (inóculo inicial, após a fase lactato e no fim da operação após a fase etanol) usando o kit de isolamento MoBio PowerSoil DNA. Os genes 16S rRNA foram amplificados a partir do DNA extraído usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) na Preparação de Amostras e Instalações de Sequenciamento Ambiental, no *Argonne National Laboratory*. Ampliou-se a região V4 deste gene em ambas as bactérias e archaea usando os primers 515F (5'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA3') e 806R (5'GGACTACNVGGGTWTCTAAT3') (WALTERS et al., 2016). Os primers forward tinham código de barras para permitir a multiplexação no Illumina MiSeq (CAPORASO et al., 2012).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25  $\mu$ L. Cada reação continha 9,5  $\mu$ L de água isenta de DNA (Qiagen), 12,5  $\mu$ L de TetraMix de PCR AccuStart II (Quantabio), 1  $\mu$ L de iniciador *forward* codificado por de Golay (concentração 5  $\mu$ L, final 200 pM), 1  $\mu$ L de iniciador *reverse* (concentração 5  $\mu$ L, 200 pM final) e 1  $\mu$ L de DNA molde. As condições de reação de PCR são as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C durante 45 segundos, 50°C durante 60 segundos e 72°C durante 90 segundos. A reação foi concluída com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C. Os amplicons de PCR foram quantificados utilizando o ensaio PicoGreen (Invitrogen) e medidos num leitor de placas Infinite 200 PRO (Tecan). Uma vez quantificados, os volumes de cada um dos produtos foram reunidos em um único tubo, de modo que todos os amplicons são representados em quantidades equimolares. Este conjunto foi depois purificado utilizando esferas AMPure XP (Beckman Coulter) e quantificado novamente utilizando um fluorômetro Qubit (Invitrogen). Após a quantificação, a molaridade da mistura foi determinada e diluída para 2 nM, desnaturada, e depois diluída para uma concentração final de 6,75 pM com um pico PhiX de 10% para o sequenciamento. Os amplicons de pares (151 $\times$ 12 $\times$ 151 pares de bases) foram então sequenciados por Illumina

MiSeq usando primers e procedimentos de sequenciamento customizados (CAPORASO et al., 2012).

Após o sequenciamento, as bibliotecas de amplicons foram processadas usando QIIME (CAPORASO et al., 2010) e USEARCH (EDGAR, 2010). As sequências foram unidas com PEAR (EDGAR, 2013) usando as configurações padrão e as sequências que não puderam ser unidas foram descartadas. Sequências unidas foram então desmultiplexadas e a qualidade filtrada usando QIIME (versão 1.9.1). Sequências de baixa qualidade foram descartadas com base nos critérios padrão no QIIME (`split_libraries_fastq.py`). Usando USEARCH (versão 8.1), as bibliotecas foram desreplicadas e rastreadas para quimeras, que também foram removidas. As sequências remanescentes foram então agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) em um ponto de corte de similaridade de 97% usando o comando `cluster_otus` e o algoritmo UPARSE-OTU (EDGAR, 2013). OTUs representadas por apenas uma única sequência em todas as amostras (singletons) foram descartadas. A triagem de qualidade e a remoção de singletons deixaram 108.379 sequências de alta qualidade do total original de 119.216, deixando uma profundidade média de sequenciamento de  $15,482 \pm 4,447$  sequências por amostra. Sequências representativas de cada OTU receberam uma taxonomia usando o banco de dados de referência SILVA (versão 132) (QUAST et al., 2013).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Desempenho Geral dos Reatores**

Com intuito de avaliar a performance das BRS no tratamento de efluentes ricos em sulfato com relação a fonte do inóculo, imobilização ou não e mudança no doador de elétrons, a remoção de sulfato, DQO, produção de sulfeto, pH, produção de alcalinidade e remoção de ferro foram estudadas em cada um dos reatores no afluente e no efluente por um período de 131 dias (87 dias operando com lactato e 44 com etanol) para os reatores operados com lodos domésticos e 304 dias (186 dias operando com lactato e 118 com etanol) para os reatores operados com lodos industriais. Para avaliação da performance dos reatores em cada fase utilizou-se os dados referentes às seis últimas análises. As concentrações de sulfato, DQO, sulfeto do afluente e do efluente, remoções de sulfato e de DQO e valores de pH para todos os reatores em todas as fases podem ser visualizadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Remoção de Sulfato, DQO, produção de sulfeto e pH

| Reatores | Fase    | Sulfato         |                 |             | DQO             |                 |             | Sulfeto         | pH        |           |
|----------|---------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------|-----------|
|          |         | Afluente (mg/L) | Efluente (mg/L) | Remoção (%) | Afluente (mg/L) | Efluente (mg/L) | Remoção (%) | Efluente (mg/L) | Afluente  | Efluente  |
| ETE1-S   | Lactato | 1573±73         | 494±247         | 69±5        | 1537±31         | 986±58          | 36±4        | 148±13          | 3,99±0,01 | 6,68±0,10 |
|          | Etanol  | 1381±115        | 502±50          | 67±4        | 1504±42         | 921±55          | 39±3        | 167±12          | 3,99±0,03 | 6,82±0,16 |
| ETE1-I   | Lactato | 1573±73         | 350±92          | 80±2        | 1537±31         | 1016±87         | 36±5        | 174±17          | 3,99±0,01 | 7,03±0,06 |
|          | Etanol  | 1375±107        | 318±44          | 77±4        | 1514±42         | 1035±19         | 31±2        | 163±28          | 3,99±0,03 | 7,01±0,08 |
| ETE2-S   | Lactato | 1573±73         | 509±92          | 68±6        | 1537±31         | 1003±44         | 35±2        | 160±31          | 3,99±0,01 | 6,71±0,17 |
|          | Etanol  | 1375±107        | 398±61          | 70±6        | 1514±42         | 928±39          | 39±3        | 166±18          | 3,99±0,03 | 6,81±0,07 |
| ETE2-I   | Lactato | 1573±73         | 356±56          | 77±4        | 1537±31         | 1018±137        | 34±9        | 170±27          | 4,99±0,01 | 7,05±0,07 |
|          | Etanol  | 1375±107        | 280±53          | 80±4        | 1514±42         | 1018±20         | 33±1        | 163±34          | 3,99±0,03 | 7,10±0,12 |
| ETI1-S   | Lactato | 1427±98         | 356±319         | 75±6        | 1556±47         | 496±81          | 70±4        | 186±14          | 3,98±0,01 | 7,12±0,07 |
|          | Etanol  | 1404±204        | 276±90          | 84±3        | 1535±79         | 573±95          | 65±5        | 207±13          | 4,00±0,01 | 8,25±0,43 |
| ETI1-I   | Lactato | 1427±98         | 466±40          | 67±3        | 1556±47         | 871±99          | 44±6        | 167±34          | 3,97±0,02 | 6,84±0,06 |
|          | Etanol  | 1404±204        | 597±56          | 60±4        | 1535±79         | 947±40          | 38±5        | 130±14          | 4,00±0,01 | 5,54±0,80 |
| ETI2-S   | Lactato | 1427±98         | 401±51          | 72±3        | 1572±45         | 610±78          | 61±4        | 182±7           | 3,97±0,02 | 7,10±0,61 |
|          | Etanol  | 1449±195        | 297±46          | 79±3        | 1535±79         | 595±38          | 61±4        | 199±14          | 4,00±0,01 | 8,08±0,34 |
| ETI2-I   | Lactato | 1427±98         | 470±35          | 67±3        | 1556±47         | 796±68          | 49±5        | 163±19          | 3,97±0,02 | 6,94±0,07 |
|          | Etanol  | 1373±155        | 866±127         | 37±11       | 1535±79         | 942±19          | 38±4        | 59±17           | 4,00±0,01 | 4,90±0,10 |

Fonte: Do autor.

Para os reatores inoculados com lodo doméstico, observou-se que as remoções de sulfato não sofreram significativas alterações com as mudanças no doador de elétrons. Assim como as remoções de sulfato, as remoções de DQO também não foram dependentes da fonte de energia utilizada. A imobilização também não acarretou mudanças significativas nesse parâmetro, resultando em valores finais de DQO efluente entre  $921 \pm 55$  e  $1035 \pm 19$  mg/L. As concentrações de sulfeto estiveram entre  $148 \pm 13$  mg/L (reator ETE1-S fase lactato) e  $174 \pm 17$  mg/L (reator ETE1-I fase lactato), indicando que não houve grandes mudanças. Os valores de pH do efluente para todos os reatores inoculados com lodo doméstico estiveram próximos a neutralidade, indicando geração de alcalinidade pelo processo.

Já para os reatores inoculados com lodo industrial, as remoções de sulfato foram de  $60 \pm 4\%$  (ETI1-I fase etanol) a  $84 \pm 3\%$  (ETI1-S fase etanol), exceto para o reator ETI2-I na fase etanol, que apresentou uma remoção de sulfato de  $(37 \pm 11\%)$ . A remoção de DQO para esses reatores durante a fase com lactato foi superior quando comparada com os reatores operados com lodo doméstico, possivelmente pelo fato de que o inóculo industrial estaria mais aclimatado a acomodar altas taxas de matéria orgânica. As concentrações de sulfeto total dissolvido variaram de  $59 \pm 17$  mg/L (ETI2-I fase etanol) a 207 mg/L (ETI1-S fase etanol). Exceto pelos reatores ETI1-I e ETI2-I (ambos na fase etanol), todos os reatores apresentaram valores de pH superiores a 6,50 no efluente, indicando produção de alcalinidade.

### **5.1.1 Sulfato**

A remoção de sulfato é o principal indicador de presença das BRS em sistemas de tratamento de efluentes, uma vez que o sulfato é o principal receptor de elétrons nas rotas metabólicas desses microrganismos. A concentrações de

sulfato do afluente e do efluente ao longo do tempo de operação dos reatores encontram-se na Figura 4.

Para todos os reatores inoculados com lodos oriundos de ETE percebeu-se a presença de uma fase *lag* (período no qual não se obteve resultados apresentando a mesma faixa de valores indicando estabilização do sistema) no início da operação dos reatores. Estes sistemas requerem um período de adaptação para a seleção de biomassa capaz de se auto sustentar sob as condições impostas pelas águas residuais. (HU et al., 2015). Os tempos de duração da fase *lag* para os reatores ETE1-S, ETE1-I, ETE2-S e ETE2-I foram 36, 40, 31 e 36 dias, respectivamente. Os reatores com biomassa imobilizada demoraram pelo menos 4 dias a mais para estabilizarem quando comparados com o mesmo inóculo, porém suspenso. A imobilização da biomassa leva uma organização do biofilme e o estabelecimento de um processo de estratificação dos microrganismos ao longo da matriz da espuma de poliuretano.

Os reatores ETE2 (suspenso e imobilizado) tiveram uma fase *lag* mais curta que os reatores inoculados com ETE1 (suspenso e imobilizado), o que significa que a origem do inóculo foi um fator relevante quanto a partida de sistemas anaeróbios para remoção do sulfato.

Assim como os reatores inoculados com lodo doméstico, os inoculados com lodo industrial também apresentaram uma fase *lag* para remoção de sulfato, porém, esses reatores demoraram em torno de 122 dias para estabilizarem os valores de remoção de sulfato, indicando a baixa presença de BRS no inóculo, o que demandou um tempo significativamente mais longo para que o sistema se tornasse sulfetogênico.

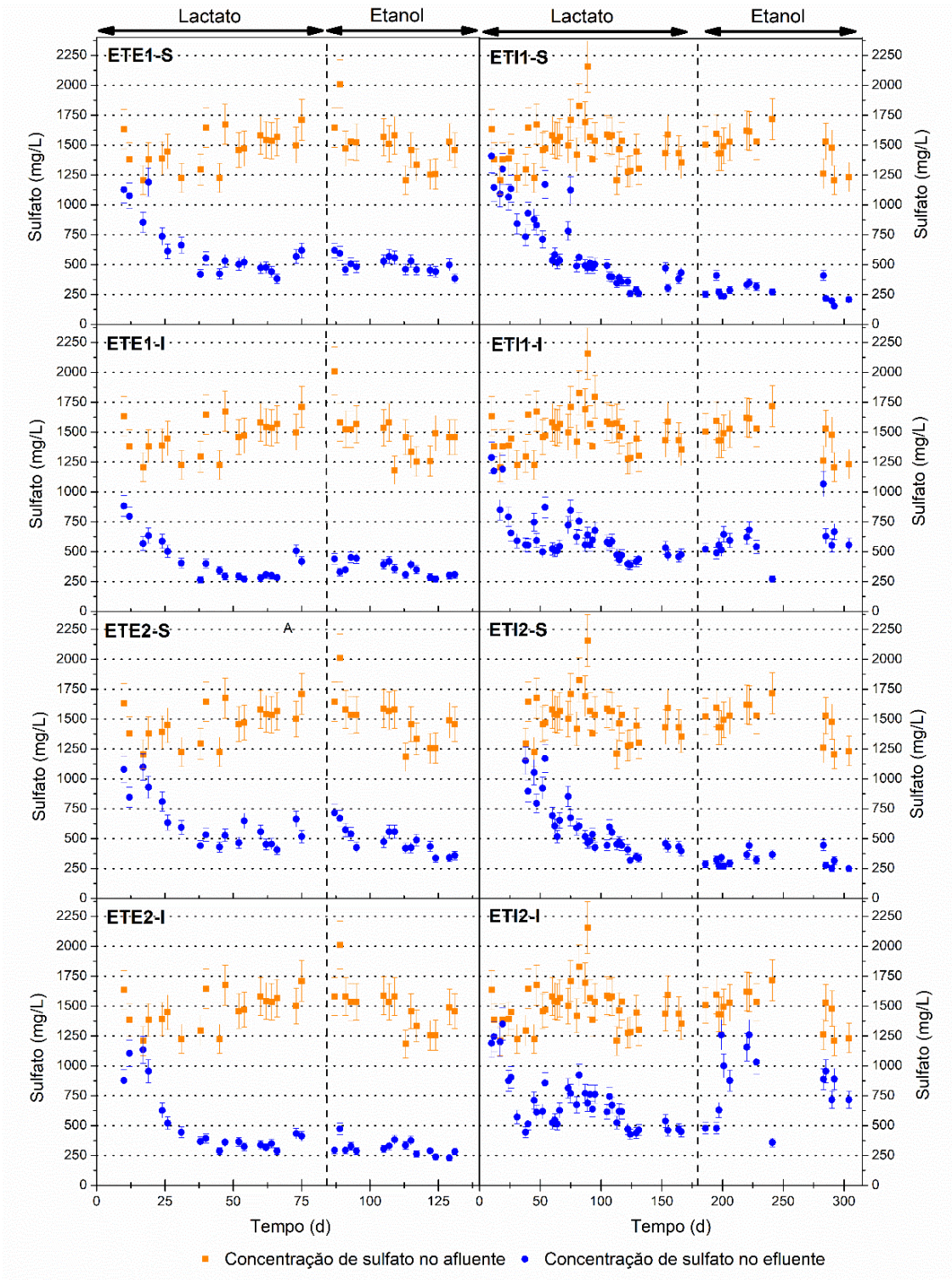


Figura 4 – Concentração de sulfato no afluente e no efluente ao longo do tempo, com incerteza de 10%

FONTE: Do autor.

Os dois tipos de lodo industrial (abatedouro de aves e indústria de refrigerantes) utilizados neste trabalho possuíam uma comunidade microbiana apta a tratar efluentes ricos em matéria orgânica (altas cargas de DQO), os caracterizando como reatores majoritariamente metanogênicos, o que explica o fato de demandarem um tempo significativamente superior para adaptação da microbiota ao efluente rico em sulfato. Costa et al. (2017) e Neto (2015) operaram reator em batelada sequencial tratando DAM, ambos utilizando inóculo com origem industrial observaram tempos de partida mais longos quando comparados com as outras fases de operação. O primeiro operou por um período de 65 dias durante a fase de adaptação (enquanto que as outras fases duraram 58, 42, 40, 40 e 25 dias). Já o segundo operou por 64 dias (enquanto que as outras fases duraram 44, 14, 24, 41 e 31 dias).

Liu et al. (2002) avaliaram a diversidade microbiana de um reator UASB tratando efluente de cervejaria e observou que 62,4% dos microrganismos presentes eram oriundos do domínio arqueia, enquanto que o restante representava o domínio bactéria, apenas 9,4% eram células do gênero *Desulfovibrio spp.* (BRS), indicando baixas porcentagens de BRS. Wang et al. (2012) analisaram 14 plantas de tratamento de esgoto na China e verificaram que as características das águas residuárias tiveram a maior contribuição para a variância da comunidade bacteriana (25,7%), seguida pelos parâmetros operacionais (23,9%) e a localização geográfica (14,7%).

Os reatores inoculados com lodo doméstico com melhor desempenho de remoção de sulfato foram os reatores imobilizados: ETE1-I (80±2%) na fase de operação com lactato e ETE2-I (80±4%) na fase de operação com etanol, como pode ser visualizado na Figura 5.

Para os reatores inoculados com o lodo doméstico 1, observaram-se remoções de 69±5% e 80±2% para os reatores ETE1-S e ETE1-I, respectivamente, na fase de operação com lactato enquanto que na fase de operação etanol ocorreu uma ligeira diminuição nas taxas de remoção (desconsiderando o erro estatístico). Santos (2016) observou o mesmo efeito em seus reatores operados em bateladas sequenciais tratando efluente rico em sulfato. Quando os reatores foram

operados com relação DQO/Sulfato igual a 1, na presença de etanol a remoção de sulfato foi de  $73\pm 8\%$ , enquanto que na presença de lactato, a remoção observada foi de  $80\pm 8\%$ . Esses resultados concordam com a hipótese de que o lactato é uma fonte de carbono mais preferencial do que o etanol para as BRS (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007). Contudo, o mesmo não foi observado para os reatores ETE2-S e ETE2-I, em que os valores de remoção de sulfato utilizando lactato foram  $68\pm 6\%$  e  $77\pm 4\%$  e com etanol,  $70\pm 6\%$  e  $80\pm 4\%$ , respectivamente.

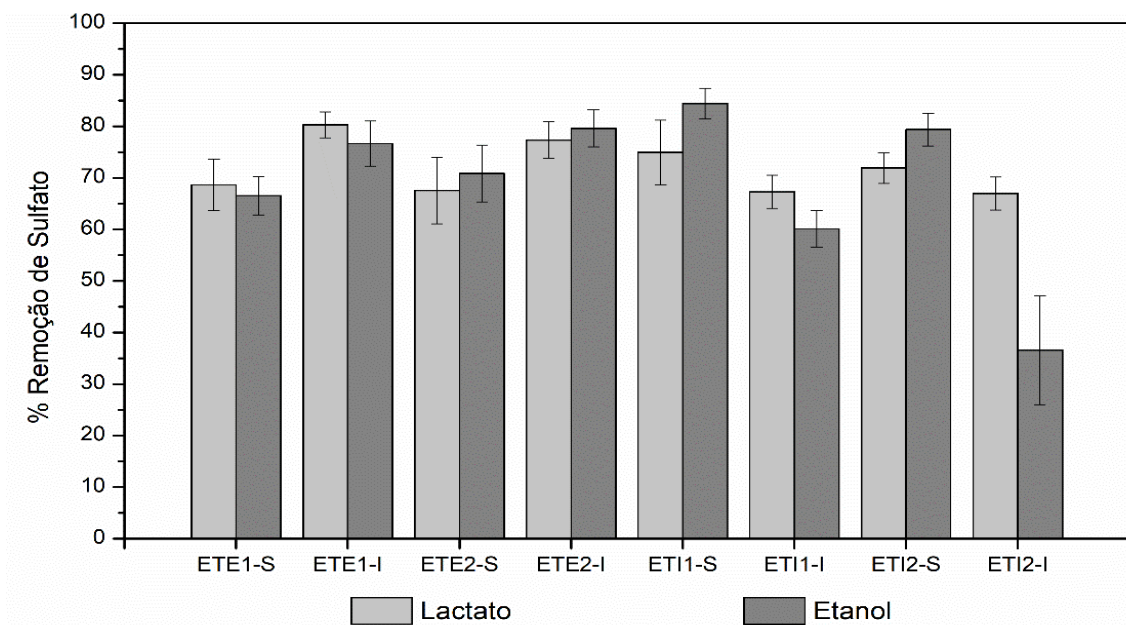


Figura 5 – Porcentagem de remoção de Sulfato  
Fonte: Do autor.

Os reatores imobilizados inoculados com lodo industrial ETI1-I e ETI2-I apresentaram valores menores de remoção de sulfato na fase etanol quando comparados com os outros reatores, totalizando uma remoção de  $60\pm 4\%$  e  $37\pm 11\%$ , respectivamente. Enquanto que os reatores com biomassa suspensa, ETI1-S e ETI2-S, durante a fase etanol alcançaram valores de remoção de  $84\pm 3\%$  e  $79\pm 3\%$ , respectivamente. Vieira et al. (2016) utilizando reator em batelada tratando DAM sintética e variação do pH inicial e concentração de metais observaram remoções de sulfato de  $38,5\pm 3,7\%$  e  $52,2\pm 3,0\%$  após a diminuição

do pH inicial do afluente (7 para 4, respectivamente) e utilizando etanol como fonte de carbono.

Sarti e Zaiat (2011) utilizando um reator batelada para o tratamento de águas ricas em sulfato avaliaram o efeito da concentração de deste ao longo da operação do reator e obtiveram valores de remoção variando de 71 até 99%. Neto (2015), também operando um reator batelada sequencial, porém no tratamento de DAM obteve valores de remoção de sulfato variando de 43 a 65%. Mockaitis et al. (2010) avaliaram a influência da carga de sulfato e DQO utilizando reator anaeróbio de batelada sequencial e obtiveram valores de remoção mínima de sulfato de 23% e máximo de 72%.

A menor remoção de sulfato observada na presença de etanol para os reatores imobilizados com lodo industrial pode estar relacionada não à fonte de carbono em si, mas ao cisalhamento das espumas de poliuretano desses reatores em função do longo período de exposição ao movimento da mesa giratória (“shaker”) na qual os reatores se encontravam para manutenção da agitação e temperatura constantes. A diferença entre os tamanhos das espumas que sofreram cisalhamento (reatores inoculados com lodos industriais) e as que não sofreram cisalhamento (reatores inoculados com lodos domésticos) pode ser visualizada na Figura 6. Além do tempo de operação dos reatores inoculados com lodos industriais ter sido maior, a diferença da comunidade microbiana constituindo o biofilme na espuma de poliuretano também pode ter sido um fator relevante para justificar o cisalhamento apenas nos reatores imobilizados inoculados com lodo de origem industrial. Daniel (2005) operou um reator de batelada sequencial imobilizado também observou o mesmo efeito nas espumas de poliuretano, que ao longo do tempo de operação foram diminuindo de tamanho, ficando arredondadas e por consequência perdendo biomassa.

O cisalhamento resultou em perda de biomassa, agravando os valores das concentrações de sulfato no efluente final, principalmente para o reator ETI2-I, que apresentou  $866 \pm 127 \text{ mgSO}_4^{2-} / \text{L}$  ao final do ciclo de 48h utilizando etanol como fonte de carbono.



Figura 6 – Espumas de poliuretano após a operação dos reatores (onde a corresponde as espumas dos reatores industriais e b dos domésticos)

Fonte: Do autor.

Visto que os valores de porcentagem de remoção de sulfato para cada reator em cada fase se basearam nos últimos dias de operação (período de estabilização), os reatores não apresentaram diferenças significativas com relação à origem do inóculo, fonte de carbono e imobilização (exceto pelo ETI-2 na fase etanol, onde ocorreu cisalhamento das espumas). Dessa maneira, apenas a fase *lag* que apresentou diferenças significativas, indicando que a utilização do lodo doméstico é mais viável por apresentar um tempo de aclimatização menor que a metade do tempo exigido pelos lodos industriais.

Por mais que os valores de remoção de sulfato em todas as fases para todos os reatores (exceto pelo reator ETI2-I na fase etanol) tenham sido superiores a 60%, as concentrações de sulfato no efluente ainda excedem 250 mg/L, que é o limite de concentração de sulfato estabelecido para descarte em águas doce classe 1 pelo CONAMA 357/11.

### 5.1.2 DQO

As variações nas concentrações de DQO ao longo do tempo de operação para os todos reatores estão representadas na Figura 7.

Para os reatores inoculados com lodo doméstico, não se observou fase *lag* para a remoção de DQO, diferentemente do observado para a remoção de sulfato. Os lodos oriundos de estações de tratamento de esgoto sanitário são normalmente expostos a concentrações médias de matéria orgânica entre 500-700 mg/L de DQO, valores inferiores comparados as concentrações utilizadas nesse trabalho (1500 mg/L). Mesmo após longo período de contato do lodo com maiores concentrações de DQO, não se observou uma adaptação desses sistemas com melhora da remoção global de matéria orgânica, que se manteve em torno de 35% para todos os reatores inoculados com lodo de esgoto doméstico, independentemente da fonte de carbono ou da estruturação da biomassa (Figura 8).

Já os reatores inoculados com lodo industrial apresentaram uma fase *lag* caracterizada por um aumento de DQO efluente, exceto pelo reator ETI2-S, que apresentou uma fase *lag* com posterior melhora na remoção de DQO quando comparado ao início da operação, visto que esse reator foi o único que não apresentava remoção de DQO no início. No início da operação dos reatores em batelada com lodo industrial observou-se uma remoção de DQO próxima a 100% (exceto em ET1-S), indicando que estes lodos possuíam elevada atividade metanogênica em função das características dos efluentes a que estavam previamente submetidos. O inóculo dos reatores ETI1 é oriundo de um reator UASB tratando efluente de indústria de refrigerantes, que contém uma concentração de DQO variando entre 1200-8000mg/L (CHEN et al., 2006) e o usado nos reatores ETI2 é oriundo de reator UASB utilizado para o tratamento de resíduo de abatedouro de aves, cuja média de DQO encontrada nesse tipo de afluente varia entre 700-4700mg/L (STEFFEN; ROBERTSON; KIRSTEN, 1989).

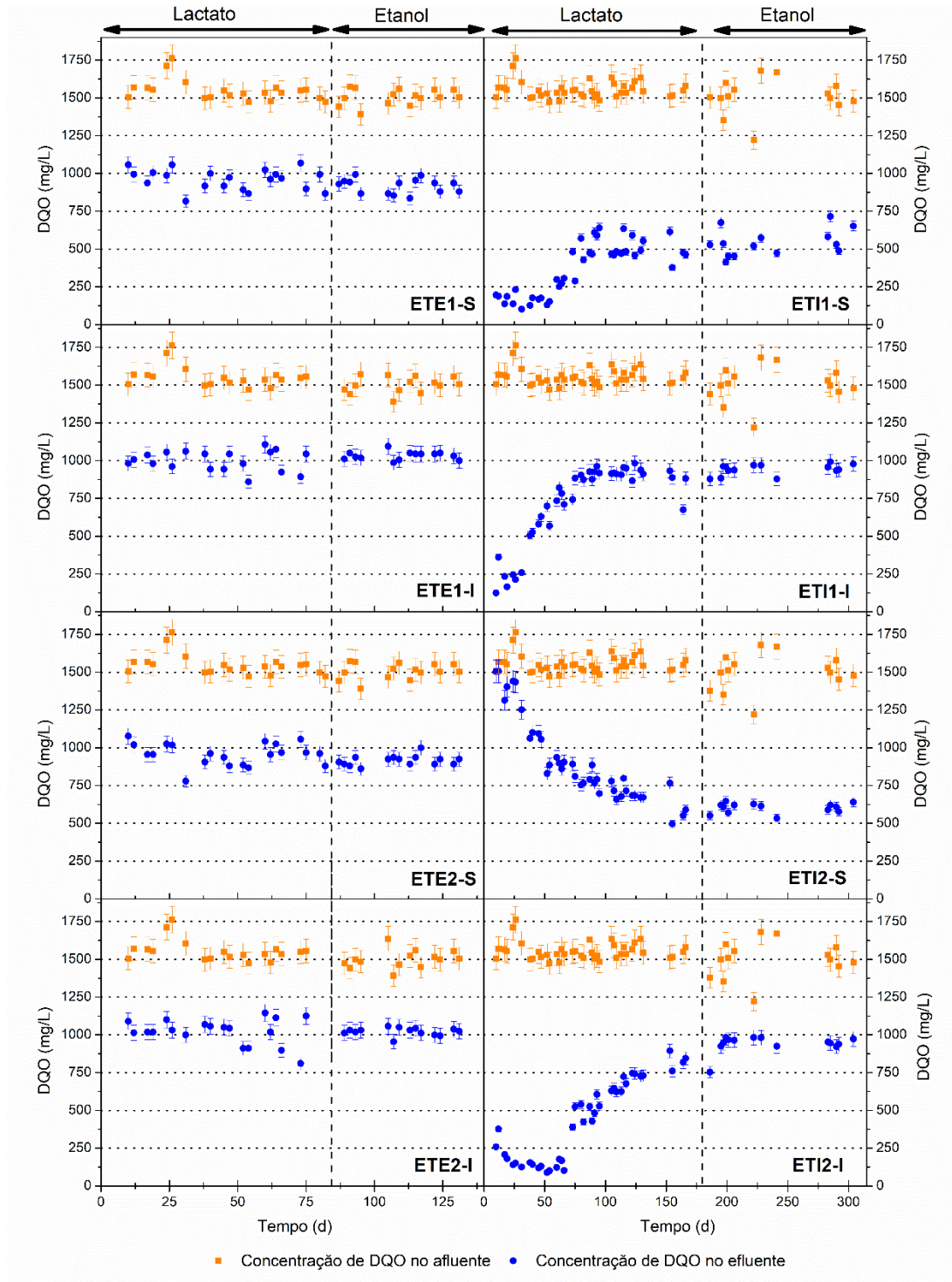


Figura 7 – Concentração de DQO no afluente e no efluente ao longo do tempo, com incerteza de 5%

Fonte: Do autor.

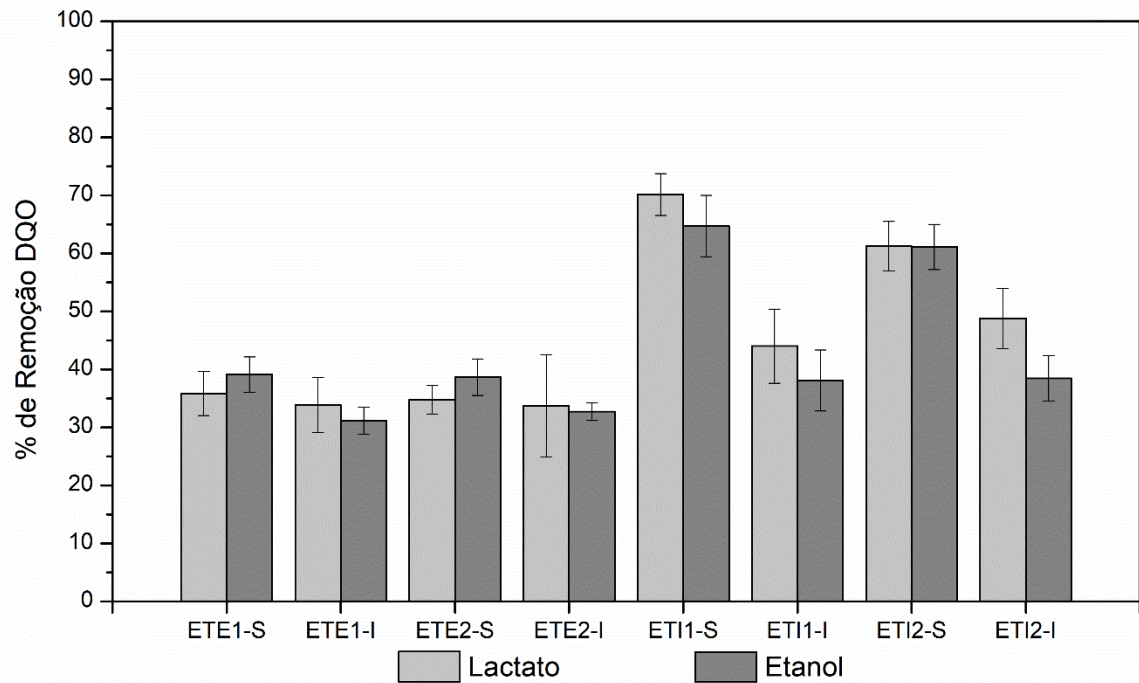


Figura 8 – Gráfico de porcentagem de remoção de DQO  
Fonte: Do autor.

Portanto, o que se observou para os reatores operados com lodos industriais foi uma mudança na característica do lodo em função da exposição a um efluente contendo sulfato como principal receptor de elétrons. A remoção de DQO foi gradativamente diminuindo e estabilizou-se após cerca de 100 a 150 dias de operação, indicando um direcionamento no fluxo de elétrons para a redução do sulfato e geração de DQO residual devido a produção de acetato pelas BRS incompletas presente no inóculo. Como esperado, os reatores operados por longo tempo apresentam alta diversidade microbiana, como será discutido no item 6.3 (HIRASAWA, 2008), conferindo uma grande capacidade de adaptação do lodo ao novo efluente, com modificações na comunidade microbiana, e ainda possibilitando que a matéria orgânica possa ser empregada por meio de diferentes vias metabólicas além da sulfetogênese, como a metanogênese e a fermentação (VIEIRA et al., 2016). Maiores detalhes a respeito da mudança na comunidade microbiana serão apresentados posteriormente pelas análises de biologia molecular.

Os valores de concentrações de oxigênio dissolvido na forma de DQO residual encontrados no efluente dos reatores ETE indicam que o tratamento não foi eficiente, uma vez que ultrapassam os limites estabelecidos pelos órgãos que controlam as emissões de efluentes em corpos hídricos. As concentrações de oxigênio em termo de DQO médias na fase lactato para os reatores ETE1-S, ETE1-I, ETE2-S e ETE2-I foram, respectivamente:  $986 \pm 58$  mg/L,  $1016 \pm 87$  mg/L,  $1003 \pm 44$  mg/L e  $1018 \pm 137$  mg/L. Enquanto que na fase de operação com etanol, esperava-se uma diminuição nesses valores pelo fato da fonte de carbono utilizada possuir um carbono a menos em sua composição, porém os valores praticamente não sofreram alteração:  $921 \pm 55$  mg/L,  $1035 \pm 19$  mg/L,  $928 \pm 39$  mg/L e  $1018 \pm 20$  mg/L para os reatores ETE1-S, ETE1-I, ETE2-S e ETE2-I, respectivamente.

Sarti et al. (2010) observaram em seus experimentos tratando efluente rico em sulfato em reator anaeróbio em batelada sequencial imobilizado, utilizando carvão ativado como material suporte que o aumento na carga aplicada de sulfato causou uma diminuição gradual na eficiência de remoção de DQO (70% para 41%) ao longo das fases de operação, enquanto que a remoção de sulfato em todas as etapas se manteve acima de 85%.

Para os reatores inoculados com lodo industrial, a imobilização da biomassa resultou em valores menores de remoção. Os valores de remoção para os reatores com biomassa suspensa ETI1 e ETI2 foram  $70 \pm 4$  e  $61 \pm 4\%$  (fase lactato) e  $65 \pm 5$  e  $61 \pm 4\%$  (fase etanol), respectivamente. Enquanto que a remoção de DQO nos reatores com biomassa imobilizada ETI1 e ETI2 foram  $44 \pm 6$  e  $49 \pm 5\%$  (fase lactato) e  $38 \pm 5$  e  $38 \pm 4\%$  (fase etanol), respectivamente. Essa diferença nos resultados de remoção de DQO quanto à imobilização indica que o fato de ter destruído os grânulos (forma na qual a biomassa se encontrava antes de ser triturada em liquidificador) e imobilizar a biomassa em espuma de poliuretano afetou de tal maneira o desempenho dos microrganismos a ponto de, no momento de estabilização, alcançar valores menores de remoção de DQO que a biomassa suspensa.

Visto que as concentrações de oxigênio dissolvido na forma de DQO são superiores ao limite estabelecido pelos órgãos ambientais para descarte no corpo hídrico, conclui-se que essa forma de tratamento foi ineficiente para remover o doador de elétrons adicionado ao efluente. Os altos valores de concentrações de oxigênio dissolvido na forma de DQO no efluente pode ser justificada pela atividade das BRS incompletas, que geram acetato como produto final de suas rotas metabólicas. Uma solução para esse problema seria a implementação de um pós-tratamento visando a remoção de matéria orgânica.

### **5.1.3 Sulfeto**

A concentração de sulfeto presente no efluente ao longo do tempo de operação nos reatores operados com lodo doméstico e industrial pode ser visualizada na Figura 9.

Observou-se em todos os reatores inoculados com lodo doméstico um aumento na produção de sulfeto ao longo do tempo, o qual pode ser associado aos gráficos de concentração de sulfato, onde foi observada diminuição de sulfato no efluente, caracterizada pela adaptação da biomassa para processos sulfetogênicos. A máxima produção média de sulfeto dentre os reatores inoculados com lodo doméstico foi obtida no reator ETE1-I, na fase do lactato ( $174 \pm 17$  mg/L). Enquanto que a menor produção média de sulfeto foi observada no reator ETE1-S na fase do etanol ( $148 \pm 13$  mg/L).

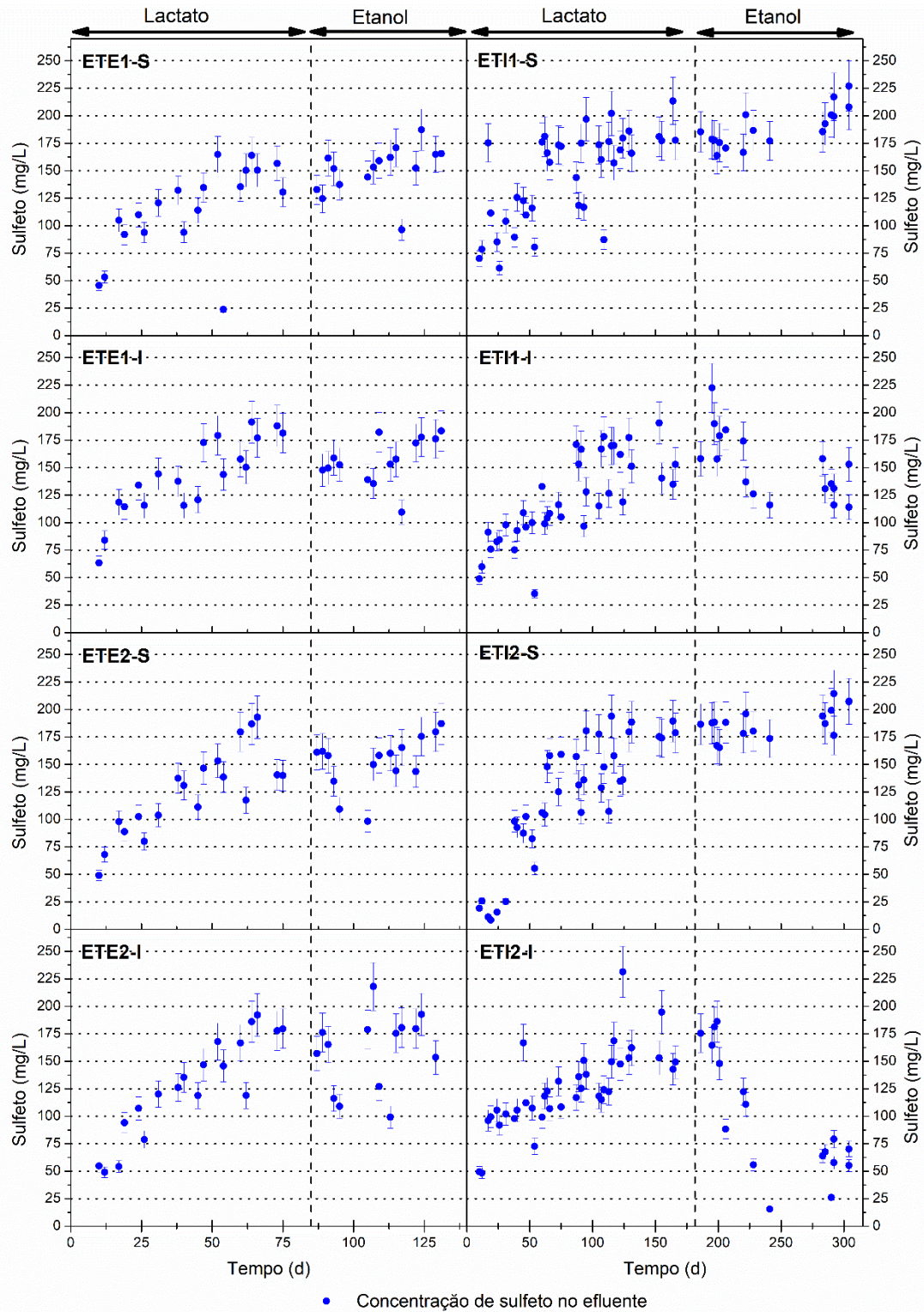


Figura 9 - Concentração de sulfeto no efluente ao longo do tempo, com incerteza de 10%  
 Fonte: Do autor.

As espécies de sulfeto produzidas a partir da redução do sulfato são extremamente influenciadas pelo pH, de acordo com o equilíbrio entre  $H_2S$ ,  $HS^-$  e  $S^{2-}$  apresentado na Figura 10. Em pH abaixo de 6 percebe-se uma predominância de  $H_2S$  na fase aquosa, e acima de 8 da espécie  $HS^-$ . Porém, na faixa de pH entre 6,0 e 8,0, em torno do  $pK_1$  da reação de equilíbrio entre as espécies  $H_2S$  e  $HS^-$  que é 6,99 alteram-se significativamente as concentrações das duas espécies. As concentrações da espécie  $S^{2-}$  é estável em pH abaixo de 14,0 (sempre próxima de zero), somente acima de pH 16,0 que a concentração dessa espécie se torna predominante (LEWIS, 2010).

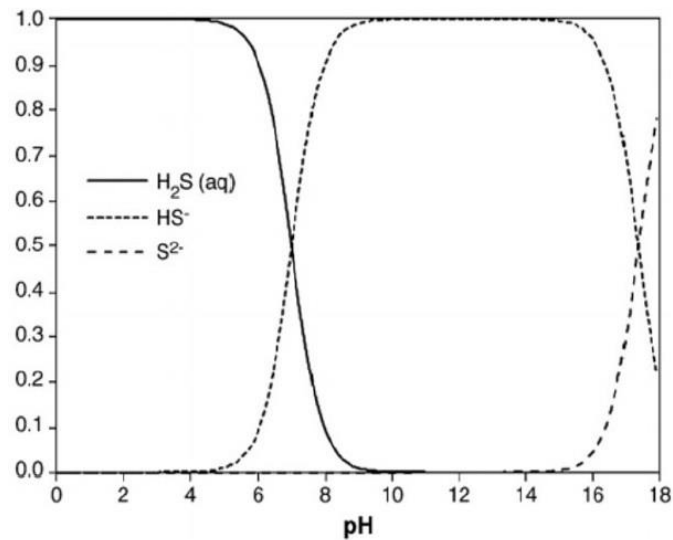


Figura 10 – Distribuição das espécies de sulfeto em função do pH  
Fonte: (LEWIS, 2010).

Por meio da Equação 9 é possível entender de forma clara como é a reação de equilíbrio entre o sulfeto de hidrogênio e o hidrogeno sulfeto, dominada pelo  $pK_1$  (LEWIS, 2010). Com auxílio das Equações 10 e 11, que se baseia no equilíbrio termodinâmico das espécies químicas do sulfeto, é possível calcular as quantidades médias de  $H_2S$  e  $HS^-$  para cada reator em cada uma das fases de operação (KALYUZHNYI; FRAGOSO; MARTINEZ, 1997).



$$[H_2S]_{aq} = \frac{1}{1+10^{(pH-pK_1)}} * [STD] \quad (10)$$

$$[HS^-]_{aq} = [STD] - [H_2S]_{aq} \quad (11)$$

As porcentagens de sulfeto de hidrogênio e hidrogeno sulfeto em cada um dos reatores em cada uma das fases, baseado na concentração média de sulfeto total dissolvido (STD) para cada fase, pH médio do efluente de cada fase e  $pK_1 = 6,99$ , está apresentada na Figura 11.

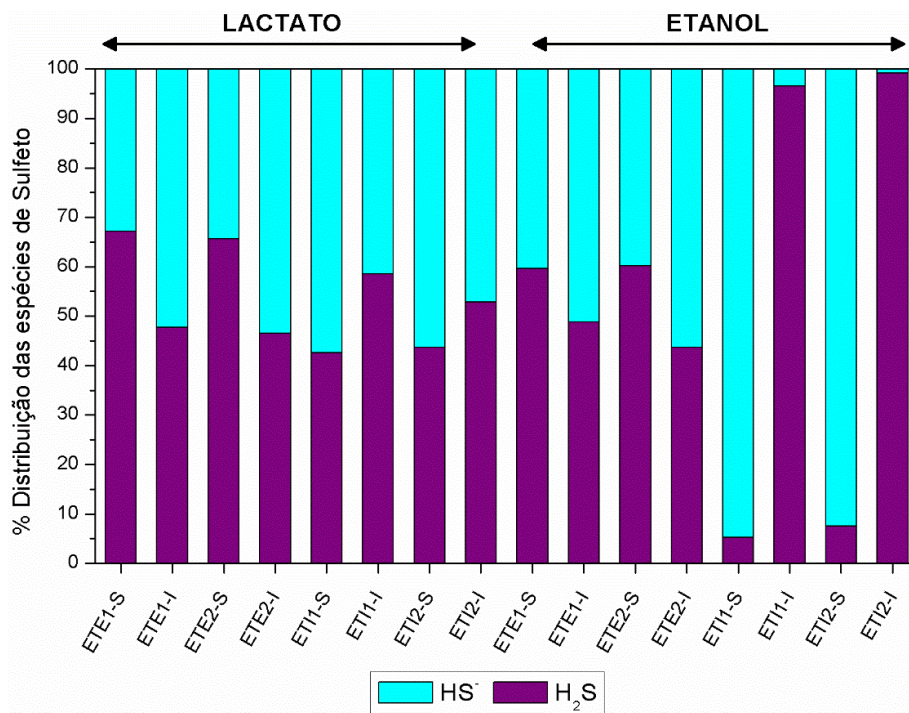


Figura 11 – Porcentagens de distribuição das médias das espécies de sulfeto  
Fonte: Do autor.

Observa-se a presença de quase 100% de  $H_2S$  nos reatores ETI1-I e ETI2-I durante a fase etanol, o que pode ser justificado pelos baixos valores de pH do efluente nessas fases:  $5,54 \pm 0,80$  e  $4,90 \pm 0,10$ , respectivamente. Atrélado ao fato da diminuição do tamanho da espuma de poliuretano com as altas concentrações de sulfeto de hidrogênio, pode justificar os baixos valores de remoção de sulfato e DQO para esses reatores nessas fases, principalmente para o reator ETI2-I,

uma vez que a toxicidade do sulfeto de hidrogênio é uma consequência recorrente em reatores sulfetogênicos (LENS et al., 1998).

Os reatores ETI1-S e ETI2-S foram os reatores que apresentaram maiores percentuais de HS<sup>-</sup>, principalmente na fase de operação com o etanol: 95% para o reator ETI1-S e 93% para ETI2-S. O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é a forma mais tóxica dentre as espécies de sulfeto, estando na sua forma não dissociada essa molécula pode permear na membrana celular dos microrganismos e ser responsável pela desnaturação de proteínas, gerando toxicidade, comprometendo a performance do sistema (STEFANIE et al., 1994). Comparado com os outros reatores, ETI1-S e ETI2-S foram os que mais removeram DQO, na fase lactato 70±4% e 61±4% e na fase etanol 65±5% e 61±4%, respectivamente. Dessa maneira, o fato desses reatores possuírem baixas concentrações de H<sub>2</sub>S implicou em um efeito menos tóxico para as AM, permitindo maiores remoções de matéria orgânica, uma vez que as AM são o grupo de microrganismos mais sensível a presença de sulfeto não dissociado. (ISA; GRUSENMEYER; VERSTRAETE, 1986).

Nos reatores ETI1-I e ETI2-I observaram-se altos índices de sulfeto de hidrogênio na fase etanol. Isso ocorreu pelo fato do cisalhamento das espumas de poliuretano originando uma queda do desempenho dos reatores, acarretando numa diminuição de pH que aumentou as concentrações de H<sub>2</sub>S, deixando o sistema ainda mais frágil pela toxicidade do H<sub>2</sub>S. Santos (2016) observou em seus reatores operados em batelada sequencial tratando efluentes ricos em sulfato que os reatores com melhor performance no tratamento foram aqueles que tiveram baixas concentrações de H<sub>2</sub>S, enquanto que os de pior performance obtiveram quase 100% de concentração de sulfeto de hidrogênio.

#### **5.1.4 pH**

Em se tratando de sistemas anaeróbios, o controle de parâmetros como alcalinidade e pH é essencial para ter uma otimização da remoção de matéria

orgânica, e em casos específicos de reatores sulfetogênicos, remoção de sulfato. Mudanças bruscas nessas variáveis podem comprometer o processo como um todo, afetando os microrganismos presentes no sistema (CHERNICHARO, 2007). Observou-se produção de alcalinidade para todos os reatores em todas as fases de operação. Os valores de pH do efluente foram superiores a 6,7 para todos os reatores em todas as fases, exceto pelos reatores ETI1-I e ETI2-I na fase etanol. Os valores de pH do efluente e do afluente ao longo do tempo de operação estão apresentados na Figura 12.

Todos os reatores inoculados com lodo doméstico apresentaram uma pequena fase *lag* nos primeiros dias de operação, aumentando em torno 0,5 unidade de pH em 30 dias. A mudança de fase nesses reatores não foi agravante, apenas o reator ETE2-S que teve uma queda 0,6 unidade de pH nos primeiros 20 dias da fase etanol.

Já os reatores inoculados com lodo industrial mantiveram valores de pH constante durante a fase lactato, exceto pelo reator ETI2-S que apresentou uma fase *lag* de aproximadamente 100 dias, visto que no início da operação não ocorria remoção de sulfato e de matéria orgânica. Porém, na fase etanol, houve diferença entre os reatores imobilizados e suspensos, onde os primeiros apresentaram um decaimento no pH de  $6,84 \pm 0,06$  e  $6,94 \pm 0,07$  para  $5,54 \pm 0,80$  e  $4,90 \pm 0,10$  (ETI1-I e ETE2-I, respectivamente) e os segundos apresentaram um aumento de  $7,12 \pm 0,07$  e  $7,10 \pm 0,61$  para  $8,25 \pm 0,43$  e  $8,08 \pm 0,34$  (ETI1-S e ETI2-S, respectivamente). Acredita-se que o motivo da queda nos valores de pH para os reatores inoculados com lodo industrial e imobilizados tenha sido uma resposta negativa causada pelo cisalhamento da espuma de poliuretano ocorrido devido ao movimento da mesa giratória.

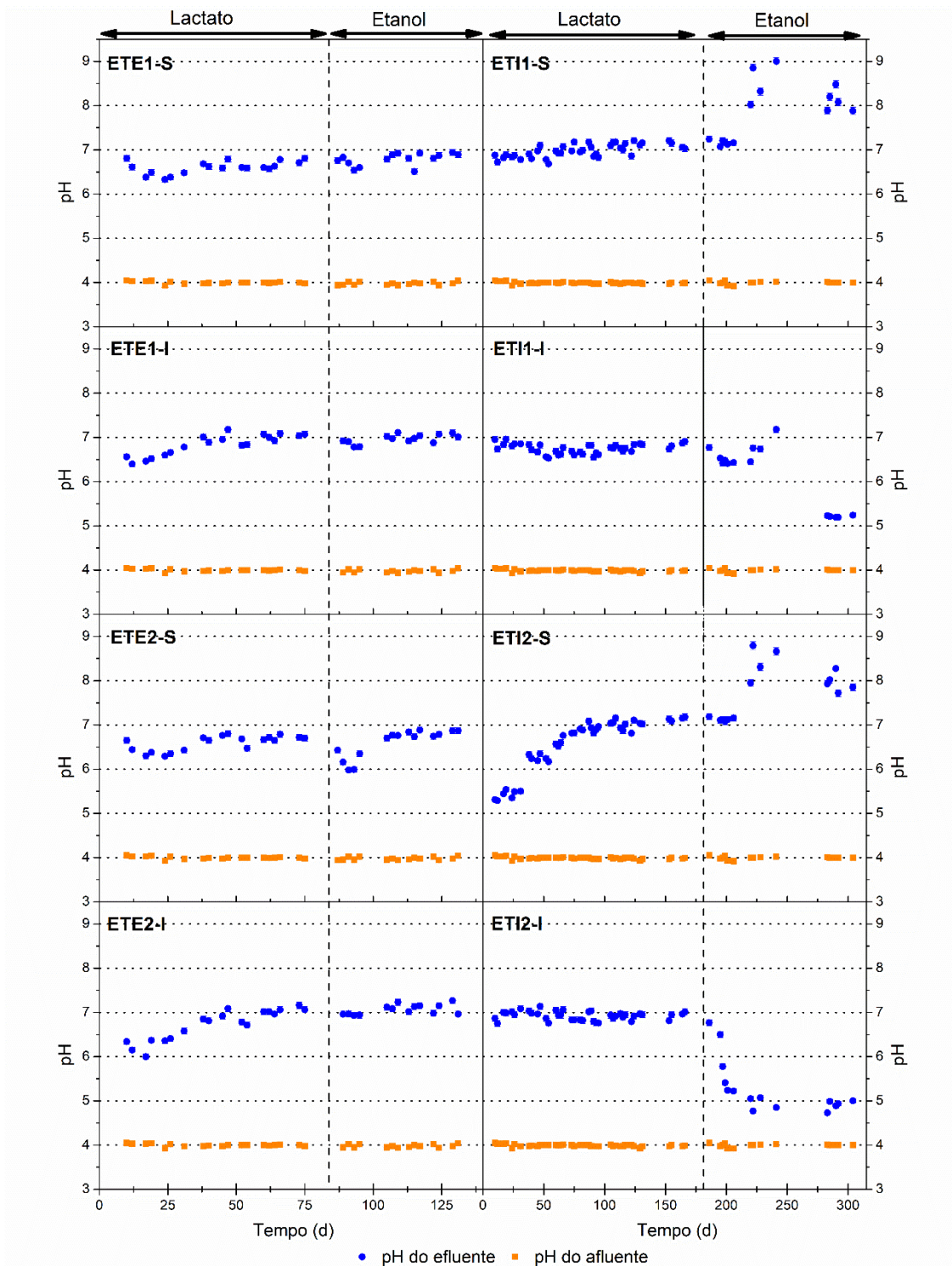
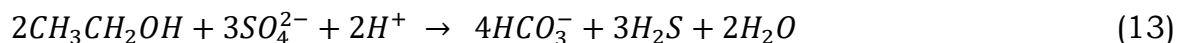
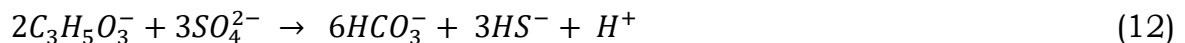


Figura 12 – Variação de pH do afluente e do efluente ao longo do tempo, com incerteza de 5%.

FONTE: Do autor.

Martins et al. (2011) utilizando um reator anaeróbio de leito fixo com fluxo ascendente tratando DAM de duas fontes distintas chegou à mesma conclusão para ambas: houve um aumento de pH de 2,8 para 6,5, com remoções de 72% de sulfato e 99% de metais. Cunha et al. (2018) operando reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando DAM sintética com pH 4,0 utilizando etanol como fonte de carbono observou em todas as fases de operação o pH do efluente acima de 6,0, tendo um valor médio de pH do efluente de  $6,3 \pm 0,6$ .

Em sistemas anaeróbios com redução de sulfato, a geração de alcalinidade está diretamente ligada ao consumo da matéria orgânica, uma vez que o consumo da fonte de carbono pela rota completa gera  $\text{CO}_2$ , que devido ao seu valor de  $\text{pK}_a$  (6,35) vai a bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), que é o maior responsável pela geração de alcalinidade. A oxidação completa e a incompleta de lactato gera alcalinidade, uma vez que a molécula de lactato possui três carbonos, então mesmo na rota incompleta que produz acetato, um dos carbonos é levado a bicarbonato. Enquanto que para o etanol apenas a rota completa gera alcalinidade, uma vez que a molécula de etanol possui apenas dois carbonos. As Equações 12 e 13 representam a oxidação completa de lactato e etanol, respectivamente.



Utilizando a quantidade de DQO consumida pelo sistema com auxílio da Equação 14 e 15, pode-se calcular a quantidade de íons  $\text{H}^+$  consumidos em função da produção de íons bicarbonato (Equação 16). Por meio da Equação 17, pode-se calcular quantas unidades de pH deveriam ter sido aumentadas estequiometricamente em relação ao pH do afluente.





$$pH = -\log[H^+] \quad (17)$$

A Tabela 12 mostra as unidades de pH correspondentes à quantidade de íons bicarbonatos produzidos, o pH estequiométrico calculado e o pH real do efluente em cada fase de cada um dos reatores.

Tabela 12 – Aumento pH estequiometricamente

| Reator | Fase    | DQO removida (mg/L) | [HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mol/L) | Aumento do pH | pH Estequiométrico | pH real |
|--------|---------|---------------------|--|---------------|--------------------|---------|
| ETE1-S | lactato | 554                 | 0,02                                     | 1,76          | 5,75               | 6,68    |
|        | etanol  | 593                 | 0,01                                     | 1,91          | 5,90               | 6,82    |
| ETE1-I | lactato | 521                 | 0,02                                     | 1,79          | 5,78               | 7,03    |
|        | etanol  | 479                 | 0,01                                     | 2,00          | 5,99               | 7,01    |
| ETE2-S | lactato | 534                 | 0,02                                     | 1,78          | 5,77               | 6,71    |
|        | etanol  | 586                 | 0,01                                     | 1,91          | 5,90               | 6,81    |
| ETE2-I | lactato | 519                 | 0,02                                     | 1,79          | 5,78               | 7,05    |
|        | etanol  | 496                 | 0,01                                     | 1,99          | 5,98               | 7,10    |
| ETI1-S | lactato | 1060                | 0,03                                     | 1,48          | 5,46               | 7,12    |
|        | etanol  | 962                 | 0,02                                     | 1,70          | 5,70               | 8,25    |
| ETI1-I | lactato | 685                 | 0,02                                     | 1,67          | 5,64               | 6,84    |
|        | etanol  | 588                 | 0,01                                     | 1,91          | 5,91               | 5,54    |
| ETI2-S | lactato | 946                 | 0,03                                     | 1,53          | 5,50               | 7,10    |
|        | etanol  | 940                 | 0,02                                     | 1,71          | 5,71               | 8,08    |
| ETI2-I | lactato | 760                 | 0,02                                     | 1,62          | 5,59               | 6,94    |
|        | etanol  | 593                 | 0,01                                     | 1,91          | 5,91               | 4,90    |

Fonte: Do autor.

Considerando apenas a rota completa da degradação de lactato e etanol, para todos os reatores, tem-se que o valor do pH estequiométrico é inferior ao valor do pH real, exceto pelos reatores ETI1-I e ETI2-I com etanol. O íon bicarbonato, entretanto, não é o único responsável pela neutralização de íons H<sup>+</sup> em reatores anaeróbios, visto que a alcalinidade é fruto dos sais de ácidos fracos, sendo 70%

dessa alcalinidade oriunda do bicarbonato originado da oxidação da matéria orgânica, enquanto que os outros 30% são de fosfatos, carbonatos, etc (CHERNICHARO, 2006). Outro fator que influencia diretamente no pH do sistema em sistemas sulfetogênicos é a presença do íon sulfeto que, seja na forma de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) ou hidrogeno sulfeto ( $HS^-$ ), ambos “roubam” íon  $H^+$  do sistema para estabilizar o sulfeto produzido ( $S^{2-}$ ), contribuindo de forma indireta para a alcalinização do meio.

Exceto pelo reator ETI2-I que apresentou pH do efluente  $4,90 \pm 0,10$  durante a fase etanol, todos os outros reatores apresentaram valores que se enquadram nas normas do CONAMA 430/11 que permite eliminação de efluentes com pH entre 5 e 9.

### 5.1.5 Alcalinidade e Ferro

A geração de alcalinidade pode ser visualizada por meio da Figura 13.

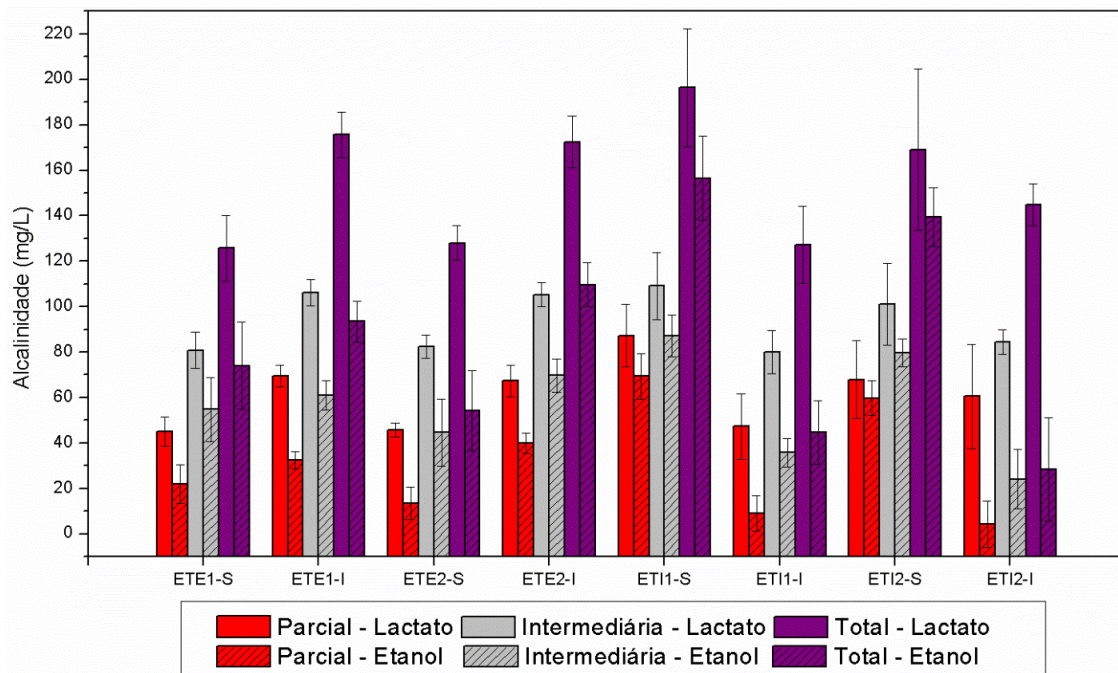
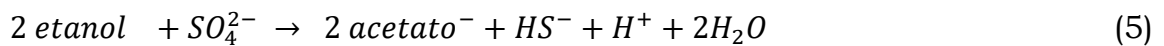
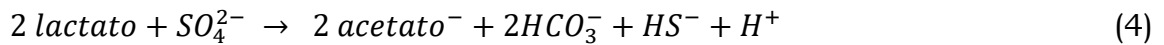


Figura 13 – Alcalinidades parcial, intermediária e total do efluente

Fonte: Do autor.

Sabe-se que a oxidação completa do lactato por meio da sulfetogênese gera 3 moléculas de bicarbonato (alcalinidade) por cada mol de substrato (Equações 4 e 6), enquanto que a oxidação completa do etanol gera apenas 2 mols de alcalinidade (Equações 5 e 6). Portanto, a oxidação incompleta do lactato gera 1 mol de alcalinidade enquanto que a do etanol não gera nenhum. Dessa maneira, por meio da Figura 13 pode-se confirmar que a alcalinidade gerada pelo etanol foi inferior do que a gerada pelo lactato, como previsto.



Quanto a imobilização, verifica-se que entre os reatores inoculados com biomassa oriunda de lodo doméstico, os imobilizados apresentaram valores superiores de alcalinidade. O oposto aconteceu com os reatores inoculados com biomassa oriunda de lodo industrial, apresentando valores de alcalinidade superior para os suspensos. Entretanto, a origem do inóculo não influenciou os resultados de alcalinidade de forma perceptível. Sampaio (2015) operando reator UASB tratando DAM observou valores de alcalinidade em sua fase inicial de operação próximos aos encontrados nesse trabalho (125±42 mg/L).

Os valores para remoção de ferro foram acima de 90% em todas as fases para todos os reatores e podem ser visualizados de maneira detalhada na Tabela 13.

Exceto pelo reator ETI2-S na fase lactato, todos os outros reatores apresentaram concentrações de ferro no efluente inferiores a 15 mg/L - limite estabelecido pelo CONAMA na resolução 430/11.

Tabela 13 – Remoção média de ferro para cada etapa experimental

| Reatores | Doador de elétrons | Afluente (mg/L) | Efluente (mg/L) | Remoção (%) |
|----------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| ETE1-S   | Lactato            | 96,79±2,60      | 0,55±0,60       | 99,43±0,63  |
|          | Etanol             | 97,86±3,93      | 0,70±0,94       | 99,29±0,92  |
| ETE1-I   | Lactato            | 96,79±2,60      | 0,31±0,18       | 99,68±0,19  |
|          | Etanol             | 98,60±3,74      | 0,38±0,14       | 99,61±0,14  |
| ETE2-S   | Lactato            | 96,79±2,60      | 0,24±0,21       | 99,76±0,22  |
|          | Etanol             | 98,35±3,73      | 0,34±0,17       | 99,65±0,17  |
| ETE2-I   | Lactato            | 96,79±2,60      | 0,25±0,15       | 99,74±0,15  |
|          | Etanol             | 98,60±3,74      | 0,25±0,15       | 99,75±0,15  |
| ETI1-S   | Lactato            | 98,07±3,60      | 0,31±0,17       | 99,69±0,18  |
|          | Etanol             | 92,22±9,22      | 0,32±0,28       | 99,65±0,31  |
| ETI1-I   | Lactato            | 98,28±3,66      | 0,28±0,18       | 99,70±0,18  |
|          | Etanol             | 91,42±9,02      | 1,27±1,76       | 98,60±2,06  |
| ETI2-S   | Lactato            | 98,07±3,59      | 19,18±4,39      | 91,47±4,49  |
|          | Etanol             | 92,22±9,22      | 7,81±7,29       | 91,76±7,70  |
| ETI2-I   | Lactato            | 98,07±3,59      | 0,48±1,29       | 99,39±1,52  |
|          | Etanol             | 92,22±9,22      | 8,01±14,29      | 96,57±4,64  |

Fonte: Do autor.

Zhang e Wang (2013) conduzindo experimentos avaliando reatores em batelada para tratamento de efluente de mina de carvão e utilizando lactato e etanol como fonte de carbono observaram alta eficiência na neutralização do efluente e altas remoções de sulfato (86,3 e 84,1%) e metais (Fe: 97,5 e 90,7%; Cu: 100 e 100%; Zn: 73,3 e 86,7%). Costa et al. (2017) verificou remoção de 99%, 93-96% e 100% de remoção de ferro, cobre e zinco, respectivamente, em seu estudo avaliando a remoção de metais e sulfato de DAM utilizando etanol como doador de elétrons em reator anaeróbico de batelada sequencial. Dev et al. (2017) utilizando reator contínuo de leito preenchido (PBR) no tratamento da DAM real (coletada nas indústrias de mineração: um de carvão e outro de metais), observou uma remoção de metais entre 94-98%. As remoções de Fe, Cu e Zn totais foram 97,5, 98,2 e 97,5% no reator 1 (tratando a DAM oriunda da mina de carvão) e 94,7, 95,7 e 96,7% no reator 2 (tratando a DAM oriunda da mina de metais), respectivamente.

## 5.2 Quantificação das Populações

Para análise de crescimento das BRS durante a operação dos reatores e comparação durante as etapas de operação, determinou-se a concentração inicial de BRS dos lodos utilizados para inocular os reatores (feita antes de iniciar a operação com lactato), a intermediária antes da mudança de doador de elétrons (no fim da fase lactato) e ao final no último dia de operação dos reatores (após a fase etanol). Avaliando três sequencias de diluição consecutivas e a combinação entre tubos positivos e negativos, os valores de NMP/100mL e os valores de células/100mL (através da Equação 8) correspondentes a cada reator em cada etapa estão apresentados na Tabela 14.

A Figura 14 representa graficamente os valores de NMP (células/100mL) obtidos por meio da Equação 8.

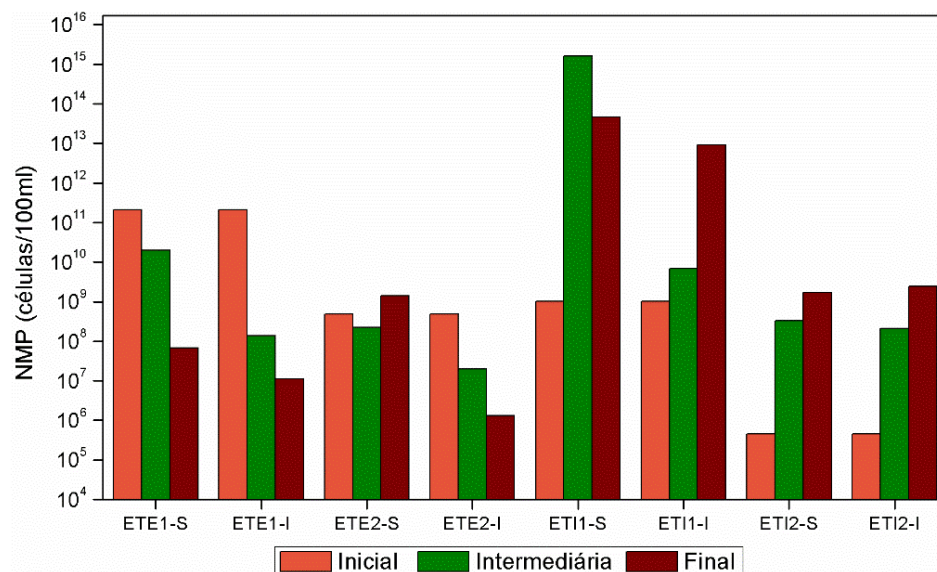


Figura 14 – NMP inicial, intermediária e final dos reatores

Fonte: Do autor.

Tabela 14 - Quantificação da população de BRS através da técnica de NMP

| Reatores | Etapa         | Faixa de Diluição                    | Tubos Positivos | NMP/100mL | NMP (células/100mL)   |
|----------|---------------|--------------------------------------|-----------------|-----------|-----------------------|
| ETE1-S   | Inicial       | $10^{-10}$ , $10^{-11}$ e $10^{-12}$ | 3-2-0           | 14        | $1,4 \times 10^{12}$  |
|          | Intermediária | $10^{-9}$ , $10^{-10}$ e $10^{-11}$  | 1-0-0           | 2         | $2,0 \times 10^{10}$  |
|          | Final         | $10^{-6}$ , $10^{-7}$ e $10^{-8}$    | 2-0-1           | 6,8       | $6,8 \times 10^7$     |
| ETE1-I   | Inicial       | $10^{-10}$ , $10^{-11}$ e $10^{-12}$ | 3-2-0           | 14        | $1,4 \times 10^{12}$  |
|          | Intermediária | $10^{-7}$ , $10^{-8}$ e $10^{-9}$    | 2-0-1           | 6,8       | $1,4 \times 10^8$     |
|          | Final         | $10^{-5}$ , $10^{-6}$ e $10^{-7}$    | 3-1-0           | 11        | $1,1 \times 10^7$     |
| ETE2-S   | Inicial       | $10^{-7}$ , $10^{-8}$ e $10^{-9}$    | 4-4-0           | 34        | $4,8 \times 10^8$     |
|          | Intermediária | $10^{-6}$ , $10^{-7}$ e $10^{-8}$    | 4-2-0           | 22        | $2,2 \times 10^8$     |
|          | Final         | $10^{-7}$ , $10^{-8}$ e $10^{-9}$    | 3-2-0           | 14        | $1,4 \times 10^9$     |
| ETE2-I   | Inicial       | $10^{-7}$ , $10^{-8}$ e $10^{-9}$    | 4-4-0           | 34        | $4,8 \times 10^7$     |
|          | Intermediária | $10^{-7}$ , $10^{-8}$ e $10^{-9}$    | 1-0-0           | 2         | $2,0 \times 10^7$     |
|          | Final         | $10^{-4}$ , $10^{-5}$ e $10^{-6}$    | 4-0-0           | 13        | $1,3 \times 10^6$     |
| ETI1-S   | Inicial       | $10^{-9}$ , $10^{-10}$ e $10^{-11}$  | 3-0-2           | 13        | $1,0 \times 10^9$     |
|          | Intermediária | $10^{-11}$ , $10^{-12}$ e $10^{-13}$ | 5-5-5           | >1600     | $>1,6 \times 10^{15}$ |
|          | Final         | $10^{-11}$ , $10^{-12}$ e $10^{-13}$ | 4-4-2           | 47        | $4,7 \times 10^{13}$  |
| ETI1-I   | Inicial       | $10^{-8}$ , $10^{-9}$ e $10^{-10}$   | 3-0-2           | 13        | $1,3 \times 10^9$     |
|          | Intermediária | $10^{-8}$ , $10^{-9}$ e $10^{-10}$   | 2-0-1           | 6,8       | $6,8 \times 10^9$     |
|          | Final         | $10^{-11}$ , $10^{-12}$ e $10^{-13}$ | 2-1-1           | 9,2       | $9,2 \times 10^{12}$  |
| ETI2-S   | Inicial       | $10^{-4}$ , $10^{-5}$ e $10^{-6}$    | 4-4-1           | 40        | $4,6 \times 10^5$     |
|          | Intermediária | $10^{-6}$ , $10^{-7}$ e $10^{-8}$    | 5-1-0           | 33        | $3,3 \times 10^8$     |
|          | Final         | $10^{-6}$ , $10^{-7}$ e $10^{-8}$    | 5-4-1           | 170       | $1,7 \times 10^9$     |
| ETI2-I   | Inicial       | $10^{-4}$ , $10^{-5}$ e $10^{-6}$    | 4-4-1           | 40        | $4,6 \times 10^5$     |
|          | Intermediária | $10^{-6}$ , $10^{-7}$ e $10^{-8}$    | 4-0-2           | 21        | $2,1 \times 10^8$     |
|          | Final         | $10^{-7}$ , $10^{-8}$ e $10^{-9}$    | 3-3-2           | 24        | $2,4 \times 10^9$     |

Fonte: Do autor.

Pode-se observar que houve uma diferença no crescimento das populações de BRS entre os reatores inoculados com lodo doméstico e com lodo industrial. Os reatores inoculados com lodo doméstico apresentaram um decaimento da população ao longo das fases, exceto pelo reator ETE2-S que apresentou um pequeno aumento da população no fim da fase etanol. Enquanto que os reatores inoculados com lodo industrial apresentaram um crescimento da população ao longo das fases de operação, exceto pelo reator ETI1-S que apresentou um declínio após a fase etanol. Esse aumento das populações de BRS nos reatores inoculados com lodo industrial pode ser justificado pela alta especificidade do efluente que era tratado pelo lodo em questão, acarretando uma pequena diversidade de microrganismos quando comparado à biomassa oriunda de

reatores tratando esgoto doméstico, tendo como consequência baixas populações de BRS.

Um aumento da população de BRS era esperado para todos os reatores, uma vez que as condições operacionais (altas cargas de sulfato, pH ácido e relação DQO/sulfato próxima de 0,67) eram favoráveis para isso. Porém, ao longo da operação dos reatores ocorreu perda de biomassa, tanto para os reatores imobilizados quanto para os suspensos, o que pode ter sido crucial para inibir o crescimento das BRS nos reatores inoculados com lodo doméstico. Essa perda de biomassa ocorria, principalmente, no momento das trocas de meio, tanto para os reatores com biomassa suspensa (troca de meio era feita com auxílio de centrífuga) ou imobilizada (toda a biomassa que se desprendia da espuma era eliminada de acordo com a maneira que a troca de meio era realizada, com auxílio de uma peneira).

Dentre todos os reatores, o reator ETI1-S foi o que apresentou maior aumento de população de BRS, principalmente na fase lactato, onde alcançou o valor de  $1,6 \times 10^{15}$  células/100mL. E mesmo após o pequeno declínio para  $4,7 \times 10^{13}$  células/100mL na fase etanol, permaneceu superior aos outros reatores. O que pode justificar os altos valores alcançados de remoção de sulfato e DQO por esse reator quando comparado com os outros reatores, alcançando a maior remoção de sulfato na fase etanol (84%) e a maior remoção de DQO na fase lactato (70%).

### **5.3 Sequenciamento e análise de abundância**

Para avaliação da abundância foram retiradas amostras iniciais dos quatro lodos antes do início da operação dos reatores, amostras intermediárias retiradas após a fase de operação com lactato e amostras finais retiradas após a fase de operação com etanol.

Com auxílio do software Past3 foi possível calcular os índices de Simpson\_1-D, Shannon\_H, Equitabilidade e Chao-1 para cada uma das amostras sequenciadas, como descrito na Tabela 15.

Tabela 15 – Índices de Diversidade e Equitabilidade

| Amostra          | Simpson_1-D | Shannon_H | Equitabilidade_J | Chao-1 |
|------------------|-------------|-----------|------------------|--------|
| Lodo ETE 1       | 0,8595      | 2,715     | 0,4974           | 235    |
| ETE1-S (lactato) | 0,7546      | 1,986     | 0,4403           | 91     |
| ETE1-S (etanol)  | 0,8464      | 2,540     | 0,5334           | 117    |
| ETE1-I (lactato) | 0,8282      | 2,439     | 0,4888           | 147    |
| ETE1-I (etanol)  | 0,8274      | 2,320     | 0,4715           | 137    |
| Lodo ETE 2       | 0,6556      | 2,122     | 0,3887           | 235    |
| ETE2-S (lactato) | 0,8816      | 2,600     | 0,5413           | 122    |
| ETE2-S (etanol)  | 0,8585      | 2,551     | 0,5258           | 128    |
| ETE2-I (lactato) | 0,9009      | 2,911     | 0,5506           | 198    |
| ETE2-I (etanol)  | 0,6609      | 1,814     | 0,3866           | 109    |
| Lodo ETI 1       | 0,9355      | 3,493     | 0,6476           | 220    |
| ETI1-S (lactato) | 0,9349      | 3,152     | 0,6300           | 149    |
| ETI1-S (etanol)  | 0,9258      | 2,991     | 0,6145           | 130    |
| ETI1-I (lactato) | 0,9449      | 3,403     | 0,6552           | 180    |
| ETI1-I (etanol)  | 0,8925      | 2,819     | 0,5774           | 132    |
| Lodo ETI 2       | 0,9715      | 4,223     | 0,7395           | 302    |
| ETI2-S (lactato) | 0,9271      | 3,137     | 0,6253           | 151    |
| ETI2-S (etanol)  | 0,9408      | 3,325     | 0,6618           | 152    |
| ETI2-I (lactato) | 0,9148      | 3,128     | 0,6010           | 182    |
| ETI2-I (etanol)  | 0,7613      | 1,764     | 0,4465           | 52     |

Fonte: Do autor.

O índice Chao-1 é responsável por determinar a riqueza da amostra, quanto maior o valor de Chao-1, maior o número de gêneros diferentes encontrado (maior a riqueza). Para todos os reatores, o índice Chao-1 foi superior no inóculo, indicando que houve uma diminuição da riqueza microbiana. O Reator ETI2-I antes de ser inoculado possuía um índice Chao-1 de 302, que após a fase etanol

caiu para 52, indicando uma seleção da população microbiana ali existente devido às condições operacionais. Exceto pelos reatores ETE1-S, ETE2-S e ETI2-S, todos os outros reatores tiveram uma diminuição (expressiva ou não) no índice Chao-1 com a mudança de fase lactato-etanol.

O índice de Shannon\_H está diretamente relacionado à diversidade. Dessa maneira, quanto maior seu valor, mais diversa será a população microbiana. Porém, geralmente os valores ficam entre 1,5 e 3,5. Esse índice também pode ser definido como o grau de incerteza em prever a qual gênero pertenceria um indivíduo retirado aleatoriamente da população (LUDWIG; REYNOLDS, 1988). A amostra do lodo ETI-2 foi a responsável pelo maior valor de Shannon\_H (4,223). Exceto pelos reatores inoculados pelo lodo ETE-2, todos os outros reatores apresentarem maiores valores de Shannon\_H para o inóculo do que para qualquer uma das fases de operação. Os menores valores de Shannon\_H foram para o reator ETI2-I (1,764) e ETE2-I (1,814), ambos na fase etanol.

Briones et al. (2007) ao estudar a diversidade microbiana em dois diferentes biorreatores tratando efluente rico em carboidratos e sulfato em diferentes períodos notou uma diminuição de 3,90 para 3,85 no período 1 e de 3,79 para 2,80 no período 2 no reator AMBR (indicando uma diminuição na diversidade) e 3,59 para 3,91 no período 1 (indicando um aumento na diversidade) e 3,82 para 3,19 (indicando uma diminuição na diversidade) no período 2 no reator UASB.

O índice de Simpson\_1-D fornece a ideia da probabilidade de se coletar aleatoriamente dois indivíduos da comunidade e, obrigatoriamente, eles pertencerem à gêneros diferentes (SIMPSON, 1949). Neste trabalho, o lodo ETI-2 apresentou o maior valor, 0,9715, o que significa uma probabilidade de 97,15% de se coletar dois indivíduos da comunidade e eles pertencerem à gêneros diferentes. O menor valor de Simpson\_1-D foi para o Lodo ETE 2 (0,6556). Nas amostras dos inóculos e dos reatores não foi observado um padrão em relação ao índice de Simpson\_1-D.

Outro índice de diversidade que é derivado do índice de Shannon é a Equitabilidade\_J, o qual permite representar a uniformidade da distribuição dos indivíduos entre os gêneros existentes, onde valores próximos a 0 tendem a

uniformidade mínima e valores próximos a 1 tendem a uniformidade máxima (Pielou, 1966). Assim como para todos os outros índices de diversidade, para a Equitabilidade\_J o maior valor também foi para o lodo ETI 2 (0,7395), indicando alta uniformidade dos dados para essa amostra. Assim como o índice de Simpson\_1-D, o lodo ETE 2 apresentou o menor valor de Equitabilidade\_J também (0,3887), indicando baixa uniformidade. Briones et al. (2007), ao estudar a diversidade microbiana em dois diferentes biorreatores tratando efluente rico em carboidratos e sulfato em diferentes períodos observou apenas valores de Equitabilidade\_J superiores aos encontrados nesse trabalho, para o reator AMBR os valores variaram de 0,88 a 0,82 no período 1 e 0,83 a 0,88 no período 2. Já para o reator UASB no período 1 a variação da Equitabilidade\_J foi de 0,83 a 0,87, enquanto que no período 2 foi de 0,84 a 0,91.

O baixo valor do índice de Shannon\_H (diversidade) e de Chao-1 (riqueza) para a amostra da fase etanol do reator ETI2-I, mostram que o cisalhamento da espuma de poliuretano acarretou em uma baixa performance desse reator, principalmente na remoção de sulfato, devido à perda que houve de microrganismos no momento da decantação na troca de meio.

Para análise de abundância de cada fase dos reatores (lactato e etanol) e do lodo utilizado para inocular esses reatores, os gráficos foram agrupados em uma mesma figura (Figuras 15, 16, 17 e 18).

O gênero dominante no inóculo ETE 1 utilizado para inocular os reatores ETE1-S e ETE2-S é o *Pseudomonas* (27,02%) seguido por 20,79% de *Paraclostridium*. O primeiro foi totalmente extinto tanto no reator ETE1-S quanto no reator ETE1-I nas duas fases, enquanto que o segundo foi totalmente extinto no ETE1-S em ambas as fases e apenas 5,39% (fase lactato) e 6,16% (fase etanol) estiveram presentes no reator ETE1-I (Figura 15).

*Pseudomonas* é um gênero de bactérias gram-negativas não formadoras de esporos que são classificadas como aeróbias, porém algumas exceções foram descobertas através de espécies desse gênero presentes em biofilmes (HASSET et al., 2002). *Paraclostridium* é um gênero da família *Peptostreptococcaceae*, a qual todos os membros são anaeróbios com metabolismo do tipo fermentativo. Os

membros dessa família são encontrados em diferentes habitats, incluindo o corpo humano, estrume, solo e sedimentos (SLOBODKIN, 2014).

O gênero *Anaerolineaceae* apresentou uma abundância relativa de 9,74% no lodo ETE 1. Este gênero caracteriza-se por microrganismos gram-negativos não formadores de esporos e anaeróbios. Espécies desse gênero são encontradas em diversos habitats e podem ser consideradas essenciais nas populações microbianas de digestores anaeróbios (LIU et al., 2017). No reator ETE1-S na fase lactato a abundância caiu para 8,19% (terceiro gênero mais abundante) e na fase etanol teve um aumento significativo para 19,33% (segundo gênero mais abundante). Enquanto que no reator ETE1-I a fase lactato teve um aumento (21,77%) e a fase etanol teve um aumento para 28,93% (sendo o segundo gênero mais abundante na fase lactato e o mais abundante na fase etanol).

O gênero mais abundante na fase lactato (41,79%) e etanol (30,09%) do reator ETE1-S é o *Bacillus* (bactérias em forma de bastonete, gram-positivas, obrigatoriamente ou facultativamente aeróbias formadoras de esporos) (BARON et al., 1996).

O gênero *Desulfovíbrio* é o segundo mais abundante na fase lactato (23,67%) e o terceiro mais abundante na fase etanol (13,13%) no reator ETE1-S. Enquanto que no reator ETE1-I na fase lactato esse gênero tem 9,76% de abundância e na fase etanol 25,39% de abundância (segundo mais abundante).

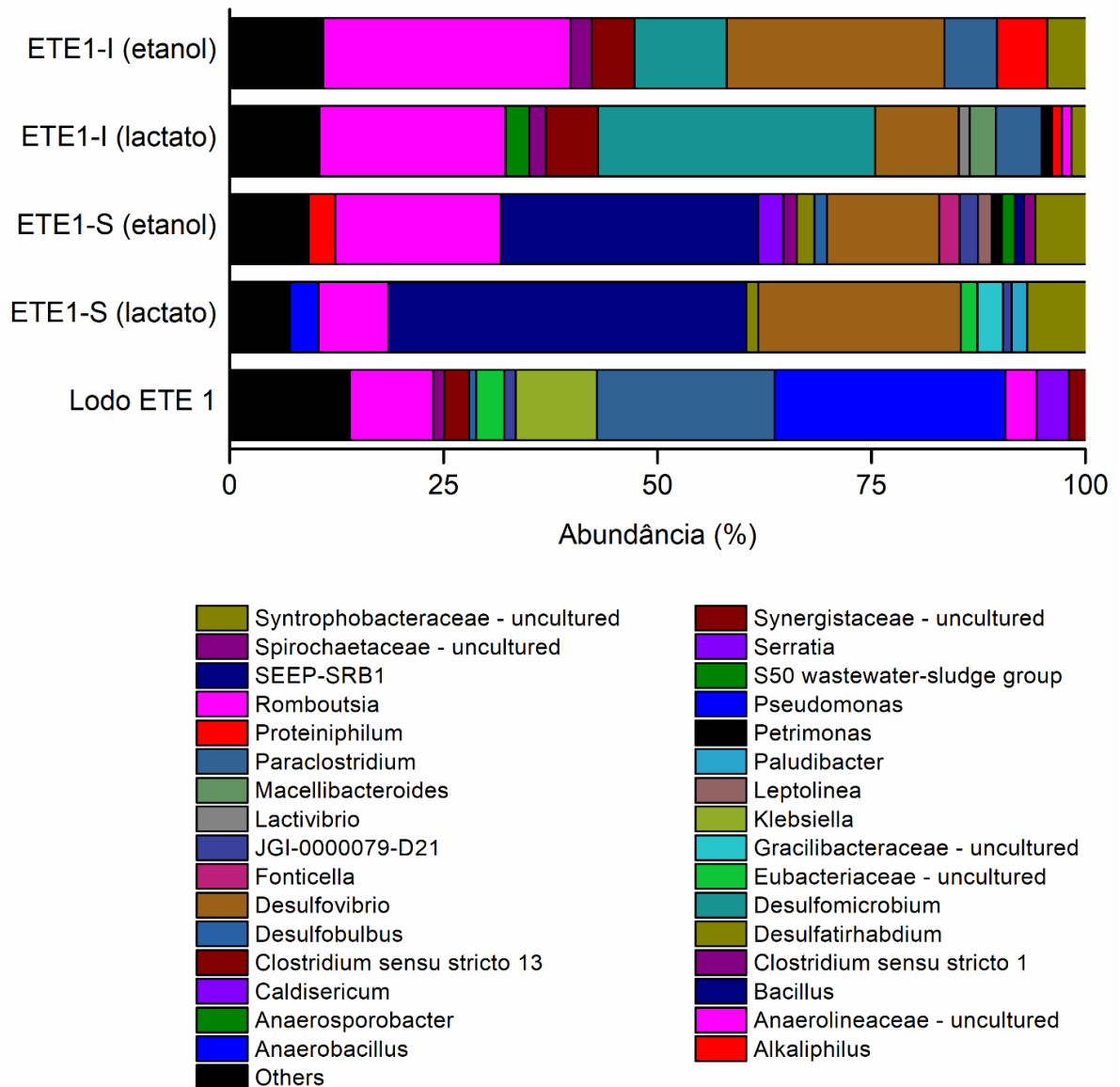


Figura 15 – Análise de abundância do Lodo ETE 1 e reatores ETE1-S e ETE1-I nas fases lactato e etanol

Fonte: Do autor.

O gênero *Desulfovibrio* é parte das bactérias redutoras de sulfato e engloba as redutoras incompletas. Os microrganismos pertencentes a este gênero exercem uma função de extrema importância em sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes ácidos com presença ou não de metais (ZHANG; WANG, 2016).

O gênero mais abundante na fase lactato do reator ETE1-I foi o *Desulfomicrobium* com 32,38%, que sofreu uma diminuição de mais da metade na fase etanol (10,82%). *Desulfomicrobium* é um gênero caracterizado por microrganismos de células curtas, retas ou elípticas, gram-negativos, anaeróbios e pertencentes do grupo das BRS incompletas que utilizam como doadores de elétrons lactato, piruvato, etanol, entre outros compostos orgânicos (BOONE, 2015).

Assim como no lodo ETE 1 (inóculo dos reatores ETE1-S e ETE1-I), o gênero *Pseudomonas* foi o mais abundante no lodo ETE 2 (56,85%), e tanto para o reator ETE2-S e ETE2-I, o percentual desse gênero foi a zero tanto na fase lactato quanto na fase etanol (Figura 16). Tong et al. (2012) avaliaram a comunidade microbiana de reatores lodos ativados de 14 plantas de tratamento de esgoto doméstico na Ásia e na América do Norte, e a ordem *Pseudomonales* (a qual o gênero *Pseudomonas* faz parte) foi encontrada em todas as amostras.

Os gêneros *Paraclostridium* e *Clostridium Sensu Strictu* 13 (ambos pertencentes a mesma ordem *Clostridiales*, caracterizadas por serem bacilos anaeróbios) presentes no inóculo ETE 2 (4,41%) só estiveram presentes na fase lactato do reator imobilizado ETE2 (7,74%).

O gênero *Desulfovibrio* no lodo ETE 2 era praticamente inexistente (0,01%), porém no reator ETE2-S na fase lactato e etanol apresentou uma abundância de 9,73% e 11,00%, respectivamente. Enquanto que no reator ETE2-I foi o gênero mais abundante em ambas as fases, 21,79% (lactato) e 55,65% (etanol).

O gênero *Desulfobulbus* (BRS incompleta, gram-negativa e pode utilizar vários compostos orgânicos como doadores de elétrons) (BOONE, 2015) foi o mais abundante na fase lactato (19,36%) do reator ETE2-S, que também apareceu na fase lactato do reator ETE2-I com uma abundância de 2,85%.

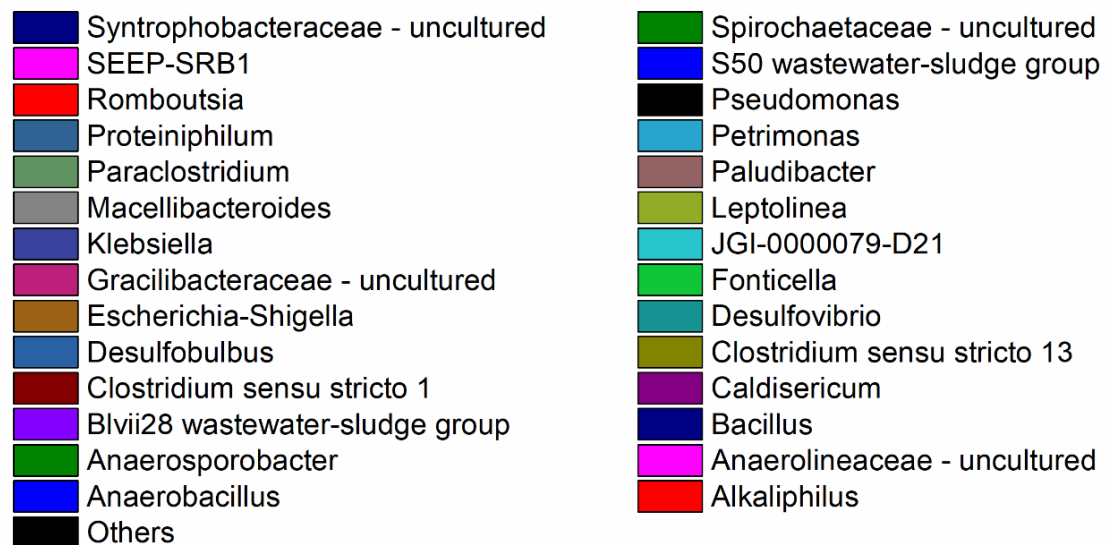
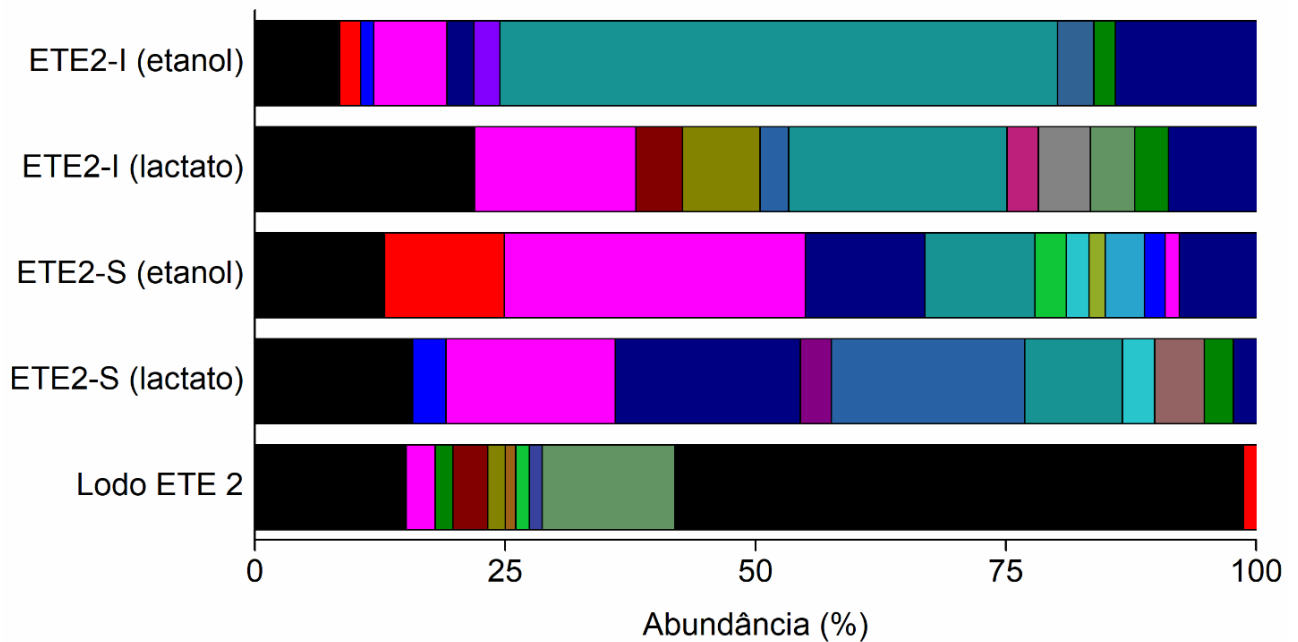


Figura 16 – Análise de abundância do Lodo ETE 2 e reatores ETE2-S e ETE2-I nas fases lactato e etanol

Fonte: Do autor.

O gênero *Anaerolineaceae* apresentou um crescimento na abundância relativa do lodo ETE2 (2,88%) para 16,90% e 16,13% na fase lactato dos reatores ETE2-S e ETE2-I, respectivamente. Enquanto que na fase etanol houve um crescimento

apenas no reator ETE2-S (30,03%), uma vez que o reator ETE2-I apresentou uma diminuição na abundância desse gênero, caindo para menos da metade (7,28%).

O reator suspenso ETE2 tanto na fase lactato quanto na fase etanol apresentou o gênero *Bacillus* como segundo mais abundante. O gênero *Syntrophobacteraceae* (gênero que engloba as BRS incompletas comumente encontrado em lodo oriundo de tratamento de esgoto doméstico) (MCINERNEY et al., 2005) esteve presente numa abundância mínima no inóculo ETE 2 (0,01%), e na fase lactato dos reatores ETE2-S e ETE2-I apresentou uma abundância de 2,29% e 8,76%, respectivamente. Enquanto que na fase etanol essa abundância aumentou para 7,68% no reator ETE2-S e para 14,07% no reator ETE2-I.

O perfil de abundância dos reatores inoculados com lodo industrial foi muito distinto daqueles inoculados com lodo oriundo de esgoto doméstico. No inóculo ETI 1, o gênero mais abundante é *Methanobacterium* com 18,15%, que também esteve presente na fase lactato nos reatores ETI1-S e ETI1-I (10,15% e 11,82%, respectivamente) e na fase etanol (9,70% e 8,92%, respectivamente), como pode ser visualizado na Figura 17. O gênero *Methanobacterium* pertence ao domínio das arqueias metanogênicas e também são hidrogenotróficas e produzem metano a partir de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (LIU et al., 2017).

Os gêneros *Serratia* (gram negativa, anaeróbia facultativa) e *Pseudomonas* foram o segundo e o terceiro gênero mais abundante no lodo ETI 1, porém desapareceram ao longo da operação dos reatores inoculados com esse lodo.

Durante a fase lactato do reator ETI1-S, o gênero mais abundante foi o *Ruminococcaceae*, com 13,69% (estritamente anaeróbio). Já na fase etanol desse mesmo reator, o gênero mais abundante foi *Klebsiella* (anaeróbias facultativas), com 13,18%, estando presente apenas nessa fase do reator e no inóculo ETI 2 (2,35%).

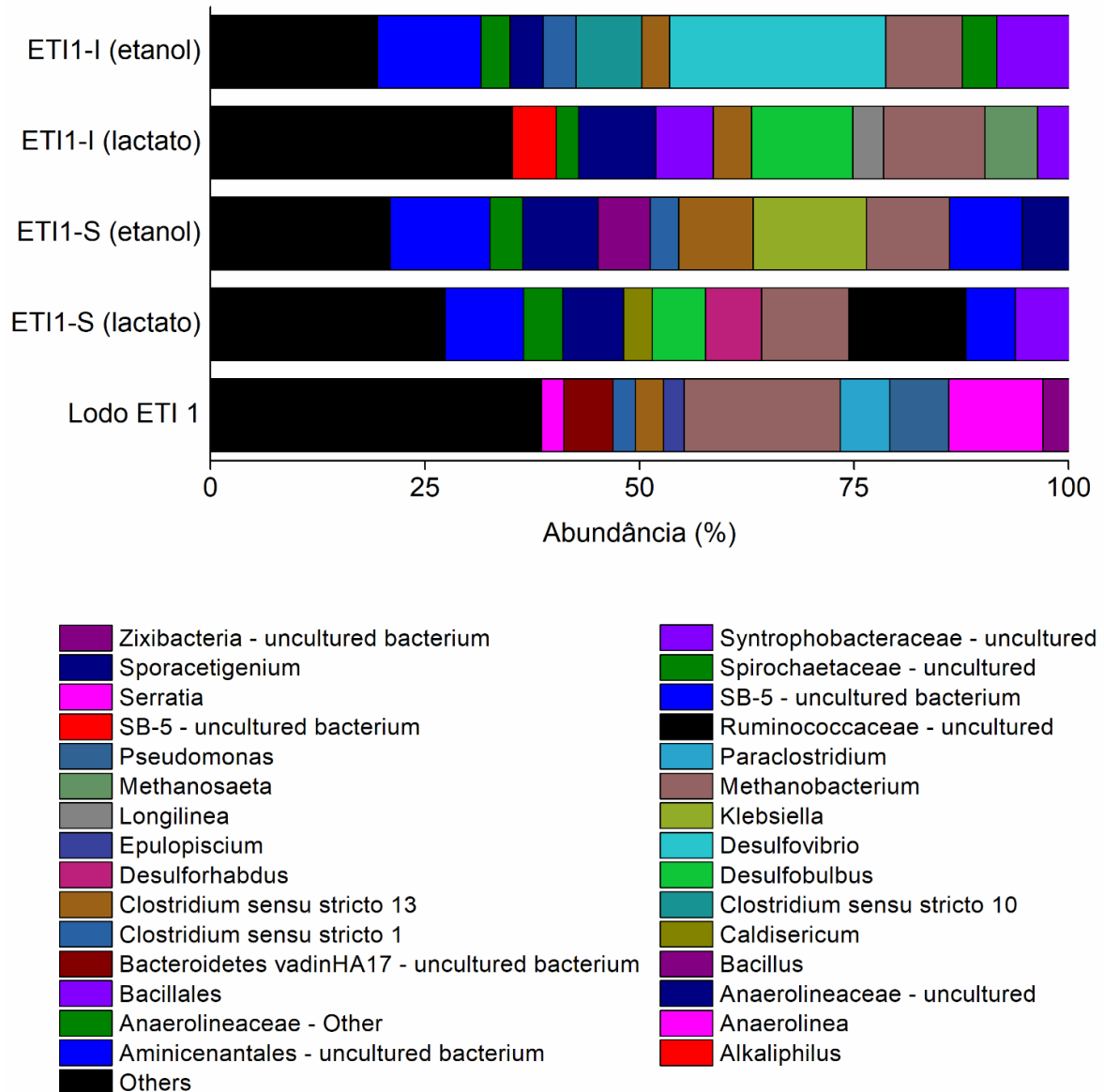


Figura 17 – Análise de abundância do Lodo ETI 1 e reatores ETI1-S e ETI1-I nas fases lactato e etanol

Fonte: Do autor.

O gênero *Aminicenantales* que não esteve presente no inóculo ETI 2, foi o segundo mais abundante na fase etanol dos reatores ETI1-S e ETI1-I, com 11,63% e 12,02%, respectivamente. O segundo gênero mais abundante no reator ETI1-I na fase lactato foi o *Desulfobulbus* com 11,00%, o qual também estava presente na fase lactato do ETI1-S (6,21%).

O gênero *Anaerolineaceae* esteve presente tanto no inóculo ETI 1, quanto nas duas fases dos reatores ETI1-S e ETI1-I. O maior percentual de abundância desse gênero nesses reatores foi encontrado na fase lactato do reator imobilizado ETI1 (9,02%). E o gênero mais abundante na fase etanol do reator imobilizado ETI1 foi *Desulfovibrio*, com 25,21%, sendo a única fase dos reatores inoculados com o lodo ETI1 a apresentar um percentual de abundância relevante para esse gênero de BRS.

No inóculo ETI 2, os dois gêneros mais abundantes foram extintos ao longo da operação dos reatores inoculados com ele (ETI2-S e ETI2-I), são eles: *Rhodanobacter* (7,98%) e *Methylophilaceae* (6,78%) (Figura 18). Visto que os dois gêneros mais abundantes da amostra lodo ETI 2 tiveram menos que 8% de abundância, explica-se o porquê do índice Shannon\_H (diversidade) ter dado um valor tão superior (4,223) comparado às outras amostras.

O gênero *Desulfobulbus*, assim como ocorrido na fase lactato dos reatores inoculados com os lodos ETE 2 e ETI 1, também teve um percentual significativo na fase lactato para os reatores ETI2-S (10,32%) e ETI2-I (21,58%), o qual no segundo foi o gênero mais abundante.

Apenas o reator ETI2-S (ambas as fases), entre os reatores inoculados com o lodo ETI 2, apresentou microrganismos do domínio *Archaea* (gênero *Methanobacterium*), mesmo que em baixos percentuais (3,44% na fase lactato e 4,15% na fase etanol).

Para o reator ETI1-S, os dois gêneros mais abundantes em ambas as fases pertencem a família *Anaerolineaceae*. Na fase etanol do reator ETI2-I, o gênero mais abundante é o *Desulfovibrio* (34,05%), seguido do gênero *Acidocella* (31,47%).



O mesmo pode ser verificado com as altas taxas de remoção de DQO observadas no início da operação dos reatores ETE1-S e ETE1-I (Figura 7), que se justifica pela presença e do gênero *Methanbacterium*, pertencente ao domínio *Archaea*, que foi o gênero mais abundante (18,15%). Ao longo da operação, percebe-se um aumento na DQO residual, que pode ser justificada pelo aumento da especificidade do lodo, se tornando mais sulfetogênico (surgimento de gêneros de BRS: *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*) e menos metanogênico (o percentual do gênero *Methanobacterium* diminui ao longo das fases).

A ausência de arqueias metanogênicas com um percentual significativo de abundância nos inóculos de origem doméstica atrelado à presença e aumento de abundância apenas de BRS incompletas (produto final da oxidação da matéria orgânica gera DQO residual – acetato) fez com que os reatores inoculados com esses lodos apresentassem baixos índices de remoção de DQO tanto na fase lactato quanto na fase etanol.

A ausência de gêneros de BRS nos inóculos oriundos de lodo industrial e o aparecimento de percentuais de abundância significativos ao longo da operação dos reatores inoculados com os lodos ETI 1 e ETI 2 também pode ser verificado através da Figura 14, que mostra os resultados das NMPs, onde é possível visualizar o crescimento das populações de BRS, principalmente na fase etanol dos reatores imobilizados onde o gênero *Desulfovibrio* se destacou.

O gênero *Desulfovibrio*, por mais que tenha aparecido na fase lactato e etanol de reatores suspensos e na fase lactato de reatores imobilizados, sua presença de maior destaque em todos os reatores foi na fase etanol dos reatores imobilizados, sendo o segundo gênero mais abundante no reator ETE1-I e o mais abundante nos reatores ETE2-I, ETI1-I e ETI2-I.

O gênero *Desulfobulbus* apresentou percentuais de abundância relevantes na fase lactato de todos os reatores (mais abundante no reator ETE1-I, ETE2-S e ETI2-I e segundo mais abundante ETI1-I), exceto nos reatores ETE1-S e ETE1-I inoculados com o lodo ETE 1.

## 6 CONCLUSÃO

O estudo desenvolvido avaliando os parâmetros fonte do inóculo, imobilização e doador de elétrons pode ser considerado relevante e apresentou resultados significativos para a eficiência na remoção de sulfato, DQO, produção de alcalinidade, crescimento das populações de BRS e influência na abundância dos gêneros dentro dos domínios *Bacteria* e *Archaea*. As principais conclusões, foram:

- Houve uma adaptação dos inóculos utilizados para remoção de sulfato, visto que nenhum deles tinha perfil sulfetogênico, e ao longo da operação os mesmos atingiram remoção de sulfato de no mínimo 60% (exceto o reator ETI2-I fase etanol);
- Exceto pelo reator ETI2-I (que perdeu muita biomassa devido ao cisalhamento das espumas), todos os reatores apresentaram alta produção de alcalinidade e consequentemente atingiram valores de pH de efluente que se enquadram nas normas ambientais de descarte nos corpos hídricos;
- A fonte do inóculo foi um fator que diferenciou o crescimento/decaimento das populações de BRS, uma vez que os reatores inoculados com lodo doméstico apresentaram declínio das populações de BRS enquanto que os reatores inoculados com lodos industriais apresentaram aumento das populações;
- Visto a dificuldade de encontrar lodos sulfetogênicos e a necessidade de grandes quantidades de biomassa necessária para inocular reatores em escala real, esse trabalho demonstrou que é possível obter sucesso na aclimação de um lodo com perfil metanogênico para a remoção de sulfato.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, 2012.

ANAWAR, H. M. Impact of climate change on acid mine drainage generation and contaminant transport in water ecosystems of semi-arid and arid mining areas. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, v. 58-60, p. 13–21, jan. 2013.

ATKINSON, T.; SHERWOOD, R. F. *Sulfate-Reducing Bacteria*. New York: Springer Science, 1995.

BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Biodegradation of an actual petroleum wastewater in a packed bed reactor by an immobilized biomass of *Bacillus cereus*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 5, p. 1696-1702, 2017.

BARNES, L. J.; SHERREN, J.; JANSSEN, F. J.; SCHEEREN, P. J. M.; VERSTEEGH, S. H.; KOCH, R. D. *Simultaneous microbial removal of sulfate and heavy metals from waste*. Europe Metal Conference, Non-ferrous metallurgy — present and future; 1991.

BARON, S. et al. *Bacillus*. *Barron's Medical Microbiology*. 1996.

BARTON, L.L.; HAMILTON, W.A. *Sulphate-reducing Bacteria, Environmental and Engineered Systems*. Published in the United State of America by Cambridge University Press, New York, 2007.

BELMONT, M.; XAVIER, C.; DECAP, J.; MARTINEZ, M.; SIERRA-ALVAREZ, R.; VIDAL, G. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 135, p. 256-263, 2006.

BOONE, D. R. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

BRIONES, A. M.; DAUGHERTY, B. J.; ANGENENT, L. T.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESON, M. E.; RASKIN, L. Microbial diversity and dynamics in multi- and single-compartment anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 93-106, 2007.

CAMARGO, S. A. R.; NOUR, E. A. A. Bamboo as an anaerobic medium: effect of filter column height. *Water Science and Technology*, p. 63–70, 2001.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, v. 7, p. 335-336, 2010.

CAPOROSO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J. FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J. FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A., SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. *Phylogeny of sulfate-reducing bacteria*. FEMS Microbiology Ecology, Oxford University Press (OUP), v. 31, n. 1, p. 1-9, 2000.

CHEN, J. P.; SENG, S.; HUNG, Y. *Soft drink waste treatment*. Chapter 7. 2006.  
CHENG, S. S.; HUANG, S. Y.; LAY, J. J.; TSAI, P. S.; CHO, L. T. Population dynamics of attached biofilm in anaerobic fluidized bed pilot plant. *Water Science Technology*, p. 503-510, 1992.

CHERNICHARO, C. A. d. L. *Reatores anaeróbios*. Belo Horizonte-MG: DESA, 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. *Resolução n° 357, de 17 de março de 2005*. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Alterado pela Resolução CONAMA 397/2008. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 14 maio 2018.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. *Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011*. Dispõe sobre as condições de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 9 p. Disponível em: <[http://www.legislacao.mutua.com.br/pdf/diversos\\_normativos/conama/2011\\_CONAMA\\_RES\\_430.pdf](http://www.legislacao.mutua.com.br/pdf/diversos_normativos/conama/2011_CONAMA_RES_430.pdf)>. Acesso em: 18 maio 2018.

COSTA, J. M.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. Removal sulfate and metals Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> from acid mine drainage in an anaerobic batch reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 5, v. 1985-1989, 2017.

CUNHA, M. P.; FERRAZ, R. M.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. 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. *Biodegradetaion*, 2018.

DANIEL, L. M. C. *Remoção de nitrogênio via nitrito em reator operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada e aeração intermitente*. 2005. Tese, (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 2005.

DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, J. Optimization of the operation of packed bed bioreactor to improve the sulfate and metal removal from acid mine drainage. *Journal of Environmental Management*, v. 200, p. 135-144, 2017.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, v. 26, p. 2460-2461, 2010.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, v. 10, p. 996-998, 2013.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)—Part I: structural and ecological aspects. *Water Science Technology*, 43, p. 1-8, 2001.

GANTZER, C. J. Inhibitory substrate utilization by steady-state biofilms. *Journal of Environmental Engineering*, v. 115, p. 302-319, 1989.

GODOI, L. A. G.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Down-flow fixed-structured bed reactor: na innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. *Journal of Environmental Management*, v. 197, p. 597-604, 2017.

HAMMACK, T. W.; EDENBORN, H. M.; DVORAK, D. H. Treatment of water from an open-pit copper mine using biogenic sulfide and lime stone: a feasibility study. *Water Research*, 1994.

HAO, T.; XIANG, P.; MACKEY, H. R.; CHI, K.; LU, H.; CHUI, H.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; CHEN, G. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Research*, Elsevier BV, v. 65, nov. 2014.

HASSETT, D. J.; CUPPOLETTI, J.; TRAPNELL, B.; LYMAR, S. V.; ROWE, J. J.; YOON, S. S.; HILLIARD, G. M.; PARVATIYAR, K.; KAMANI, M. C.; WOZNIAK, D. J.; HWANG, S.; MCDERMOTT, T. R.; OCHSNER, U. A. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 1425-1443, 2002.

HILTON, B. L.; OLESZKIEWICZ, J. A. *Effects of sulfide toxicity to the anaerobic treatment process*. Proceeding... 42nd Purdue Univ. Industrial Waste Confer., Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, pp. 739-48, 1987.

- HIRASAWA, J. S. Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de biologia molecular. Tese (doutorado – Hidráulica e Saneamento), Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 2007.
- HU, Y.; JING, Z.; SUDO, Y.; NIU, Q.; DU, J.; WU, J.; LI, Y. Effect of influent COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. *Chemosphere*, v. 130, p. 24–33. 2015.
- ISA, Z.; GRUSENMEYER, S.; VERSTRAETE, W. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: microbiological aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 51, n. 3, p. 580–587, 1986.
- KAKSONEN, A. H. et al. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford University Press (OUP), v. 47, n. 3, p. 279–289, mar. 2004.
- KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Engineering in Life Sciences*, Wiley Plus, v. 7, n. 6, p. 541-564, 2007.
- KALYUZHNYI, S.; FRAGOSO, C. D. L.; MARTINEZ, J. R. Biological sulfate reduction in a uasb reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiology-AIBS-C/C of Mikrobiologia*, Plenum Publishing Corporation, v. 66, p. 562–567, 1997.
- KETTUNEN, R. H.; RINTALA, J. A. The effect of low temperature (5-29°C) and adaptation on the methanogenic activity of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, 4, p. 570-576, 1997.
- LENS, P. et al. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Taylor & Francis, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.
- LEWIS, A. E. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, v. 104, p. 222-234, 2010.
- LIU, P.; POMMERENKE, B.; CONRAD, R. Identification of Syntrophobacteraceae as major acetate-degrading sulfate reducing bacteria in Italian paddy soil. *Environ Microbiol*, v. 20, n.1, p. 337-354, 2017.
- LIU, W. T.; CHAN, O. C.; FANG, H. H. P. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research*, v. 36, p. 1767-1775, 2002.

LOVLEY, D. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. v. 2. p. 653-658, 2006.

LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. *Statistical ecology*. New York: John Wiley, 1988.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 10 ed. New York: Pearson Education, 2003.

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

MCINERNEY M. J.; STAMS, A. J. M.; BOONE, D. R. Genus I. Syntrophobacter. 2005. In: BOONE, D. R. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v. 2. New York: Springer, p. 1021-1027. 2005.

MOCKAITIS, G.; FRIEDL, G. F.; RODRIGUES, J. A.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Influence of feed time and sulfate load on the organic and sulfate removal in an ASBR. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6642-6650, 2010.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, jun. 2008.

NAGPAL, S.; CHUICHULCHERM, S.; PEEVA, L.; LIVINGSTON, A. Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000.

NETO, E. S. C. *Redução de sulfato e remoção de metais provenientes de drenagem ácida de minas*. 2015. Dissertação. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Alfnas, campus Poços de Caldas. 2015.

OKABE, S.; CHARACKLIS, W. G. Effects of temperature and phosphorous concentration on microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology Bioengineering*, 1992.

OMIL, F.; LENS, P.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Long-term competition between sulfate reducing bacteria and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 57, n. 6, 1997.

- PIELOU, E. C. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *Journal of Theoretical Biology*, v. 10, 2, p. 370-383, 1966.
- POSTGATE, J. R. *The Sulfate-Reducing Bacteria*. 2nd. ed. Cambridge: University Press, 1984.
- QUAST, C.; KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; HORN, M.; GLOCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, v. 41, 2013.
- RIBEIRO, M. I. V. O. *Estudo do efeito do TDH, relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e concentração inicial de ferro no tratamento de drenagem ácida de minas em reator UASB utilizando soro de leite como fonte de carbono*. 2017. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) — Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2017.
- RIBEIRO, R.; VARESCHE, M. B. A.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Influence of the carbono source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices. *Journal of Environmental Management*, p. 187-194, 2005.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J.C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digester of High-Strength Wastes. *Journal Water pollution, Control Federation*, v. 58, n.5, p. 406-411, 1986.
- RODRIGUEZ, R. P.; VICH, D. V.; GARCIA, M. L.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. Application of horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor for bioremediation of acid mine drainage. *Journal of Water and Health*, v. 14.3, p. 399-410, 2016.
- 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.
- SAMPAIO, G. F. *Tratamento de água residuária ácida proveniente de mina utilizando soro de leite como doador de elétrons*. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG, Poços de Caldas, 2015.
- SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier BV, v. 269, p. 98–109, mar 2014.
- SANTOS, A. M. Efeitos da relação DQO/Sulfato e dos doadores de elétrons na riqueza microbiana de reatores utilizados no tratamento de águas residuárias

ricas em sulfato. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG, Poços de Caldas, 2016.

SARTI, A.; POZZI, E.; CHINALIA, F. A.; ONO, A.; FORESTI, E. Microbial processes and bacterial populations associated to anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 164–170, 2010.

SARTI, A; ZAIAT, M. Anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater in an anaerobic sequential batch reactor (AnSBR) using butanol as the carbon source. *Journal of Environmental Management*, v. 92, 6, p. 1537-1541, 2011.

SILVA, A. J.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 927-935, 2002.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. *Nature*, v. 168, n. 688, 1949.

SLOBODKIN, A. The Family Peptostreptococcaceae. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (ed.). *The Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2014.

SPEECE, R. E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Tennessee: Archae Press. 1996.

STEFANIE, J.W.H.; ELFERINK, O.; VISSER, A.; POL, L. W. H.; STARES, A. J. M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 15, p. 119-136, 1994.

STEFFEN; ROBERTSON; KIRSTEN. Water and wastewater management in the poultry industry. *Natsurv* 9, project n. 145, 1989.

STUCKI, G; HANSELMANN, K; HURZELER, W. Biological sulfuric acid transformation: reactor design and process optimization. *Biotechnol. Bioeng*, v. 41, p. 303–15, 1993.

TONG, Z.; SHAO, M. F.; YE, L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, v. 6, p. 1137-1147, 2012.

VANDEVIVERE, P.; KIRCHMAN, D. L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 3280–3286, 1993.

VAN HOUTEN, R. T.; HULSHOFF L. W.; LETTINGA G. Biological sulphate reduction using gas-lift reactors fed with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, p. 586–94, 1994.

VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; VAZOLLER, R. F.; FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 48, p. 534–538, 1997.

VERRIER, D.; MORTIER, B.; ALBAGNAE, G. Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnology*, v. 10, p. 735–740, 1987.

VIEIRA, B. F.; COUTO, P. T.; SANCINETTI, G. P.; KLEIN, B.; van ZYL, D.; RODRIGUEZ, R. P. The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic process in anaerobic reactor. *Journal of Environmental Science and Health*, part A, v. 0, 2016.

VISSER, A.; BEEKSMA, I.; van der ZEE, F; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentration. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1993.

WALTERS, W.; HYDE, E. R.; BERG-LYONS, D.; ACKERMANN, G.; HUMPHREY, G.; PARADA, A.; GILBERT, J. A.; JANSSON, J. K.; CAPORASO, J. G.; FUHRMAN, J. A.; APPRILL, A.; KNIGHT, R. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *American Society for Microbiology*, 2016.

WANG, X.; HU, M.; XIA, Y.; WEN, X.; DING, K. Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012.

WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder A, editor. *Biology of anaerobic microorganisms*, Wiley, 1988.

ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Para Tratamento de Águas Residuárias: Concepção e Avaliação Preliminar de Desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v. 11, n. 2, p. 33-42, 1994.

ZHANG, M.; WANG, H. Simultaneous removal of copper, zinc and sulfate from coal mine waste in a laboratory SRB bioreactor using lactate and ethanol as carbon sources. *Mine Water Environmental*, v. 32, p. 314-320, 2013.

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

ZHANG, M.; WANG, H.; HAN, X. Preparation of metal-resistant immobilized sulfate reducing bacteria beads for acid mine drainage treatment. *Chemosphere*, Elsevier, v. 154, p. 215–223, 2016.