

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**CAMPUS POÇOS DE CALDAS**

**GABRIEL DE FREITAS COSTA**

**EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO E FERRO, DO DOADOR DE  
ELÉTRONS E DA RAZÃO DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA  
DE MINA EM REATORES OPERADOS EM BATELADA**

**POÇOS DE CALDAS/MG**  
**2022**

GABRIEL DE FREITAS COSTA

EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO E FERRO, DO DOADOR DE ELÉTRONS E DA  
RAZÃO DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA EM REATORES  
OPERADOS EM BATELADA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pelo Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas. Linha de pesquisa: Tratamento de Efluentes.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Juliana Kawanishi Braga.

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Costa, Gabriel de Freitas.

Efeito das concentrações de sulfato e ferro, do doador de elétrons e da razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> no tratamento de drenagem ácida de mina em reatores operados em batelada / Gabriel de Freitas Costa. - Poços de Caldas, MG, 2022.

55 f. : il. -

Orientador(a): Juliana Kawanishi Braga.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -  
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Bactérias redutoras de sulfato. 2. Esgoto doméstico. 3. Soro de leite.  
4. Remoção de sulfato. 5. Tratamento de efluentes. I. Braga, Juliana  
Kawanishi, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

GABRIEL DE FREITAS COSTA

**EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO E FERRO, DO DOADOR DE ELÉTRONS  
EDA RAZÃO DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA EM  
REATORES OPERADOS EM BATELADA**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.

Aprovada em: 28 de janeiro de 2022

Dra. Juliana Kawanishi Braga

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Josiel Martins

Instituição: Universidade Federal de Lavras



Documento assinado eletronicamente por **Josiel Martins Costa, Usuário Externo**, em 01/02/2022, às 13:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Kawanishi Braga, Usuário Externo**, em 01/02/2022, às 14:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Piacentini Rodriguez, Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2022, às 09:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0669505** e o código CRC **DEF5A44C**.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por me dar forças, coragem, saúde, capacidade e estar presente comigo durante toda essa trajetória.

À Universidade Federal de Alfenas, em especial o Instituto de Ciência e Tecnologia, pela oportunidade de realizar este curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço minha orientadora Dra. Juliana Kawanishi Braga por todo suporte, paciência, ensinamentos e companheirismo para seguir junto comigo nessa etapa sempre buscando os melhores resultados.

Agradeço, por último, aos meus pais, Arnaldo e Cidinha, meus grandes exemplos de vida, que nunca mediram esforços para me proporcionar tudo o que tenho hoje.

## RESUMO

A alta acidez apresentada pela drenagem ácida de mina (DAM) pode promover a dissolução de metais resultando em consequências e impactos negativos para a saúde e o meio ambiente. Tratamentos biotecnológicos envolvendo a redução do sulfato apresentam vantagens em relação a tratamentos físico-químicos tradicionais, como a remoção e a possibilidade de recuperação dos metais presentes nesse resíduo, menores custos de disposição do lodo gerado e geração de alcalinidade para o aumento de pH desses efluentes. A redução biológica do sulfato, realizada pelas bactérias redutoras de sulfato com adição de fontes exógenas de carbono, ocupa lugar de destaque entre as alternativas, por combinar o aumento de pH com a remoção de sulfato e metais e gerar boa eficiência e viabilidade econômica para o tratamento. No presente estudo, buscou-se otimizar a eficiência na remoção de sulfato presente em DAM sintética utilizando reatores anaeróbios em batelada durante 6 fases em que foram testadas diferentes fontes de carbono, concentrações de sulfato e ferro, além de diferentes razões de demanda química de oxigênio (DQO)/  $\text{SO}_4^{2-}$  e o aumento de volume do reator. Em cada uma das fases foram analisadas concentrações de DQO, sulfato, pH inicial e final, alcalinidade, concentração de sulfeto e ferro, além de sólidos totais, fixos e voláteis do lodo. A melhor condição empregada em cada fase era mantida para a fase seguinte e novas condições eram testadas a fim de, ao final de 5 fases, se obter a melhor configuração de reator. Ao final das 5 primeiras fases, em que foram utilizados reatores com volume útil de 500mL, foi montado um reator de maior volume, com 2,5L. A condição que continha soro de leite, 1500mg/L de sulfato, 100mg/L de ferro e DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  igual a 1 obteve as melhores eficiências de remoções, variando entre 59% a 81% para remoção de sulfato e 77% a 96% para a remoção de DQO, além de pH final variando entre 6,6 a 6,7. Porém, no reator de maior volume, a falta de agitação prejudicou o desempenho e as remoções foram menores, alcançando 42% e 77% de eficiência de remoção de sulfato e DQO, respectivamente. Além disso, os resultados deste estudo evidenciaram uma alta robustez do inóculo empregado, uma vez que, mesmo submetido à diferentes tratamentos, não se observou impacto nas eficiências de remoção.

Palavras-chave: bactérias redutoras de sulfato; esgoto doméstico; soro de leite; borra de café; tratamento de efluentes; remoção de sulfato.

## ABSTRACT

The high acidity presented by acid mine drainage (AMD) can promote the dissolution of metals resulting in negative consequences and impacts on health and the environment. Biotechnological treatments involving sulphate reduction have advantages over traditional physicochemical treatments, such as the removal and the possibility of recovering the metals present in this residue, lower costs of disposal of the generated sludge and generation of alkalinity to increase the pH of these effluents. Biological reduction of sulfate, carried out by sulfate-reducing bacteria with the addition of exogenous carbon sources, occupies a prominent place among the alternatives, as it combines the increase in pH with the removal of sulfate and metals and generates good efficiency and viability cost-effective for treatment. This study, we sought to optimize the efficiency of sulfate removal present in synthetic DAM using anaerobic batch reactors during 6 phases in which different carbon sources, sulfate and iron concentrations were tested, in addition to different chemical oxygen demand (COD)/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios. and increasing the scale of the reactor. In each of the phases, concentrations of COD, sulphate, initial and final pH, alkalinity, sulphide and iron concentration were analyzed, and total, fixed and volatile sludge solids. The best condition used in each phase was kept for the next phase and new conditions were tested in order to obtain, at the end of 5 phases, the best reactor configuration. At the end of the first 5 phases, in which reactors with a useful volume of 500mL were used, a reactor with a larger volume of 2.5L was set up. The condition containing whey, 1500mg/L of sulfate, 100mg/L of iron and COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> equal to 1 had the best removal efficiencies, ranging from 59% to 81% for sulfate removal and 77% to 96 % for COD removal, in addition to a final pH ranging from 6.6 to 6.7. However, in the larger volume reactor, the lack of agitation affected the performance and the removal was lower, reaching 42% and 77% of sulfate and COD removal efficiency, respectively. Furthermore, the results of this study showed high robustness of the inoculum used, since, even submitted to different treatments, there was no impact on removal efficiencies

Keywords: sulfate-reducing bacteria; domestic sewage; whey; spent ground coffee; wastewater treatment; sulfate removal.

## LISTA DE FIGURAS

|             |                                                                                                                                            |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -  | Vias de Transformação do Enxofre.....                                                                                                      | 15 |
| Figura 2 -  | Etapas da degradação da matéria orgânica em águas residuárias ricas em sulfato.....                                                        | 18 |
| Figura 3 -  | Etapas para redução do sulfato em sulfeto.....                                                                                             | 19 |
| Figura 4 -  | Solubilidade de sulfetos metálicos de acordo com o pH do meio.....                                                                         | 20 |
| Figura 5 -  | Solubilidade de hidróxidos metálicos de acordo com o pH do meio.....                                                                       | 21 |
| Figura 6 -  | Espécies de sulfeto de acordo com o pH apresentado no meio.....                                                                            | 22 |
| Figura 7 -  | Divisão das fases do projeto.....                                                                                                          | 32 |
| Figura 8 -  | Gráficos de Variação de Concentração de DQO.....                                                                                           | 36 |
| Figura 9 -  | Gráficos de Variação de Concentração de Sulfato.....                                                                                       | 37 |
| Figura 10 - | Contribuição da sulfetogênese na remoção de DQO.....                                                                                       | 40 |
| Figura 11 - | Perfil Temporal de remoção de sulfato de cada fase estudada.....                                                                           | 42 |
| Figura 12 - | Porcentagens de sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) e o hidrogenossulfeto (HS <sup>-</sup> ) nos efluentes de cada fase estudada..... | 44 |
| Figura 13 - | Resultado das análises de sólidos totais, sólidos fixos e sólidos voláteis.....                                                            | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Composição da DAM em cada fase .....                                   | 31 |
| Tabela 2 - Resultados das análises realizadas em todas as fases operacionais..... | 35 |
| Tabela 3 - Resultados Teste Tukey para DQO e Sulfato .....                        | 38 |
| Tabela 4 - Carga de DQO e Sulfato removidas em cada fase.....                     | 41 |
| Tabela 5 - Parâmetros Cinéticos de cada fase.....                                 | 43 |

## SUMÁRIO

|          |                                                                     |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                              | <b>9</b>  |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                               | <b>11</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral.....                                                 | 11        |
| 2.2      | Objetivos Específicos.....                                          | 11        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                   | <b>12</b> |
| 3.1      | Drenagem ácida de mina (DAM).....                                   | 12        |
| 3.2      | Ciclo do Enxofre.....                                               | 14        |
| 3.3      | Bactérias redutoras de sulfato (BRS).....                           | 16        |
| 3.4      | Redução Biológica do sulfato.....                                   | 18        |
| 3.5      | Doadores de elétrons.....                                           | 24        |
| 3.6      | Configurações de reatores para a redução biológica de sulfato ..... | 24        |
| <b>4</b> | <b>ARTIGO.....</b>                                                  | <b>28</b> |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                              | <b>48</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                             | <b>50</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A mineração é um dos setores básicos da economia do país, contribuindo para a melhoria de vida da população e para o desenvolvimento da sociedade, desenvolvendo o setor econômico, tecnológico, de infraestrutura e bem estar. Porém, o processo de mineração está associado com problemas relacionados à drenagem ácida que pode causar danos para a biodiversidade local e para a saúde pública (JOHNSON; HALLBERG, 2005).

A drenagem ácida de mina (DAM) é produzida quando um material contendo sulfeto é exposto ao oxigênio e a água. A oxidação dos sulfetos possibilita a formação de ácido sulfúrico, aumentando a acidez do meio e favorecendo a solubilização de metais presentes nas rochas, gerando, então, a DAM. Existem algumas formas de se tratar esse resíduo como a utilização de meios tradicionais e biotecnológicos. (MELLO *et al.*, 2014).

Em relação aos tratamentos tradicionais, processos químicos envolvem a adição de agentes alcalinos para promover a precipitação de metais como hidróxidos, carbonatos ou sulfetos (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009).

Já os tratamentos biotecnológicos através da utilização das bactérias redutoras de sulfato (BRS) tem sido considerados uma alternativa promissora em relação aos tratamentos tradicionais, possuindo vantagens como a possibilidade de recuperação dos metais, menores custos de disposição do lodo gerado e produção de alcalinidade (DEV *et al.*, 2015; GUO; KANG; FENG, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2016).

Caracterizadas por apresentarem respiração anaeróbia, as BRS usam o sulfato como aceptor final de elétrons para a degradação de compostos, resultando na produção de sulfeto que atua como agente precipitador de metais que podem, ser separados da fase líquida e submetidos a processos físico-químicos para recuperação posterior (KEFENI *et al.*, 2015).

Geralmente, a drenagem ácida de mina é deficiente de doadores de elétrons e, por isso, é necessária uma adição dessa fonte para que o sulfato seja reduzido de maneira satisfatória, alcançando alta performance, boa eficiência e viabilidade econômica para o tratamento. A escolha é feita baseada analisando a biodegradabilidade da fonte doadora de elétrons e o custo por unidade de sulfato convertido em sulfeto. As BRS podem usar compostos orgânicos simples como ácidos carboxílicos como fonte de carbono e energia. Além disso, o lactato é bastante utilizado, mas em larga escala, apresenta alto custo. Uma alternativa é o etanol, que é uma fonte de menor custo (COSTA *et al.*, 2009).

Além dessas fontes mais utilizadas, pode-se fazer uso de compostos orgânicos mais complexos como lodo de esgoto, esterco animal, madeira, serragem, soro de leite e outros

resíduos, como a borra de café, por exemplo, que são resíduos de algum processo ou compostos que não possuem valor econômico alto (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007).

Um dos métodos de remediação da DAM se dá através da utilização de reatores anaeróbios sulfetogênicos, que pode ser vantajoso, gerando redução das concentrações de sulfato iniciais, controle da performance do reator e a possibilidade de recuperação dos metais precipitados (JOHNSON; HALLBERG, 2005).

Diante do grande volume gerado de DAM na região, há necessidade de se buscar tratamento ambiental e economicamente viáveis para esse resíduo. Desta forma, este trabalho visou empregar um reator anaeróbio operado em batelada sem agitação para o tratamento da DAM sintética, analisando diferentes fontes de carbono, concentrações iniciais de sulfato e de ferro e razões de demanda química de oxigênio (DQO)/sulfato, buscando assim, elevada eficiência para promover a remoção de sulfato e matéria orgânica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho de reator anaeróbio operado em batelada no tratamento de DAM sintética.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a eficiência de remoção de sulfato e matéria orgânica presente na DAM empregando esgoto doméstico, soro de leite e borra de café como fontes de energia;
- b) Avaliar a influência da carga orgânica na eficiência do reator;
- c) Avaliar a eficiência de remoção de sulfato e matéria orgânica em diferentes concentrações iniciais de sulfato e ferro presentes na DAM;
- d) Avaliar robustez do lodo ao submetê-lo a diferentes condições operacionais (substrato, concentrações de sulfato, DQO, ferro e razões DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Drenagem ácida de mina (DAM)

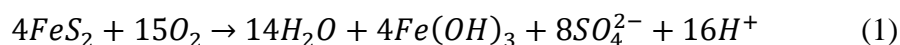
A DAM pode ser definida como a solução ácida gerada quando minerais contendo sulfeto presentes em resíduos de mineração são oxidados na presença de água e oxigênio. A DAM pode ocorrer onde o mineral ou metal de interesse encontram-se, associado a sulfetos. É considerada um dos problemas ambientais mais sérios devido aos efeitos que pode causar em copos d'água que podem durar séculos (BORMA; SOARES, 2002; KEFENI *et al.*, 2015; SKOUSEN *et al.*, 2017).

Os metais podem se acumular em toda a cadeia alimentar, sendo assim, um risco potencial à saúde humana e à distúrbios ecológicos. Efeitos graves incluem câncer, danos aos órgãos, danos ao sistema nervoso e, em casos extremos, morte. A exposição a alguns metais, como mercúrio e chumbo, também pode causar desenvolvimento de doenças autoimunes, em que o sistema imunológico de uma pessoa ataca suas próprias células, podendo levar a doenças nas articulações, nos rins, sistema circulatório e sistema nervoso (MUCHIE; AKPOR, 2010).

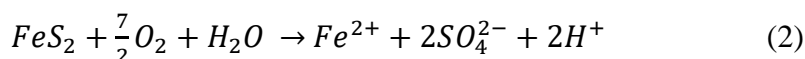
Nas plantas, os metais presentes na DAM como o cádmio, cobre, cromo, mercúrio e zinco, em alta quantidade, podem gerar efeitos na germinação de sementes, no crescimento e inibição da fotossíntese (GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 2005).

O perigo de poluentes como metais na água está em dois aspectos de seu impacto. Em primeiro lugar, os metais têm a capacidade de persistir nos ecossistemas naturais por um período prolongado. Em segundo, eles têm a capacidade de se acumular em níveis sucessivos da cadeia biológica, causando doenças agudas e crônicas (MUCHIE; AKPOR, 2010).

A DAM ocorre quando a piritita ou outros materiais sulfetados são expostos à água e ao ar. O oxigênio atmosférico rapidamente oxida esse mineral liberando grandes quantidades de ácido sulfúrico e ferro (III) que precipita como hidróxido de ferro. A Equação 1 exemplifica a formação da DAM a partir da ação do oxigênio e água no mineral piritita ( $FeS_2$ ), que é um dos mais comuns minerais que contém sulfeto (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009).

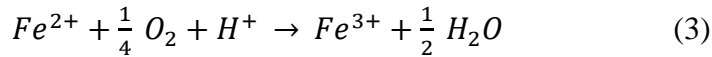


A primeira reação é a oxidação do mineral em ferro dissolvido, sulfato e hidrogênio (Eq. 2):



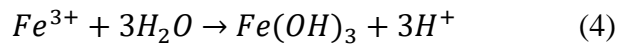
A velocidade de reação apresentada na Equação 2, depende da superfície do mineral exposta ao oxigênio, além da concentração de oxigênio no meio e da temperatura.

O  $Fe^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $H^+$  representam um aumento no total de sólidos dissolvidos e não neutralizados, e provocam uma queda no pH. Se o ambiente for suficientemente oxidável, dependendo da concentração de  $O_2$ , do pH e da atividade bacteriana o  $Fe^{2+}$  é oxidado para  $Fe^{3+}$  como descrito na Equação 3.



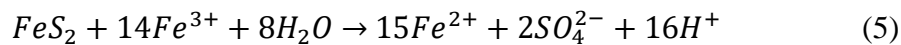
Essa etapa de oxidação do  $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$  é a etapa limitante do processo. Sob condições naturais, a meia vida do  $Fe^{2+}$ , ou seja, o tempo para que metade da quantidade de  $Fe^{2+}$  presente no meio seja reduzida para  $Fe^{3+}$ , é da ordem de 1000 dias. Entretanto, essa etapa é acelerada quando o processo ocorre em condições de pH entre 2,8 e 3,2 (LADEIRA *et al.*, 2014).

Com o pH próximo entre 2,3 e 3,5,  $Fe^{3+}$  se precipita em  $Fe(OH)_3$ , segundo a Equação 4.



Em valores de pH próximos a 2,3, a hidrólise apresentada na Equação 4 praticamente não ocorre. (LADEIRA *et al.*, 2014).

Assim, o  $Fe^{3+}$  que não for precipitado pode ser utilizado para oxidar a pirita (Eq. 5).



Embora os bissulfetos de ferro sejam encontrados predominantemente associados com a exploração de carvão, níquel, chumbo, zinco, cobre, urânio, ouro e prata, a DAM também pode ser encontrada em obras de engenharia como construção de estradas, túneis e barragens, que exijam alta movimentação ou escavação de terra e rochas contendo minerais sulfetados. (MELLO *et al.*, 2014)

Tendo em vista os danos causados pela drenagem ácida de mina tanto para a fauna, quanto para a flora de onde ela está disposta, é necessário criar alternativas de tratamento, tecnologias e processos que sejam viáveis, para que os impactos sejam minimizados e o ecossistema não seja tão afetado.

O tratamento biológico de DAM pode ser de natureza ativa ou passiva. Os tratamentos passivos são processos biológicos, geoquímicos ou físicos que ocorrem de maneira natural. Os processos biológicos são aqueles que usam a atividade bacteriana a seu favor, gerando

alcalinidade e remoção de metais via redução do sulfato no meio, na presença de matéria orgânica (SKOUSEN *et al.*, 2017).

Os tratamentos passivos superficiais consistem de leitos de infiltração e lagoas anóxicas. Já para águas subterrâneas, podem ser utilizadas as estratégias de injeção de substrato ou barreiras permeáveis reativas. O objetivo desse tratamento é o enriquecimento da atividade dos microrganismos redutores de sulfato *in situ* (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

O tratamento passivo possui como vantagens, o baixo custo de operação e manutenção, porém a dificuldade de controle do processo devido às variações ambientais e sazonais, além da necessidade de se ter grandes áreas destinadas a esse tipo de tratamento e a dificuldade de recuperação dos metais do meio não favorecem a utilização desse tipo de tratamento (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

Os tratamentos de origem ativa consistem na utilização de biorreatores, que são compactos e ocupam menores áreas quando comparado com as áreas necessárias para realizar o tratamento passivo. A redução de sulfato através de processo biológico ativo traz como vantagens o fato de os sulfetos metálicos apresentarem melhores propriedades de precipitação, rápidas taxas de reação, menor solubilidade do precipitado e maior potencial de reaproveitamento de metais sulfetados posteriores (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007; LEWIS, 2010; SKOUSEN *et al.*, 2017).

### 3.2 Ciclo do Enxofre

O enxofre é um elemento químico essencial da vida e em estados de oxidação que variam de -2 a +6, ele alimenta o metabolismo de inúmeros organismos procarióticos diferentes, alguns dos quais evoluíram no início da história da vida na Terra. Os ciclos bioquímicos do enxofre possuem grande papel regulando as condições de superfície da Terra através da atividade de vários processos metabólicos microbiológicos, como a oxidação e redução de sulfato (FIKE *et al.*, 2015).

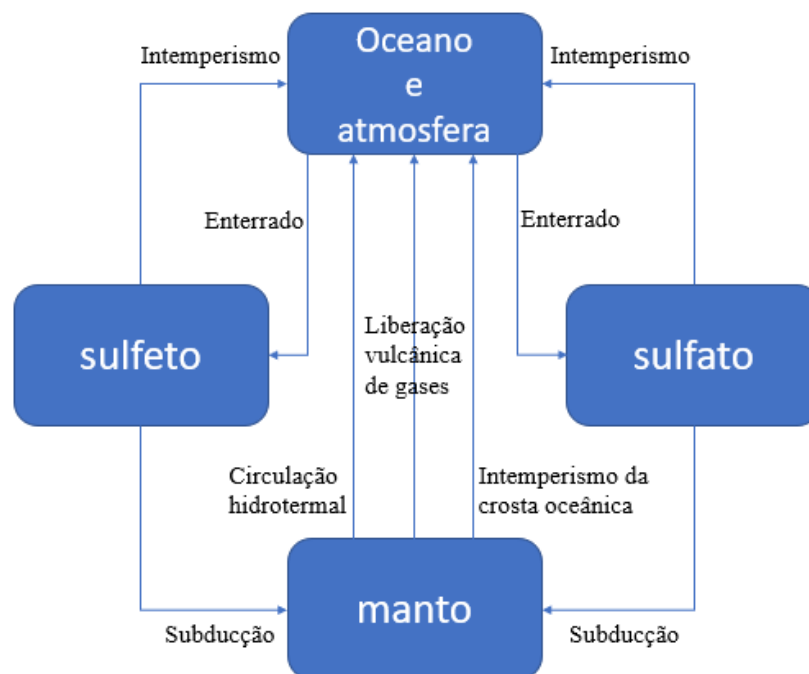
A disponibilidade de enxofre para os organismos e a magnitude do ciclo de oxidação e redução do enxofre dependerão da quantidade de enxofre disponível na superfície da Terra e de seu estado de oxidação. Isso, por sua vez, deve depender do equilíbrio dos processos de troca de enxofre entre a superfície da Terra e o manto (CANFIELD, 2004).

Tratando do ciclo do enxofre, o oceano e a atmosfera são os canais pelos quais o elemento transita. O reservatório de sulfeto inclui todos os sulfetos sedimentares depositados,

enquanto o reservatório de sulfato inclui sulfato de água do mar e os evaporitos de sulfato (que são rochas sedimentares). Tanto o sulfato quanto o sulfeto são soterrados nos reservatórios do oceano, que são posteriormente expostos ao intemperismo químico, alterando os minerais que compõe as rochas e retornando o enxofre de volta para os oceanos como sulfato. Os reservatórios superficiais de enxofre estão ligados ao manto de onde o enxofre escapa por liberação vulcânica, circulação hidrotérmica através dos centros de propagação do oceano, e o desgaste oxidativo da crosta oceânica. Os sulfetos também são formados e fixados dentro da crosta oceânica durante a circulação hidrotérmica de alta temperatura onde o sulfato é reduzido a sulfeto de maneira inorgânica (CANFIELD, 2004).

Todas essas vias de transformação de enxofre estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Vias de Transformação do Enxofre



FONTE: Adaptado de Canfield (2004).

Os microrganismos desempenham papel importante nas transformações que ocorrem com o enxofre. O sulfato pode ser reduzido a sulfeto, quando utilizado como nutriente. As reações de oxidação e redução para a geração de energia envolvem oxidação de sulfeto por bactérias quimiolitotróficas e redução dissimilativa por bactérias redutoras de sulfato (RODRIGUEZ; ZAIAT, 2011).

### 3.3 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

As BRS pertencem ao grupo de procariontes e possuem um papel importante nas transformações que acontecem com o enxofre e outras funções importantes em uma gama de processos, como na ciclagem de matéria orgânica, na biodegradação de poluentes clorados aromáticos, em solos anaeróbios e na metilação de mercúrio. O sulfato, foco do presente trabalho, por exemplo, é absorvido como um nutriente e reduzido a sulfeto, que é incorporado em aminoácidos e enzimas que contêm enxofre e essa reação acontece pela ação das BRS, bem como as arqueias redutoras de sulfato (ARS) (LIU *et al.*, 2014).

As BRS podem utilizar também outros aceptores para crescimento e redução do sulfeto, como tiosulfato e sulfito e podem reduzir nitrito e nitrato à amônia. Outros compostos que podem ser utilizados como aceptores de elétrons para algumas BRS são ferro (Fe (III)), urânio (U (VI)), selenato (Se (VI)) e cromato (Cr (VI)), por exemplo, além de compostos orgânicos como o fumarato, dimetilsulfóxido e sulfonatos (MUYZER; STAMS, 2008).

As BRS são versáteis também no que se diz respeito as diferentes condições ambientais em que elas se encontram. Elas já foram detectadas em sedimentos anóxicos, fontes hidrotermais, hipersalinas, regiões vulcânicas, entre outros (DEV *et al.*, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016; RABUS *et al.*, 2015).

Algumas espécies de BRS estão presentes em consórcios com outros microrganismos, como as arqueias metanogênicas (STADNITSKAIA *et al.*, 2005; WEBSTER *et al.*, 2006).

O tratamento da DAM utilizando bactérias redutoras de sulfato consiste na redução do sulfato a sulfeto em condições anaeróbias, com o auxílio de compostos orgânicos que funcionam como doadores de elétrons (LIAMLEAM; ANNACHHATRE 2007).

Pode-se dividir as BRS em dois distintos tipos em relação à oxidação de compostos orgânicos: completa e incompleta. As que realizam a oxidação completa da matéria orgânica, geram, ao final, o CO<sub>2</sub> como produto, enquanto que as que realizam oxidação incompleta, tem como produto final o acetato (HAO *et al.*, 2014).

Normalmente, as BRS que fazem a oxidação completa e incompleta competem entre si pelos substratos disponíveis e as que realizam a oxidação de forma incompleta se tornam dominantes, gerando acúmulo de acetato e podendo prejudicar o descarte do efluente tratado devido ao excesso de matéria orgânica (HAO *et al.*, 2014).

Em relação às características fisiológicas, as BRS podem ser divididas em quatro principais subgrupos, de acordo com Holt, 1994:

- No subgrupo 1, as BRS gram-positivas formadoras de esporos, do gênero *Desulfotomaculum*, que são capazes de resistir à altas temperaturas e à falta de água, devido a formação de endósporos. Elas são estritamente anaeróbias e autotróficas ou heterotróficas. Utilizam o hidrogênio como fonte de energia e o acetato como doador de elétrons e podem também utilizar o sulfato, tiosulfato e sulfito como aceptores finais de elétrons.
- O subgrupo 2 é constituído pelas BRS não formadoras de endósporos e oxidadoras incompletas do substrato até a formação do acetato. Podem utilizar o enxofre elementar, sulfato, sulfito e até o tiosulfato como aceptores finais de elétrons. São bactérias dos gêneros *Desulfobubus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio* e *Thermodesulfobacterium*.
- Em relação ao subgrupo 3, as BRS também, assim como do subgrupo 2, não são formadoras de endósporos, mas essas realizam oxidação completa dos compostos orgânicos até a formação de CO<sub>2</sub>. Reduzem sulfato, sulfito e tiosulfato a sulfeto. São dos gêneros *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* e arqueas do gênero *Archaeoglobus*.
- No último subgrupo, o subgrupo 4, estão presentes as bactérias capazes apenas de reduzir o enxofre elementar a sulfeto. São bactérias dos gêneros *Desulfurella* e *Desulfuromonas*, que são estritamente anaeróbios encontrados em fontes geotermiais ou habitando sedimentos marinhos.

As BRS, como visto, se caracterizam pela diversidade de espécies e de condições ambientais e nutricionais. Além de terem a capacidade de utilizar vários doadores de elétrons e diferentes aceptores de elétrons, elas são capazes de sobreviver na ausência de compostos oxidados de enxofre, graças à sua versatilidade metabólica (LENS *et al.*, 1998).

Por esses motivos, as bactérias redutoras de sulfato são encontradas em diversos habitats, com condições extremas de temperatura, pH, oxigênio e umidade (MUYZER; STAMS, 2008).

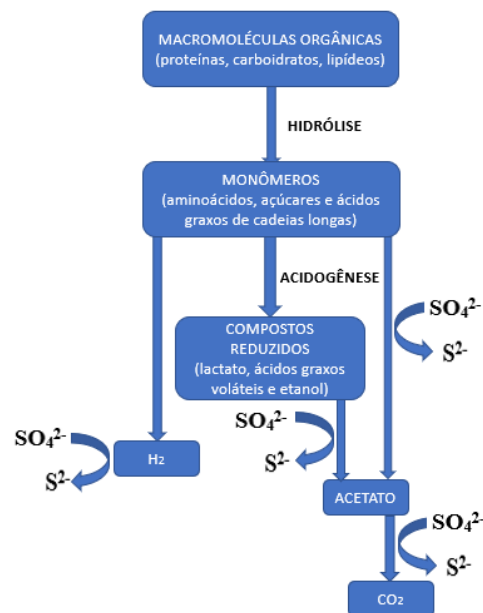
Desse modo, o interesse nos estudos da BRS para o tratamento de águas residuárias é facilmente compreensível e os trabalhos já realizados demonstram a importância desses microrganismos para a área de tratamento de efluentes.

### 3.4 Redução Biológica do Sulfato

O processo de redução do sulfato engloba a utilização de várias enzimas que iniciam oxidando o doador de elétrons e liberando prótons e elétrons no meio. Depois esses compostos são enviados para uma hidrogenase citoplasmática, onde é gerado o  $H_2$ . Esse hidrogênio molecular se difunde pelo periplasma e é reoxidado liberando elétrons que são enviados pelo citocromo e, em seguida, enviados ao receptor de elétrons através de uma cadeia transportadora de elétrons. No periplasma, são formados íons  $H^+$ , que são os responsáveis pela produção de ATP e pela ativação das enzimas que atuam na redução de sulfato intracelular (SANTOS *et al.*, 2021).

A Figura 2 mostra as rotas metabólicas de degradação de moléculas orgânicas complexas quando o sulfato está presente como receptor de elétrons.

Figura 2 - Etapas da degradação da matéria orgânica em águas residuárias ricas em sulfato



FONTE: Adaptado de Muyzer e Stams (2008)

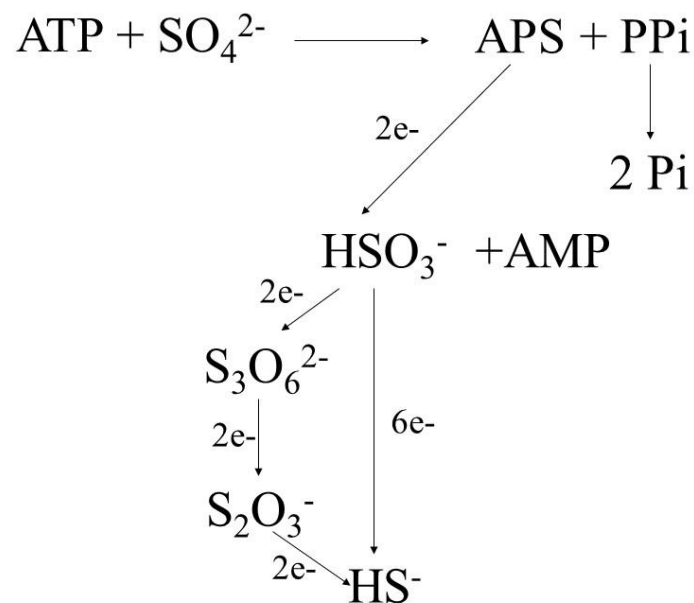
No processo de redução do sulfato, o íon  $SO_4^{2-}$  atua como agente oxidante para a dissimilação da matéria orgânica. Porém, apenas uma parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, sendo que a maior parte resulta na formação de sulfeto (MUYZER; STAMS, 2008).

Do ponto de vista químico, a utilização do sulfato como receptor de elétrons é desfavorável, uma vez que o potencial redox do par sulfato-sulfito é muito negativo para permitir a redução pelo NADH, em que o potencial redox é de -314mV. O potencial redox do par sulfato-sulfito é -516mV (MUYZER; STAMS, 2008).

Por esse motivo, a redução do sulfato ocorre após sua conversão em adenosina-fosfosulfato (APS). A formação da APS requer a ligação do sulfato a uma molécula de ATP. O par APS-sulfito possui um potencial redox igual a -60mV, permitindo, portanto, a redução do sulfato a sulfito. O sulfito é então convertido a sulfeto, que é excretado.

A representação gráfica das etapas de conversão do sulfato até a formação do sulfeto, estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Etapas para redução do sulfato em sulfeto



FONTE: Hansen (1994, p.173).

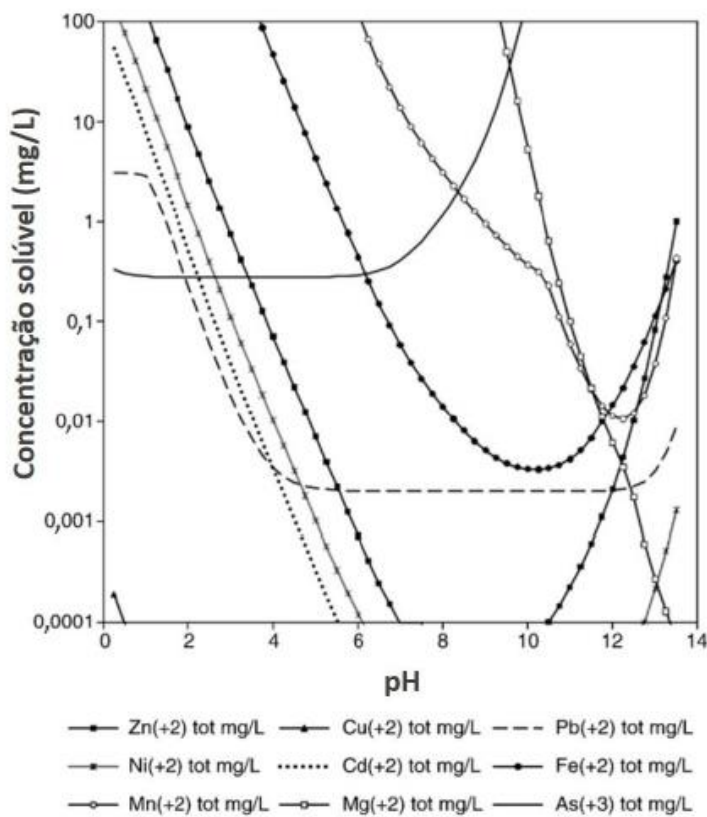
Todas essas reações são catalisadas por enzimas. A reação de formação do APS é catalisada pela ATP sulforilase, a reação de redução de sulfato a sulfito pela enzima APS redutase e a reação de conversão de sulfito em sulfeto é catalisada pela enzima sulfito redutase (TANG *et al.*, 2009).

A geração de alcalinidade promovida por esse processo de redução do sulfato a sulfeto também é um fator importante para os processos de precipitação dos metais que estão no meio e para a adequação ambiental da DAM que não pode ser descartada com pHs extremos.

A maior parte dos metais apresenta baixos valores de solubilidade em pH acima de 7,0, sendo facilmente separados da fase líquida por precipitação (LEWIS, 2010).

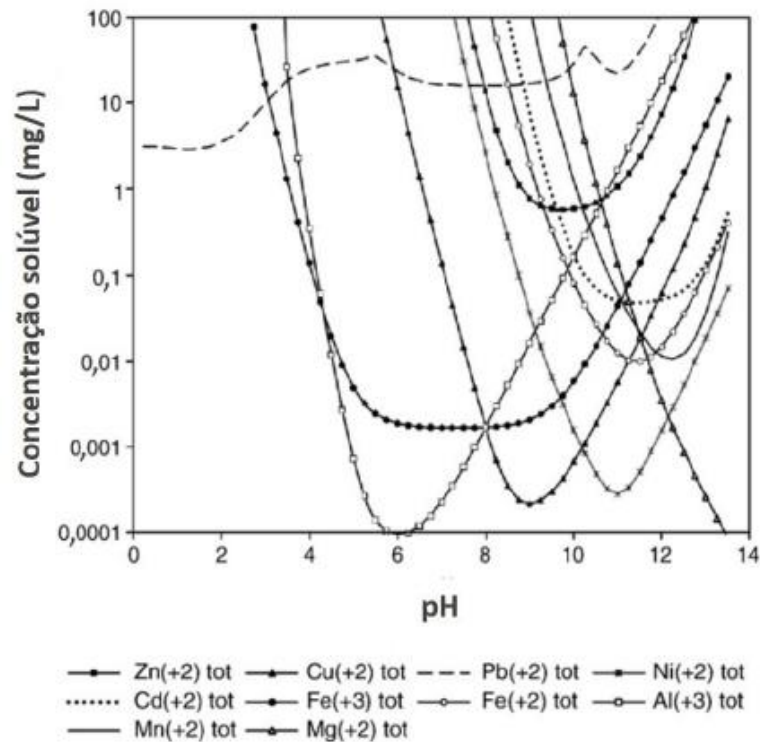
As figuras 4 e 5 apresentam e comparam a solubilidade de diversos sulfetos e hidróxidos metálicos de acordo com o pH, apontando uma clara vantagem dos sulfetos que se mostram bem menos solúveis em uma faixa de pH maior do que os hidróxidos.

Figura 4 - Solubilidade de sulfetos metálicos de acordo com o pH do meio



FONTE: Lewis (2010, p.224).

Figura 5 - Solubilidade de hidróxidos metálicos de acordo com o pH do meio



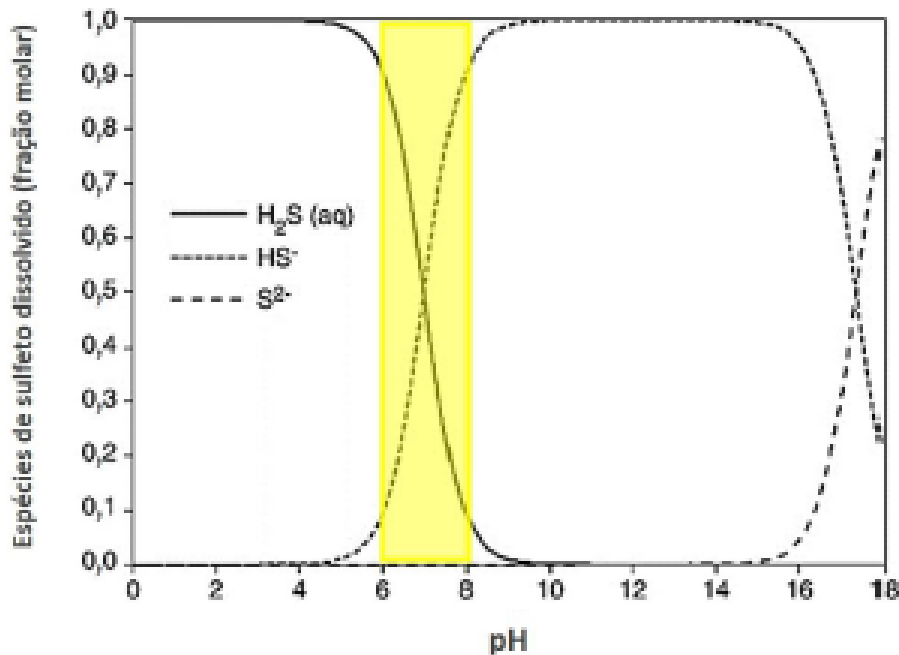
FONTE: Lewis (2010, p.224).

Pelos produtos de solubilidade ( $K_{ps}$ ) de diversos sulfetos metálicos serem menores que os dos seus respectivos hidróxidos, menores concentrações residuais desses complexos na fase líquida também são mais facilmente alcançadas, possibilitando a obtenção de maiores eficiências de remoção de metais em sistemas de tratamento de DAM baseadas na precipitação com sulfeto (LEWIS, 2010).

O sulfeto gerado a partir do metabolismo das BRS é encontrado predominantemente nas formas de sulfeto de hidrogênio dissolvido ( $H_2S$ ) e íon bissulfeto ou hidrogenossulfeto ( $HS^-$ ), ambos na fase líquida (LEWIS, 2010).

Essa distribuição de formas de sulfeto depende do pH do meio, como mostrado na Figura 6, que destaca em amarelo a faixa ótima para realização da digestão anaeróbia.

Figura 6 - Espécies de sulfeto de acordo com o pH apresentado no meio



FONTE: Lewis (2010, p.223).

Em reatores anaeróbios, que comumente atuam na faixa de pH destacada em amarelo, a dissociação do  $\text{H}_2\text{S}$  em  $\text{HS}^-$  e  $\text{H}^+$  se mostra relevante. O valor de  $\text{pK}_a$  próximo a 6,99, em condições de temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e de pressão de 1 atm, implica na significativa alcalinidade no meio devido à capacidade do  $\text{HS}^-$  neutralizar os íons  $\text{H}^+$  produzindo sulfeto de hidrogênio (GODOI *et al.*, 2017).

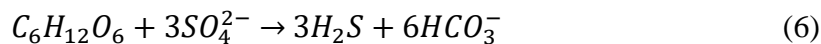
Portanto, a manutenção da capacidade tampão do meio, se faz necessária para garantir uma boa atividade das BRS e um bom rendimento do sistema. Uma queda da alcalinidade no meio pode causar um colapso no sistema devido ao acúmulo de ácidos orgânicos (CHERNICHARO, 2007).

Um outro parâmetro que deve ser levado em consideração quando se deseja estabelecer processos sulfetogênicos é a relação  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ . Em relações menores que 0,67, a quantidade de matéria orgânica disponível é insuficiente para a completa redução do sulfato. Já pra relações maiores que 0,67, a matéria orgânica será degradada, não só pela ação sulfetogênica mas também metanogênica, prejudicando o desempenho das BRS (DEV; ROY; BHATTACHARYA, 2017; KEFENI; MSGATI; MAMBA, 2017; LENS *et al.*, 1998).

De fato, em relações DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> próximas à 0,67, toda a matéria orgânica disponível poderia ser utilizada para a redução do sulfato, porém isso sugeriria que todo metabolismo das BRS seria destinado para a via de oxidação completa da matéria orgânica e isso não acontece sempre na prática (MUYZER; STAMS, 2008).

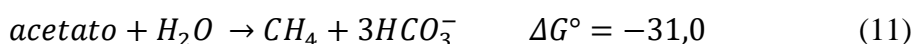
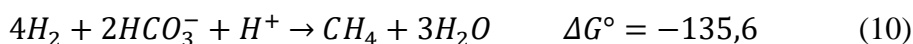
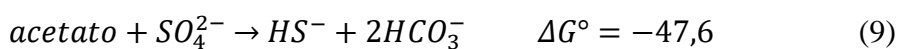
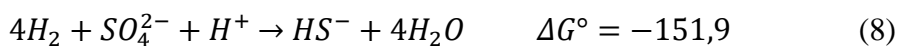
Normalmente, em reatores anaeróbios, o consumo do sulfato se dá principalmente pela via de oxidação incompleta de matéria orgânica. Assim, a demanda por doadores de elétrons é maior do que a apresentada pela estequiometria, que se for utilizada, pode gerar menores eficiências de remoção de matéria orgânica e de sulfato (ZHOU; XING, 2015).

Nas condições padrão, a estequiometria mostra (Eq.6) que o consumo de 0,67g de DQO por BRS reduz 1g de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Isso significa que quando a relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> está abaixo de 0,67, a concentração de substrato orgânico presente no meio é insuficiente para que ocorra a remoção total de sulfato e caso esta razão esteja maior que 0,67, pode ocorrer uma competição entre as BRS e outros procariontes como as bactérias fermentativas e arqueas metanogênicas pelo substrato. Além disso, fatores termodinâmicos e cinéticos também influenciam na competição entre as sulfetogênicas e metanogênicas (CAMILOTI *et al.*, 2014; GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015; DAS *et al.*, 2015).



$$192g + 288g \quad \rightarrow \quad 192g : 288g = 0,67 \quad (7)$$

Em relação à termodinâmica, as bactérias redutoras de sulfato levam vantagem, por possuírem variações de energia livre ( $\Delta G^\circ$ ) menores que as metanogênicas em reações envolvendo acetato e hidrogênio, como disposto nas Equações 8 a 11 (MUYZER; STAMS, 2008).



Em relação ao fator cinético, segundo Rodriguez e Zaiat (2011), as constantes cinéticas do modelo de Monod mostram que a razão  $\mu_m/K_s$ , em que  $\mu_m$  é a velocidade específica máxima de crescimento e  $K_s$  é a constante de saturação do substrato, é maior para as BRS quando

comparadas com as metanogênicas, o que indica maiores valores de velocidade específica de crescimento, quando a concentração de substrato é igual para os dois grupos microbianos

### 3.5 Doadores de Elétrons

Doadores de elétrons são essenciais para o tratamento biológico de águas residuais contendo sulfato. As fontes de carbono devem ser adicionadas no tratamento, quando os resíduos ricos em sulfato são deficientes em valores de DQO, de forma a auxiliar na redução completa do sulfato no meio.

Para o tratamento da DAM, que possui quantidade de matéria orgânica desprezível, comumente os doadores de elétrons são adicionados para que ocorra o tratamento e, normalmente, são utilizados aqueles substratos orgânicos comerciais, com valor econômico considerável, como o metanol, o lactato, ácidos orgânicos voláteis e até a sacarose (CELIS-GARCIA *et al.*, 2007; KAKSONEN *et al.*, 2003).

Várias substâncias orgânicas tem sido empregadas como doadores de elétrons e fontes de carbono, incluindo lodo de esgoto, vinhaça, esterco bovino, soro de leite e outros resíduos (GODOI *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2020).

O custo e a eficiência ou habilidade do doador de elétrons em completar a redução e remover o sulfato do meio são os dois principais fatores para se fazer uma boa escolha de fonte de carbono para o processo de redução biológica de sulfato (VAN HOUTEN *et al.*, 1994).

A vantagem de se utilizar resíduos orgânicos se dá justamente pelo baixo custo envolvido e pela capacidade de reaproveitamento e tratamento do próprio resíduo utilizado como doador de elétrons, que terá sua carga orgânica diminuída ao final do tratamento.

O soro de leite, por exemplo, é um subproduto da indústria de laticínios e, normalmente, é utilizado como alimento para animais e também como fertilizante, devido à presença de fósforo e potássio na sua composição. No entanto, segundo Smithers (2008), o soro de leite possui uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) cerca de 175 vezes maior do que um efluente de esgoto comum e, portanto, se descartado de maneira indevida, essa concentração de nutrientes e de matéria orgânica, passa a ser prejudicial para o meio ambiente onde ele é depositado.

Já em relação ao esgoto doméstico, o tratamento para diminuição da matéria orgânica e a eliminação do excesso de lodo gerado em estações de tratamento de esgoto é uma questão urgente em muitas áreas urbanas, devido à capacidade limitada de deposição. A minimização

do lodo pode fornecer uma solução viável para esse problema e, tratamentos anaeróbios, que produzem uma menor quantidade de lodo, além de diminuir a concentração de matéria orgânica do esgoto, são boas soluções (LAU *et al.*, 2006).

Outro resíduo que pode ser estudado como fonte doadora de elétrons é a borra de café. A produção global de café aumentou quase 17% entre 2000 e 2012. Vários resíduos são obtidos durante o processamento e a enorme quantidade de geração na produção de café solúvel, por exemplo, requer alguma solução. A borra de café além de conter grandes quantidades de compostos orgânicos (ácidos graxos, lignina, celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos), possui um baixo custo, se tornando viável para ser explorado como, por exemplo, na produção de biodiesel e em tratamentos de outros resíduos como doador de elétrons (CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015).

As bactérias redutoras de sulfato preferem utilizar o lactato como doadores de elétrons por conta de ser fornecido, nesse caso, maiores quantidades de energia e rendimento de biomassa, além da capacidade de produção maior de bicarbonato por mol de substrato, aumentando assim a alcalinidade do meio e eficiência.

Porém, como já destacado, o custo alto do substrato requer a busca por doadores de elétrons mais baratos como o soro de leite, esgoto e borra de café, por exemplo, que juntamente com uma boa escolha de reator, vão resultar em um tratamento eficiente da DAM (NAGPAL *et al.*, 2000).

### 3.6 Configurações de reatores para a redução biológica de sulfato

Diversas configurações diferentes já foram utilizadas em testes para o tratamento de drenagem ácida de mina em condições sulfetogênicas, como reatores UASB (RODRIGUEZ *et al.*, 2012), filtros anaeróbios (ELLIOT *et al.*, 1998), reatores de leito expandido (SIERRA-ALVAREZ *et al.*, 2007) e reatores de leito fluidizado (SAHINKAYA *et al.*, 2007).

Os reatores de estágio único, como os reatores de leito fixo, são normalmente operados em faixas de pH próximas a 7, favorecendo a precipitação dos metais presentes no meio, na forma de sulfetos, mas não permitem a separação efetiva deles, que permanecem em contato com a biomassa, podendo causar inibição da atividade sulfetogênica do meio pela toxicidade causada pelos metais (VILLA-GOMES *et al.*, 2011).

Em reatores de estágios múltiplos (duas ou mais fases), a remoção do sulfato ocorre em um reator e a precipitação dos metais em outro. Essa configuração possibilita a recuperação dos metais por meio da recirculação do efluente líquido no reator sulfetogênico ou do biogás

contendo sulfeto gasoso produzido (XINGYU *et al.*, 2013). Porém, esse tipo de sistema pode gerar a formação de partículas de sulfeto metálico com baixa sedimentabilidade, devido ao gradiente de concentração de sulfeto no meio líquido, uma vez que são altas as concentrações na entrada de corrente de sulfeto (ESPOSITO *et al.*, 2006).

Reatores de estágio único para processos com simultânea redução de sulfato a sulfeto e precipitação dos metais, se mostra uma escolha mais desejável, uma vez que se é possível recuperar os metais posteriormente. Além disso, os custos de instalação e operação dos reatores em estágio único são menores do que os custos para reatores com mais de um estágio, confirmando, portanto, a melhor opção para o processo de remoção de sulfato presentes na DAM (SÁNCHEZ-ANDREA *et al.*, 2014).

Um tipo de reator de estágio único que pode ser utilizado como opção recorrentemente em ensaios envolvendo redução biológica de sulfato, principalmente para avaliar a atividade das BRS, para determinar o potencial e a viabilidade da redução de sulfato gerado por fontes de carbono adicionadas ao meio e para determinar condições cinéticas, operacionais e termodinâmicas favoráveis de ensaio é o reator em batelada (SERRANO *et al.*, 2020).

Nesse tipo de reator, a temperatura é uma condição que pode ser analisada. Ela é capaz de afetar a atividade das BRS devido ao impacto que geram na velocidade de reação, uma vez que afetam a transferência de massa no meio, e por consequência, a taxa de crescimento da biomassa (RASOL *et al.*, 2015). Os ensaios que apresentam melhores resultados na remoção de sulfato são aqueles conduzidos em temperatura mesofílica (20 – 38°C) (CHEN *et al.*, 2010; FANG; ZHOU, 1997; STAMS, 2009).

Outro parâmetro é o tamanho do reator, que pode não afetar nos resultados, mas sim na acurácia devido aos limites de quantidade de substrato, resíduo a ser tratado e inóculo que poderão ser usados. A seleção do tamanho do reator batelada também deve incluir a quantidade de amostra que se desejará retirar durante todo o ensaio, uma vez que não é recomendado um decréscimo de mais de 10% do volume inicial (SERRANO *et al.*, 2020).

Além da temperatura, do pH, do tamanho do reator, a escolha do doador de elétron, a agitação, que também pode afetar as taxas de transferência de massa, a adição de gás inerte, como nitrogênio, argônio e hélio, para que o oxigênio seja expulso do meio e ambiente esteja sob condições anaeróbias, também são parâmetros importantes na operação deste tipo de sistema (SERRANO *et al.*, 2020).

O monitoramento dos testes em batelada envolvendo remoção de sulfato são realizados através da retirada de amostras simples dos reatores. O acompanhamento acontece até que a

conversão de um dos reagentes presentes no meio esteja completa. (NAJIB *et al.*, 2017). Monitorar a concentração de sulfato e sulfeto no meio são estratégias comumente usadas para determinar o potencial de redução de sulfato pelas BRS, porém, o sulfeto pode reagir com outros metais presentes no meio e subestimar a atividade das bactérias e a eficiência do processo. Por esse motivo, o monitoramento da concentração de sulfato se torna a melhor opção para determinar, com maior acurácia, os resultados dos ensaios. A concentração do doador de elétron também pode ser monitorada, realizando testes de DQO no meio (SERRANO *et al.*, 2020).

Considerando todos esses fatores, vale destacar que os testes realizados em batelada para a remoção biológica de sulfato podem trazer resultados que permitirão o avanço nos estudos e nas formas de se tratar a DAM, uma vez que se é possível analisar fatores operacionais e cinéticos com facilidade e boa confiabilidade.

## 4 ARTIGO

### **Efeito das concentrações de sulfato e ferro, do doador de elétrons e da razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> no tratamento de drenagem ácida de mina em reatores operados em batelada**

Effect of sulfate and iron concentrations, electron donor and COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio on acid mine drainage treatment in batch-operated reactors

Efecto de las concentraciones de sulfato y hierro, donante de electrones y relación DQO / SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> sobre el tratamiento ácido de drenaje de minas en reactores operados por lotes

**Gabriel de Freitas Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9259-3648>  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG, Brasil  
E-mail: gabrielfreitasmb@gmail.com

**Juliana Kawanishi Braga**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5500-9008>  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG, Brasil  
E-mail: jukawanishi@gmail.com

**Giselle Patricia Sancinetti**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8184-1834>  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG, Brasil  
E-mail: gisellesancinetti@gmail.com

**Renata Piacentini Rodriguez**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2837-3437>  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG, Brasil  
E-mail: renataprodriquez@gmail.com

**Resumo:** No presente estudo, buscou-se otimizar a eficiência na remoção de sulfato presente em drenagem ácida de mina (DAM) sintética utilizando reatores anaeróbios em seis fases em que foram testadas diferentes fontes de carbono, concentrações de sulfato e ferro, além de diferentes razões demanda química de oxigênio (DQO)/ SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e o aumento de volume do reator. Em cada fase foram analisadas concentrações de DQO, sulfato, pH inicial e final, alcalinidade, concentração de sulfeto e ferro, sólidos totais, fixos e voláteis do lodo. A melhor condição empregada em cada fase era mantida para a fase seguinte e novas condições eram testadas a fim de, ao final de 5 fases, se obter a melhor configuração de reator. A condição que continha soro de leite, 1500mg/L de sulfato, 100mg/L de ferro e DQO/ SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> igual a 1 obteve elevadas eficiências de remoções, variando entre 59% a 81% para sulfato e 77% a 96% para DQO, além de pH final variando entre 6,6 a 6,7. Além disso, os resultados evidenciaram uma alta robustez do inóculo empregado, uma vez que, mesmo submetido à diferentes tratamentos, não se observou impacto nas eficiências de remoção.

Palavras-chave: Bactérias redutoras de sulfato. Esgoto doméstico. Soro de leite. Borra de café. Tratamento de efluentes. Remoção de sulfato.

**Abstract:** In this study, the efficiency of sulfate removal in synthetic acid mine drainage (AMD) was optimized using anaerobic batch reactors in six phases. Different carbon sources, sulfate and iron concentrations were tested, in addition to different COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios. and increasing the scale of the reactor. In each phase, concentrations of COD, sulphate, initial and final pH, alkalinity, sulphide and iron concentration were analyzed, as well as total, fixed and volatile sludge solids. The best condition used in each phase was kept for the next, and new conditions

were tested in order to obtain, at the end of 5 phases, the best reactor configuration. The condition containing whey, 1500mg/L of sulfate, 100mg/L of iron and COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> equal to 1 had the best removal efficiencies, ranging from 59% to 81% for sulfate removal and 77% to 96 % for COD removal, in addition to a final pH ranging from 6.6 to 6.7. Furthermore, the results showed a high robustness of the inoculum used, since, even submitted to different treatments, there was no impact on removal efficiencies

**Keywords:** Sulfate-reducing bacteria. Domestic sewage. Whey. Spent ground coffee. Wastewater treatment. Sulfate removal.

**Resumen:** En el presente estudio se buscó optimizar la eficiencia de remoción de sulfatos presentes en el drenaje ácida sintética de minas (AMD) utilizando reactores anaeróbicos en seis fases en las que se probaron diferentes fuentes de carbono, diferentes concentraciones de sulfato y hierro, además de diferentes proporciones. DQO. / SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y el aumento de volumen del reactor. En cada una de las fases se analizaron concentraciones de DQO, sulfato, pH inicial y final, alcalinidad, concentración de sulfuro y hierro, además de sólidos de lodos totales, fijos y volátiles. La mejor condición utilizada en cada fase se mantuvo para la siguiente fase y se probaron nuevas condiciones para obtener, al final de las 5 fases, la mejor configuración del reactor. La condición que contiene suero, 1500 mg/L de sulfato, 100 mg/L de hierro y DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> igual a 1 tuvo las mejores eficiencias de eliminación, que van del 59% al 81% para la eliminación de sulfato y del 77% al 96% para la eliminación de DQO. Además de un pH final que oscila entre 6,6 y 6,7. Además, los resultados de este estudio mostraron una alta robustez del inóculo utilizado, ya que, aun sometido a diferentes tratamientos, no hubo impacto en las eficiencias de remoción.

**Palabras clave:** Bacterias reductoras de sulfato; Aguas residuales domésticas; Suero de leche; Granos de café; Lote; tratamiento de aguas residuales; eliminación de sulfato.

## 1 Introdução

A drenagem acida de mina (DAM) é produzida quando um material contendo sulfeto é exposto ao oxigênio e a água. A oxidação dos sulfetos possibilita a formação de ácido sulfúrico, aumentando a acidez do meio e favorecendo a solubilização de metais presentes nas rochas, gerando, então, a DAM. Existem algumas formas de se tratar esse resíduo como a utilização de métodos físico-químicos ou biotecnológicos. (Mello *et al.*, 2014).

Os tratamentos biotecnológicos através da utilização das bactérias reductoras de sulfato (BRS) tem sido considerados uma alternativa promissora em relação aos tratamentos tradicionais, possuindo vantagens como a possibilidade de recuperação dos metais, menores custos de disposição do lodo gerado e produção de alcalinidade (Dev *et al.*, 2015; Guo; Kang; Feng, 2017; Hussain *et al.*, 2016).

Geralmente, a DAM é deficiente em doadores de elétrons e, por isso, é necessária uma adição dessa fonte para que o sulfato seja reduzido de maneira satisfatória, alcançando alta performance, boa eficiência e viabilidade econômica para o tratamento. A escolha é basicamente feita analisando a biodegradabilidade da fonte doadora de elétrons e o custo por unidade de sulfato convertido em sulfeto. As bactérias reductoras de sulfato (BRS) podem usar compostos orgânicos simples como ácidos carboxílicos como fonte de carbono e energia. Além disso, o lactato é bastante utilizado, mas em larga escala, apresenta alto custo. Uma alternativa é o etanol, que é uma fonte de menor custo (Costa *et al.*, 2009).

Além dessas fontes mais utilizadas, pode-se fazer uso de compostos orgânicos mais complexos como lodo de esgoto, esterco animal, madeira, serragem, soro de leite, vinhaça e outros resíduos, como a borra de café, por exemplo, que são ou resíduos de algum processo ou são compostos que não possuem valor econômico alto (Liamleam; Annachatre, 2007; Ribeiro, *et al.*, 2020).

A vantagem de se utilizar resíduos orgânicos se dá justamente pelo baixo custo envolvido e pela capacidade de reaproveitamento e tratamento do próprio resíduo utilizado como doador de elétrons, que terá sua carga orgânica diminuída ao final do tratamento.

O soro de leite, por exemplo, é um subproduto da indústria de laticínios e, normalmente, é utilizado como alimento para animais e também como fertilizante, devido à presença de fósforo e potássio na sua composição. Porém, segundo Smithers (2008), o soro de leite possui uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) cerca de 175 vezes maior do que um efluente de esgoto comum e, portanto, se descartado de maneira indevida, essa concentração de nutrientes e de matéria orgânica, passa a ser prejudicial para o meio ambiente onde ele é depositado.

Já em relação ao esgoto doméstico, o tratamento para diminuição da matéria orgânica presente e a eliminação do excesso de lodo gerado em estações de tratamento de esgoto é uma questão urgente em muitas áreas urbanas, devido à capacidade limitada de deposição. A minimização do lodo pode fornecer uma solução viável para esse problema e, tratamentos anaeróbios, que produzem uma menor quantidade de lodo, além de diminuir a concentração de matéria orgânica do esgoto, são boas soluções (Lau *et al.*, 2006).

Outro resíduo que pode ser estudado como fonte doadora de elétrons é a borra de café. Vários resíduos são obtidos durante o processamento e a enorme quantidade de geração na produção de café solúvel, por exemplo, requer alguma solução. A borra de café além de conter grandes quantidades de compostos orgânicos (ácidos graxos, lignina, celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos), possui um baixo custo, se tornando viável para ser explorado como, por exemplo, na produção de biodiesel e em tratamentos de outros resíduos como doador de elétrons (Campos-Vega *et al.*, 2015).

O reator em batelada é um tipo de reator de estágio único que pode ser utilizado como opção recorrentemente em ensaios envolvendo redução biológica de sulfato, principalmente para avaliar a atividade das BRS, para determinar o potencial e a viabilidade da redução de sulfato gerado por fontes de carbono adicionadas ao meio e para determinar condições cinéticas, operacionais e termodinâmicas favoráveis de ensaio (Serrano, *et al.*, 2020).

Diante do grande volume gerado de DAM na região sul de Minas Gerais, onde foi realizada a pesquisa, há necessidade de se buscar tratamento ambiental e economicamente viáveis para esse resíduo. O presente trabalho visa empregar reatores anaeróbios em batelada para o tratamento de DAM sintética, analisando diferentes fontes de carbono, concentrações iniciais de sulfato e ferro e razões DQO/sulfato, buscando assim, as melhores condições para promover remoção ótima de sulfato e matéria orgânica. Considerando todos esses fatores, vale destacar que os testes realizados em batelada para a remoção biológica de sulfato podem trazer resultados que permitirão o avanço nos estudos e nas formas de se tratar a DAM, uma vez que se é possível analisar fatores operacionais e cinéticos com facilidade e boa confiabilidade.

## 2 Metodologia

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Biotecnologia Anaeróbia e de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL -MG, campus Poços de Caldas.

## 2.1 Reatores anaeróbios operados em batelada

Os reatores em vidro borossilicato *Uniglas* de 1L foram preenchidos em 50% do seu volume total com soluções específicas. Eles receberam fluxo de  $N_2$  e foram vedados com rolha de borracha para evitar troca de gases e vazamentos durante os ensaios. O inóculo utilizado foi o lodo granular obtido a partir de um reator de manta de lodo e fluxo ascendente utilizado no sistema de tratamento de efluentes da avícola Dacar, localizada em Tietê- SP.

Os reatores permaneceram a 30°C em estufa sem luminosidade e agitação. O final de cada fase foi determinado a partir da estagnação na queda das concentrações de sulfato e DQO.

A composição da água residuária sintética foi baseada nos procedimentos de Costa (2017), simulando drenagem ácida de mina, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da DAM em cada fase

| Fases     | $Na_2SO_4$<br>(mg/L) | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$<br>(mg/L) |
|-----------|----------------------|--------------------------------|
| F1        | 1890                 | 498                            |
| F2 Soro   | 1890                 | 498                            |
| F2 Esgoto | 1890                 | 498                            |
| F2 Café   | 1890                 | 498                            |
| F3 S1500  | 1890                 | 498                            |
| F3 S2000  | 2630                 | 498                            |
| F3 S2500  | 3380                 | 498                            |
| F4 Fe100  | 1890                 | 498                            |
| F4 Fe200  | 1890                 | 996                            |
| F4 Fe400  | 1890                 | 1992                           |
| F5 R0,67  | 1890                 | 498                            |
| F5 R1,0   | 1890                 | 498                            |
| F5 R2,0   | 1890                 | 498                            |

FONTE: Autor (2021).

Além de sulfato de sódio e sulfato de ferro, em todas as fases foram adicionadas 88mg/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 42mg/L de  $ZnCl_2$  e 19mg/L de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .

As fontes de carbono utilizadas durante os ensaios foram esgoto sanitário sintético, solução de soro de leite e borra de café. Vale ressaltar que essas fontes só foram utilizadas a partir da Fase 2. Na Fase 1, o reator foi composto apenas por DAM e inóculo.

O esgoto doméstico sintético foi produzido de acordo com Callado (2001), com uma composição de 50% de proteínas (1,87 ml/L de extrato de carne), carboidratos (57,6 mg/L de sacarose, 179,2 mg/L de amido comercial e 65,5 mg/L de celulose), lipídeos (3 gotas de óleo de soja em 0,09 ml/L de detergente) e sais minerais (5 ml de solução de NaCl com 50,0 g/L, 5 ml de solução de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1,4 g/L e 5 ml de solução de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  com 0,9 g/L), totalizando assim uma demanda química de oxigênio é de 800mg/L.

O soro de leite em pó comercial foi utilizado contendo concentração de nitrogênio de 22,2 mg de N-NTK/g de soro e concentração de fósforo de 12000 mg de P/g de soro. A concentração de 1,0 g/L de soro, totaliza uma DQO em torno de 700 mg/L.

A borra de café foi coletada a partir do resíduo caseiro gerado no processo de fabricação da bebida. Ela foi armazenada, diluída em água e a solução teve seu valor de DQO analisado e foi adicionado aos reatores de acordo com a DQO desejada, posteriormente.

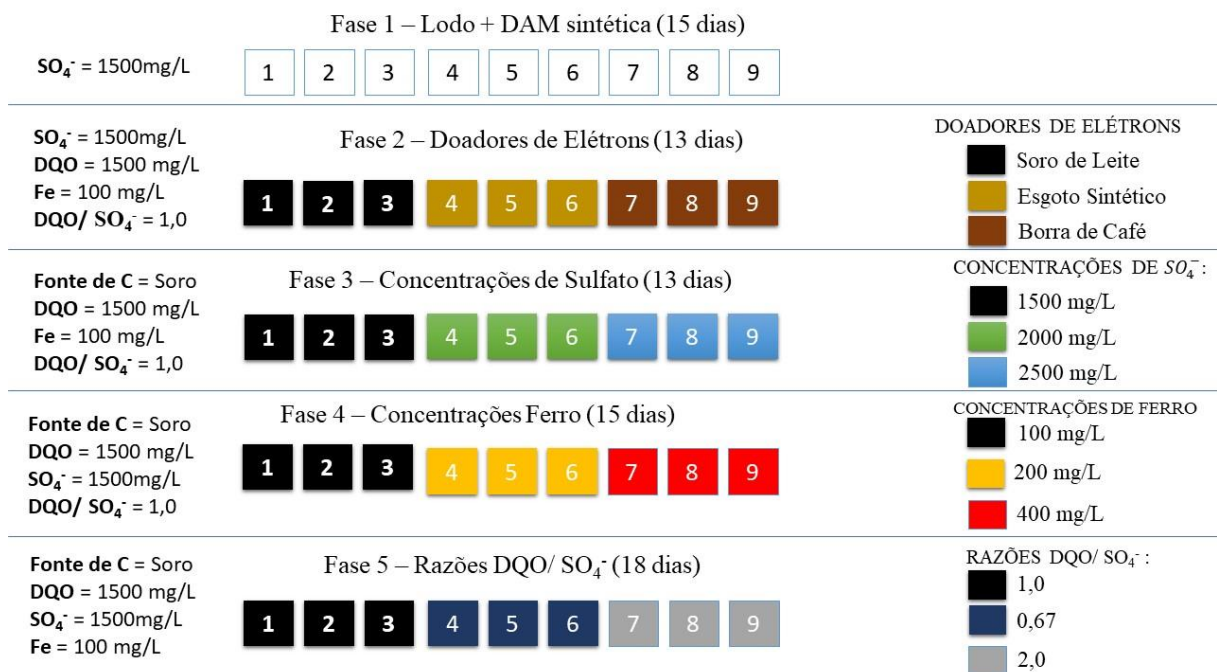
## 2.2 Procedimentos Experimentais

A operação foi dividida em cinco fases. Em cada fase foram analisadas concentrações de DQO, sulfato, pH inicial e final, alcalinidade, concentração de sulfeto e ferro, sólidos totais, fixos e voláteis do lodo.

Ao final de cada fase, os resultados foram analisados estatisticamente através do Teste de Tukey com auxílio do *software* RStudio para verificar se havia diferença significativa entre as condições estudadas. A melhor condição empregada era mantida na fase seguinte e novas condições eram testadas.

Inicialmente, o lodo foi reativado com esgoto sintético (DQO = 1500 mg/L) por 7 dias. Após esse período, foram montados 9 reatores com volume de 500 mL cada e 10% v/v de lodo e diferentes composições de fase líquida, dependendo da fase de operação. A Figura 7 apresenta a divisão das fases de operação.

Figura 7 – Divisão das fases do projeto



FONTE: Autor (2021).

Na Fase 1 foram adicionados aos 9 reatores lodo previamente adaptado (10% v/v) e DAM sintética (1500 mg/L de sulfato). Essa fase foi realizada a fim de adaptar o lodo às condições de pH e sulfato apresentados pela DAM. Foram aferidos valores de sulfato e DQO durante 15 dias, a fim de se observar o comportamento de remoção dessas variáveis sem a inserção de um doador de elétrons no meio.

Na Fase 2, foram testadas três fontes de carbono e seus efeitos na remoção de sulfato e DQO. Os 9 reatores foram divididos em 3 grupos (triplicata) que foram operados com aproximadamente 1500 mg/L de DQO. Os reatores 1,2 e 3, receberam uma solução de soro de leite. Nos reatores 4,5 e 6, foi adicionado esgoto doméstico

sintético e aos reatores 7,8 e 9 foi adicionado borra de café. A borra de café foi coletada após filtragem do café e armazenada em garrafas PET. Em laboratório, a borra foi, primeiramente, diluída em água e foi medida a concentração de DQO. A partir daí, calculou-se a quantidade necessária a ser adicionada em reator para alcançar concentração de 1500mg/L. A Fase 2 teve duração de 13 dias.

A Fase 3 consistiu na análise da eficiência de remoção, variando a concentração de sulfato e de carga orgânica no meio (mantendo a mesma razão de DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$ ), utilizando como doador de elétrons a melhor condição da fase anterior. Os valores de DQO e sulfato utilizados foram de 1500 mg/L, 2000 mg/L e 2500 mg/L, sempre operando reatores em triplicata, totalizando 9 reatores. A Fase 3 teve duração de 13 dias.

Na Fase 4, foram testadas diferentes concentrações de ferro no meio (100mg/L; 200mg/L e 400mg/L), mantendo as concentrações de DQO e sulfato as que tiveram melhor desempenho na Fase 3. A Fase 4 teve duração de 15 dias.

Na Fase 5, cada reator constituído do melhor doador de elétrons, concentração de sulfato e ferro, obtidas nas fases anteriores, recebeu diferentes concentrações de fontes de carbono, resultando numa razão DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  diferente para cada um. Foi analisado o desempenho dos reatores com razões DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  iguais a 1,0; 0,67 e 2,0 durante 18 dias.

Vale ressaltar que ao final de cada fase, todo o lodo utilizado era misturado e redistribuído para os 9 reatores novamente, para manter uma homogeneidade do lodo para todas as condições testadas dentro de uma fase. Em todas as fases, o pH inicial foi ajustado para 4, com adição de uma solução de HCl 4M.

### 2.3 Análises físico-químicas

Foram realizadas análises de remoção de matéria orgânica, em forma de DQO e análises de sulfato residual e sulfato para fomentar a determinação da cinética de redução do sulfato para todas as fases de operação do reator. Análises de pH e concentração de ferro também foram realizadas para conferência de estabilidade e operação do reator. Todas as análises foram realizadas de acordo com APHA (2012).

Além dessas análises, foram realizadas análises da carga de sulfato removida em cada fase de operação dos reatores, a fim de determinar um parâmetro além da eficiência baseada nas concentrações iniciais e finais.

Para calcular a carga removida de sulfato, utiliza-se a Eq. (1) que contém as variáveis de concentração inicial, eficiência de remoção e volume líquido do reator.

$$\frac{(Ci \times \%)}{t} \quad (1)$$

Em que:

$Ci$  = Concentração inicial de DQO ou sulfato nos reatores;

$\%$  = eficiência de remoção de DQO ou sulfato ao final da fase ou porcentagem de desvio padrão para o cálculo do desvio da carga;

$t$  = duração de cada fase em horas.

Em relação às 2 espécies de sulfeto geradas nos reatores, sendo sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e hidrogenossulfeto ou bissulfeto ( $\text{HS}^-$ ), fez-se necessária realizar a quantificação, a fim de definir a predominância em cada fase, uma vez que o sulfeto de hidrogênio é tóxico e pode prejudicar as atividades das BRS. Para esse

cálculo, foi preciso utilizar o pK da reação química que converte sulfeto de hidrogênio aquoso nessas duas espécies, a 30°C e 1 atm, igual a 6,9. As Eqs. (2) e (3) determinam a concentração de H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup>.

$$[H_2S]_{aq} = \frac{[TDS]}{1+10^{(pH-pKa)}} \quad (2)$$

$$[HS^-]_{aq} = [TDS] - [H_2S]_{aq} \quad (3)$$

### 2.1. Análise cinética

Ao final de cada etapa, foi realizada a análise cinética de cada condição, de acordo com a equação de primeira ordem apresentada pela Eq. (4), a fim de se analisar os parâmetros cinéticos aparentes e considerar a existência de um substrato residual no meio, provido das fases anteriores dos ensaios e mantidos nos reatores.

$$S(t) = S_R + (S_0 - S_R)e^{-K^{ap}(t-t_0)} \quad (4)$$

Em que:

$S(t)$  = Concentração de substrato no tempo t (mg/L);

$S_0$  = Concentração de substrato inicial (mg/L);

$S_R$  = Concentração de substrato residual (mg/L);

Os ajustes por regressão não linear foram realizados com auxílio do software *Origin 2018*, demonstrado por Camargo *et al.* (2002) e realizado por Costa (2017) e Costa *et al.* (2020).

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Monitoramento dos reatores

Todos os resultados referentes as fases de operação dos reatores estão dispostos na Tabela 2. Vale destacar que a única fase que apresentou pH final menor que 6,0 foi a fase F5 R2,0 que também apresentou baixa remoção de DQO (menor que 50%), além disso, a fase F1 apresentou eficiência de remoção de sulfato muito baixa quando comparada com as outras fases. Em relação às concentrações finais de ferro, destaca-se a fase F4 Fe400 que apresentou concentração final muito acima das demais fases estudadas.

Nota-se também que, com exceção da fase F3 S2000, todas as outras fases que tiveram remoção de sulfato abaixo de 50%, também apresentaram menores valores de pH final. Com baixa redução de sulfato para sulfeto, ocorre menor consumo de íons H<sup>+</sup>, resultando em um menor acréscimo de pH. O sulfeto gerado acaba por precipitar os metais presentes no meio e libera prótons que interagem com o bicarbonato resultante da redução do sulfato, conferindo neutralidade ao pH do meio.

Quando o metal está presente em maior quantidade e, conseqüentemente uma maior concentração dele é precipitada, ocorre um deslocamento da reação para a geração de íons H<sup>+</sup> e isso acaba por conferir queda no pH no meio. O valor de pH pode ser controlado a partir do momento em que uma maior concentração de sulfato é reduzida a sulfeto, pois assim juntamente com o sulfeto, bicarbonato é gerado, aumentando assim a alcalinidade do meio. (Cao *et al.*, 2009; Sheoran *et al.*, 2010).

O fato da fase F4 Fe400 apresentar maior concentração inicial de ferro juntamente com uma baixa eficiência de remoção de sulfato, justifica o pH final baixo.

Por último, nota-se que a concentração de sulfeto efluente aumentou a partir da Fase 4. Isso se deve à uma mudança no modo de coleta de amostras, que, antes eram retiradas com o auxílio de uma seringa que perfurava uma região menos espessa da tampa de borracha que vedava o reator e a partir da Fase 4, começou-se a perfurar a tampa em uma região mais espessa para que menores quantidades de sulfeto conseguissem escapar do reator. Além disso, pelo sulfeto ser um gás altamente volátil, realizar a análise de forma correta é difícil (podem ocorrer perdas de sulfeto durante a análise) e sua mensuração pode não estar totalmente correta caso haja micro vazamentos nos reatores. Contudo, outras análises como a de sulfato, DQO e pH, podem confirmar a eficiência do processo.

O critério utilizado para escolha das melhores condições de cada fase foram os resultados de remoção de DQO e sulfato.

Tabela 2 - Resultados das análises realizadas em todas as fases operacionais.

| Fases     | Razão                            |      | pH inicial | pH final  | % remoção de sulfato | % remoção DQO | Concentração                  | Concentração                  |
|-----------|----------------------------------|------|------------|-----------|----------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
|           | DQO/SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> | real |            |           |                      |               | Fe <sup>2+</sup> Final (mg/L) | H <sub>2</sub> S Final (mg/L) |
| F1        | 0,47                             |      | 4,05±0,00  | 6,35±0,40 | 20,56±7,42           | 74,45±7,86    | 1,49±0,32                     | 0,15±0,03                     |
| F2 Soro   | 1,16                             |      | 3,99±0,26  | 6,71±0,34 | 81,01±0,53           | 95,57±1,82    | 0,38±0,16                     | 0,40±0,16                     |
| F2 Esgoto | 1,24                             |      | 3,91±0,22  | 6,93±0,22 | 76,52±1,07           | 92,67±2,54    | 0,40±0,08                     | 0,39±0,17                     |
| F2 Café   | 1,27                             |      | 3,89±0,01  | 6,72±0,04 | 52,43±3,28           | 82,23±3,33    | 1,96±0,64                     | 0,18±0,03                     |
| F3 S1500  | 0,94                             |      | 3,97±0,00  | 6,87±0,05 | 78,24±1,38           | 91,68±2,55    | 0,38±0,16                     | 0,25±0,00                     |
| F3 S2000  | 1,06                             |      | 4,08±0,00  | 6,78±0,31 | 45,76±1,04           | 79,35±7,73    | 1,60±0,57                     | 0,24±0,08                     |
| F3 S2500  | 1,06                             |      | 3,95±0,00  | 6,83±0,12 | 58,54±0,56           | 86,87±1,08    | 3,01±0,01                     | 0,43±0,21                     |
| F4 Fe100  | 1,05                             |      | 4,03±0,13  | 6,75±0,18 | 79,61±2,12           | 93,99±3,92    | -                             | -                             |
| F4 Fe200  | 0,88                             |      | 3,95±0,00  | 6,17±0,26 | 50,99±3,47           | 95,81±2,03    | 0,89±0,08                     | 2,43±0,37                     |
| F4 Fe400  | 0,82                             |      | 4,00±0,00  | 6,06±0,03 | 40,05±5,10           | 93,94±0,25    | 90,07±0,49                    | 2,27±0,38                     |
| F5 R0,67  | 0,70                             |      | 3,93±0,06  | 6,22±0,41 | 55,05±4,03           | 58,42±1,10    | 0,36±0,29                     | 1,79±0,10                     |
| F5 R1,0   | 1,63                             |      | 4,00±0,05  | 6,56±0,07 | 59,41±7,18           | 77,35±6,75    | -                             | -                             |
| F5 R2,0   | 0,98                             |      | 3,97±0,03  | 5,52±0,26 | 46,95±3,76           | 50,88±3,45    | 3,16±0,08                     | 2,75±0,08                     |

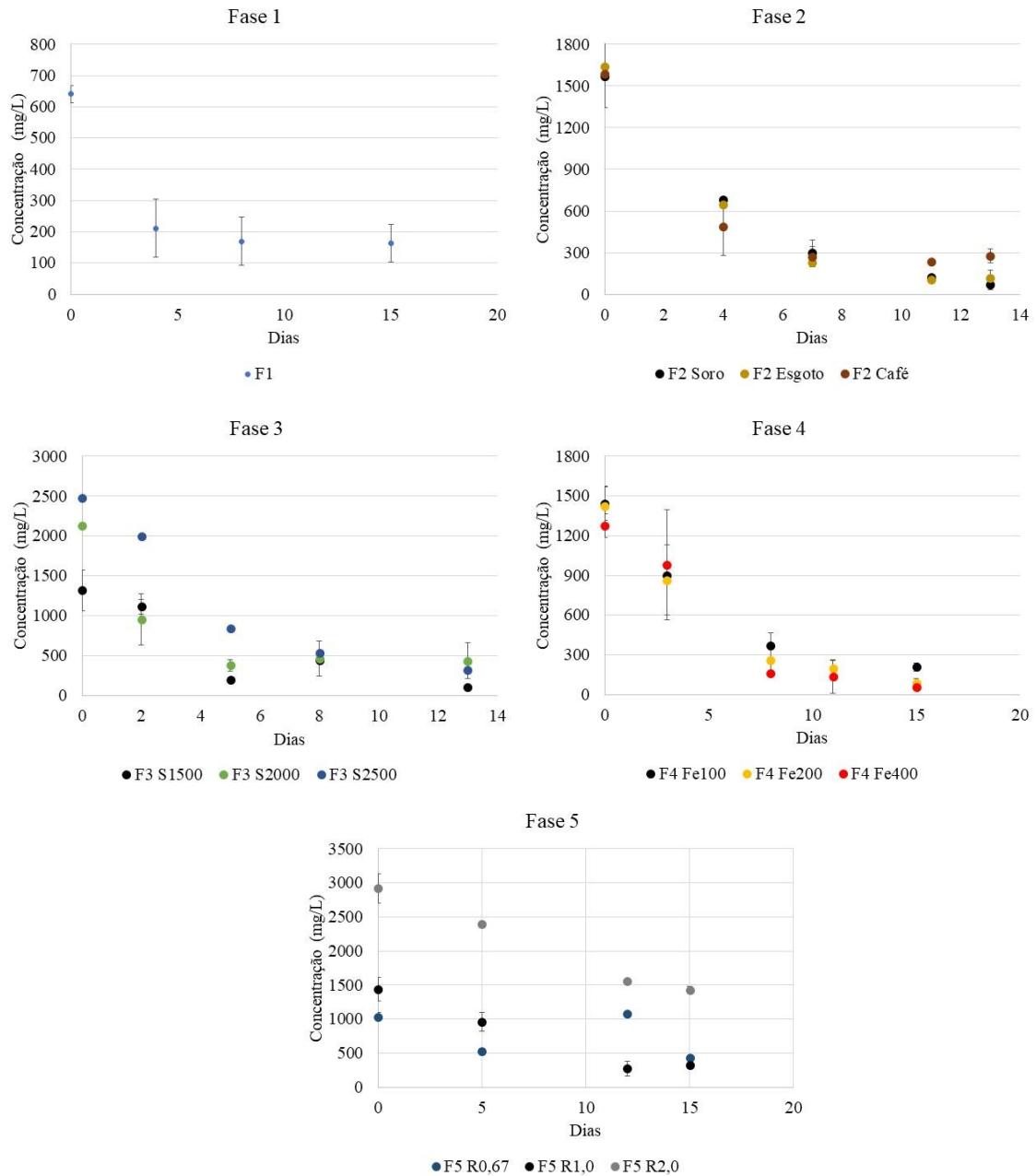
FONTE: Autor (2021).

Pode-se observar na Tabela 2 que a menor eficiência de remoção de sulfato durante todo o estudo, com exceção da fase F1, ocorreu justamente na fase F4 Fe400 que possuiu maior concentração inicial de ferro juntamente com menor eficiência de remoção de sulfato no final, resultando em pH mais baixo.

Como a Fase F1 foi a primeira fase realizada após a adaptação do lodo com Esgoto Doméstico Sintético, possivelmente as BRS não estavam com a atividade metabólica totalmente ativa, causando baixa remoção de DQO e sulfato do meio. Além disso, como na fase F1 não foi adicionado doador de elétrons, a DQO inicial no meio foi mais baixa do que a DQO inicial das outras fases, sendo toda ela provida pelo próprio inóculo, resultando assim em eficiência de remoção.

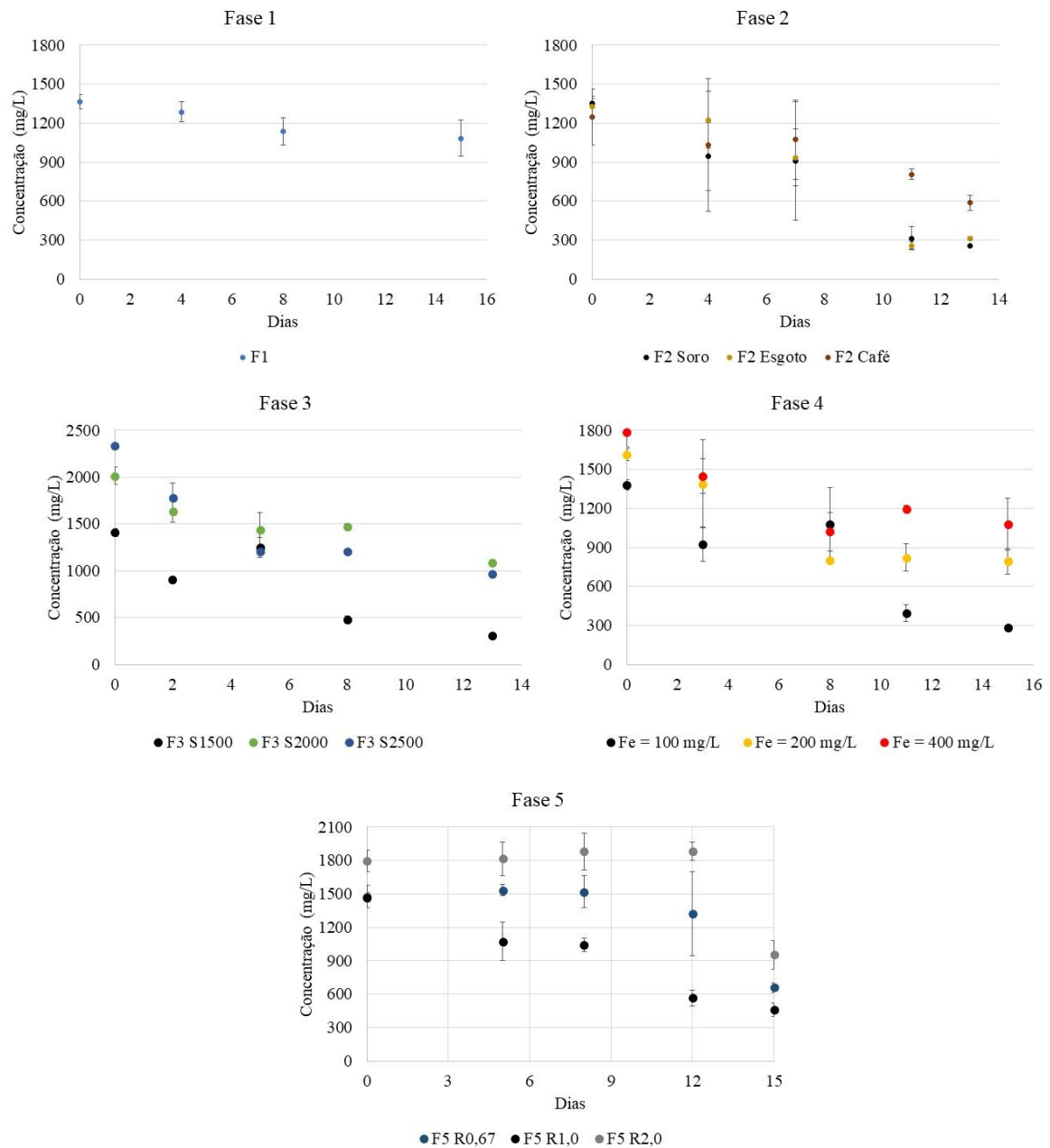
Os dados de remoção de DQO e sulfato para cada uma das fases, estão dispostos na Figura 8 e Figura 9, respectivamente.

Figura 8 - Gráficos de Variação de Concentração de DQO



FONTE: Autor (2021)

Figura 9 - Gráficos de Variação de Concentração de Sulfato



FONTE: Autor (2021)

Para a análise estatística foi utilizado o Teste de Tukey, com nível de significância de 5% e os resultados para análise de remoção de DQO estão apresentados na Tabela 3, em que as médias correspondem à remoção que ocorreu em cada fase. Nesse teste, os tratamentos que obtêm o mesmo rótulo (A, B ou C), são considerados iguais, estatisticamente falando, a um nível de significância pré determinado.

Tabela 3 - Resultados Teste Tukey para DQO e Sulfato

| Fase 2    |            |                | Fase 3   |            |                |
|-----------|------------|----------------|----------|------------|----------------|
| Fase      | Grupos DQO | Grupos Sulfato | Fase     | Grupos DQO | Grupos Sulfato |
| F2 Soro   | A          | A              | F3 S1500 | A          | A              |
| F2 Esgoto | A          | A              | F3 S2000 | A          | C              |
| F2 Café   | B          | B              | F3 S2500 | A          | B              |
| Fase 4    |            |                | Fase 5   |            |                |
| Fase      | Grupos DQO | Grupos Sulfato | Fase     | Grupos DQO | Grupos Sulfato |
| F4 Fe100  | A          | A              | F5 R0,67 | B          | A              |
| F4 Fe200  | A          | B              | F5 R1,0  | A          | A              |
| F4 Fe400  | A          | B              | F5 R2,0  | C          | A              |

FONTE: Autor (2021).

Observando a Tabela 3, nota-se que F2 Soro e F2 Esgoto obtiveram resultados estatisticamente iguais, tanto para remoção de DQO quanto para sulfato. Já quando foi utilizada a borra de café como doador de elétrons, os resultados foram estatisticamente diferentes. Isso pode ser explicado pela disponibilidade do carbono nessas fontes. Tanto o soro quanto o esgoto, foram adicionados a partir de uma solução líquida. Já a borra de café foi adicionada *in natura* e apenas solubilizada em água, mas não formando uma solução líquida homogênea e isso pode ter prejudicado a disponibilidade da matéria orgânica pelas BRS.

Com isso, a escolha do soro como doador de elétrons para as fases seguintes foi feita devido o resíduo ser comum no Estado de Minas Gerais, região onde predomina pequenos e médios laticínios, sendo que muitos possuem dificuldade em encontrar destinação sustentável para o soro, além de ser a região de estudo do presente trabalho. Adicionado a isso, o soro de leite foi escolhido para testar o substrato que já foi utilizado por Sampaio (2015), Jiménez-Rodríguez *et al.* (2009) e Santos *et.al.* (2021) em diferentes condições de DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  e concentrações de sulfato e ferro.

Sampaio (2015), por exemplo, utilizou reator UASB com DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  igual a 1 e 1500mg/L de sulfato afluente de água residuária de mina e soro de leite como doador de elétrons e obteve remoções de sulfato e DQO iguais a 68% e 63%, respectivamente. No presente estudo, foi observada eficiência de remoção de DQO e sulfato para essas mesmas condições, de DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  igual a 1 e 1500mg/L de sulfato, de 95% e 81%, respectivamente.

Na Fase 3, todas as condições obtiveram desempenhos estatisticamente iguais para a remoção de DQO, porém, em relação à remoção de sulfato, a fase F3 S1500, contendo 1500 mg/L de sulfato, obteve estatisticamente, melhor desempenho na remoção e, portanto, essa concentração foi mantida para as fases 4 e 5. A diferença na carga orgânica disponível na Fase 3, evidenciou que o aumento da carga de DQO e sulfato promoveram uma mudança na rota metabólica de oxidação da matéria orgânica. Menores cargas aplicadas podem favorecer a predominância das BRS que são mais sensíveis a cargas maiores em relação à outras bactérias como as metanogênicas. (Muyzer; Stams, 2008).

Jimenez-Rodriguez (2009) utilizou o soro de leite como doador de elétrons em reator de leito fixo para tratar DAM com concentração de sulfato de 2000mg/L e obteve resultado de 68,1% de remoção de sulfato e 55,4%

remoção de DQO, com  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 0,5. No presente estudo, com  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1, mas com 2000 mg/L de sulfato, a eficiência de remoção de sulfato e DQO foram de 46% e 79%, respectivamente.

Na Fase 4, todas as fases também obtiveram resultados estatisticamente iguais quanto à remoção de DQO, porém com relação à remoção de sulfato, a fase F4 Fe100 se diferenciou das demais, que continham maiores concentrações de ferro no meio. A presença de metais no meio pode favorecer a remoção de sulfato, pois consegue reduzir a toxicidade do sulfeto sobre as BRS ao precipitar os metais e, assim, consumirem o sulfeto presente no meio, além de promoverem um desequilíbrio químico na reação, favorecendo o consumo de sulfato (Cunha *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2016). Porém, pode-se constatar, no presente estudo, que maiores concentrações de ferro resultaram, em menores remoções de sulfato. Segundo Tang *et al.* (2009), íons de ferro (III) podem atuar como receptores de elétrons para algumas espécies de BRS, ou seja, o ferro precipitado pode dividir a função de receptor de elétrons com o sulfato. Com isso, a remoção de DQO não difere entre as fases com diferentes concentrações de ferro, porém, a remoção de sulfato é afetada. Sani *et al.* (2001) também observaram que altas concentrações de metais resultam em diminuição no metabolismo das BRS.

Na Fase 5, os resultados obtidos na remoção de sulfato, tanto na F5 R0,67, F5 R1,0 e F5 R2,0 foram estatisticamente iguais, porém, em relação à remoção de DQO, a fase F5R1,0 foi diferente estatisticamente comparada às demais.

Em relação às fases F5 R0,67 e F5 R2,0, pode-se explicar a baixa remoção de DQO por dois fatores. Primeiro, o fato de o lodo utilizado já estar há mais de 8 meses em atividade, recebendo resíduos com diferentes concentrações de DQO, sulfato e metais, provavelmente, sofreu um estresse metabólico que justificaria a queda na atividade das BRS. Essa hipótese pode ser corroborada pelos resultados de remoção observado nas fases F5 R1,0 e F2 Soro, que possuíam as mesmas concentrações de DQO, sulfato e metais, mas obtiveram valores de remoção diferentes (F5R1,0 obteve eficiência de remoção de DQO 20% menor que a fase F2 Soro).

A baixa remoção de sulfato na F5 R0,67 também pode estar relacionada com o metabolismo incompleto das BRS ao consumirem o substrato empregado como doador de elétrons. Madigan *et al.*, (2016) descrevem algumas espécies de BRS incapazes de oxidar completamente alguns substratos. Dessa forma, apenas parte do substrato disponível é utilizada como receptor de elétrons. Com isso, a razão  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1 pode ter disponibilizado uma quantidade de substrato próxima ao valor estequiométrico, gerando assim, um melhor resultado.

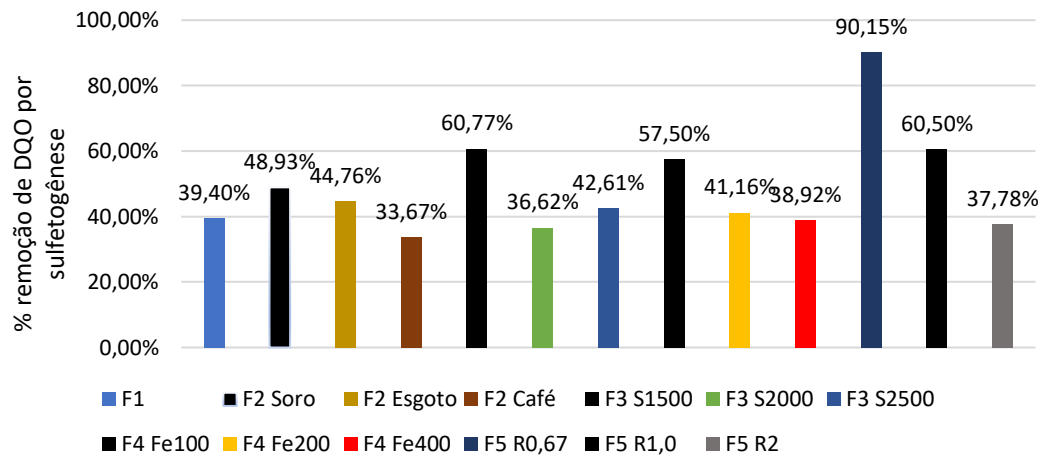
Santos *et al.*, (2021) utilizaram soro de leite como doador de elétrons para tratar DAM em reator em batelada alimentada e obtiveram 68% de remoção de DQO e 80% de remoção de sulfato quando utilizou  $DQO/SO_4^{2-}$  de 1 e quando utilizou  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2, a remoção de DQO e sulfato foi 43% e 58%, respectivamente. Valores próximos aos obtidos no presente trabalho, que teve, nessa mesma razão  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 2, remoção de DQO igual a 50,9% e de sulfato igual a 46,9%.

Observando o gráfico apresentado na Figura 10, tem-se as eficiências de remoção de DQO exclusivamente pela rota sulfetogênica de todas as fases de operação, obtidas pela utilização da Eq. (5).

$$\frac{[SO_4^{2-}]_e \times 0,67}{[DQO]_e} \quad (5)$$

Em que  $[SO_4^{2-}]_e$  é a concentração de sulfato removida e  $[DQO]_e$  é a concentração de DQO removida.

Figura 10 - Contribuição da sulfetogênese na remoção de DQO



FONTE: Autor (2021).

É possível observar na Figura 8 que na fase F5 R2,0, a maior parte da DQO removida não foi causada pela ação das BRS, ou seja, as arqueias metanogênicas presentes no meio podem ter predominado na competição com as BRS pelo substrato disponível, causando uma menor redução de sulfato nessa fase.

Outro fato importante a ser observado é o resultado obtido nas fases F4 F4200 e F4 Fe400. A baixa eficiência de remoção por sulfetogênese nessas fases se deve à alta concentração de ferro no meio. Com isso, boa parte da DQO pode ter sido removida utilizando o ferro como receptor de elétrons, fazendo com que a eficiência de remoção por sulfetogênese fosse menor.

Analisando todos os dados obtidos, pode-se tirar algumas conclusões de acordo com os resultados de remoção de DQO e sulfato e com a evolução das fases de operação dos reatores. Vale destacar a alta robustez observada pelo lodo metanogênico. Uma vez que, durante toda operação dos reatores, todo lodo era misturado ao final de cada fase e redistribuído para os reatores a serem utilizados na fase seguinte, apesar da exposição do lodo a diferentes doadores de elétrons, concentrações de sulfato e ferro e razões distintas de DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$ , a comunidade microbiana presente nele não foi impactada. Pelo contrário, quando encontrava boas condições (1500mg/L de DQO, 1500mg/L de sulfato, 100mg/L de ferro e DQO/  $\text{SO}_4^{2-}$  de 1,0), o lodo empregado atingia resultados satisfatórios.

Esse fato indica que o lodo metanogênico utilizado no presente estudo, após se adaptar a uma condição adequada de operação, mesmo em condições distintas e adversas e mesmo sendo um lodo não adaptado às condições sulfetogênicas, pode ser empregado para tratamento de drenagem ácida de mina.

Outro fator relevante é que o soro de leite se mostrou um substrato complexo que permitiu a presença de vias fermentativas que resultaram em produtos facilmente assimilados pelas BRS como o lactato, que possuem maior disponibilidade de energia quando comparados a outros doadores de elétrons como etanol, propionato e acetato e, por isso, facilita a ação das BRS em relação à outros grupos microbianos (Santos *et al.*, 2021).

Em relação à carga de DQO e de sulfato removida em cada fase, obtida a partir da Eq. (12), os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Carga de DQO e Sulfato removidas em cada fase.

| <b>Fases</b> | <b>Carga DQO removida<br/>(mg/L.h)</b> | <b>Carga Sulfato removida<br/>(mg/L.h)</b> |
|--------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|
| F1           | 1,33±0,14                              | 0,78±0,28                                  |
| F2 Soro      | 4,80±0,09                              | 3,51±0,02                                  |
| F2 Esgoto    | 4,87±0,13                              | 3,25±0,05                                  |
| F2 Café      | 4,21±0,17                              | 2,11±0,13                                  |
| F3 S1500     | 3,90±0,11                              | 3,53±0,06                                  |
| F3 S2000     | 5,41±0,53                              | 2,96±0,07                                  |
| F3 S2500     | 6,90±0,09                              | 4,39±0,04                                  |
| F4 Fe100     | 3,77±0,16                              | 3,05±0,08                                  |
| F4 Fe200     | 3,73±0,08                              | 2,29±0,16                                  |
| F4 Fe400     | 3,40±0,01                              | 1,97±0,29                                  |
| F5 R0,67     | 2,58±0,23                              | 2,33±0,24                                  |
| F5 R1,0      | 1,40±0,03                              | 1,88±0,14                                  |
| F5 R2,0      | 3,44±0,23                              | 1,95±0,16                                  |

FONTE: Autor (2021)

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, pode-se observar que a Fase 1 realmente não apresentou grandes resultados de remoção olhando para as cargas. A carga de DQO removida nessa fase não poderia ser alta uma vez que não foi adicionada nenhuma fonte externa de matéria orgânica e, conseqüentemente, a carga removida de sulfato pelas BRS também foi baixa, devido à falta de doadores de elétrons no meio.

Na Fase 2, para a carga de DQO removida, nota-se que as fases F2 Soro e F2 Esgoto não tiveram diferença considerando os desvios apresentados. Além disso, a fase F2 Café apresentou remoção abaixo das demais condições. Porém, em relação à carga de sulfato removida na Fase 2, a fase F2 Soro apresentou maior remoção de carga de sulfato, considerando os desvios. Isso aponta, mais uma vez, a melhor atividade das BRS quando o soro foi utilizado como doador de elétrons.

Na Fase 3, embora as análises envolvendo concentração inicial e final tenham apontado que a fase F3 S1500 obteve resultados de remoção superiores estatisticamente em relação as demais, podemos observar que em termos de carga, a fase F3S2500 foi a que conseguiu remover a maior quantidade. Visto isso, um estudo que pode ser realizado a fim de observar melhor os resultados de remoção de sulfato e DQO em reatores com maiores concentrações de sulfato, é aumentar o tempo de operação dos reatores para analisar se os resultados apresentados nesse trabalho se mantêm ou se, com maiores tempos, as remoções de DQO e sulfato conseguem atingir níveis altos como foi atingido em concentrações de sulfato mais baixas.

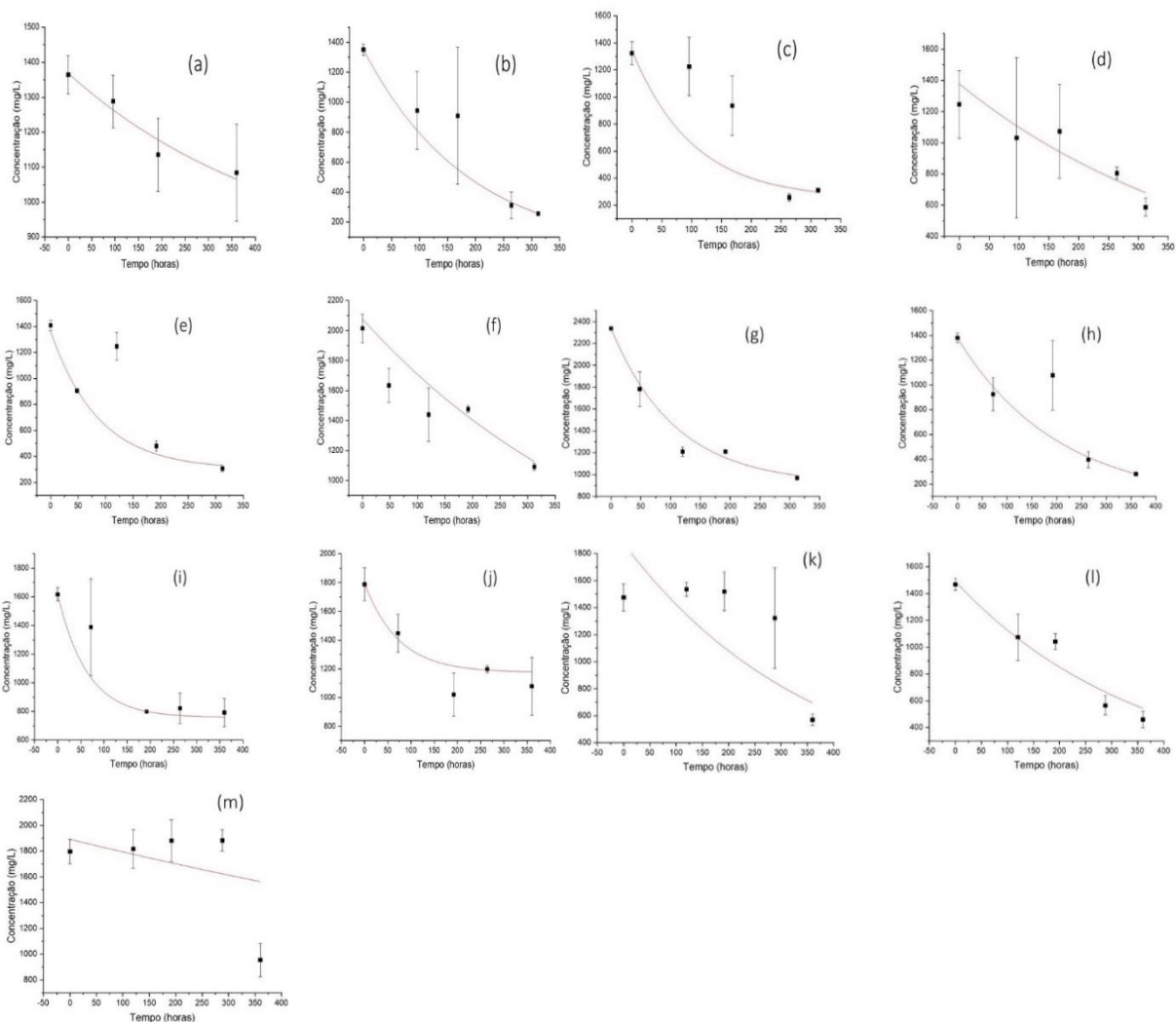
Na Fase 4, os resultados envolvendo carga não se diferiram muito dos resultados envolvendo concentração, mantendo a fase F4 Fe100 como a que obteve melhores resultados, e na Fase 5, em relação à carga de DQO removida, consegue-se observar que a fase F5 R2 que continha 3000 mg/L de DQO obteve a maior carga removida mesmo com a menor eficiência de remoção dentre todas as condições testadas na Fase 5 e a fase F5 R0,67, que continha 1000mg/L de DQO obteve a menor carga removida, como esperado.

Em relação à remoção de sulfato, os resultados de carga removida apontaram maior remoção para a fase F5 R1, seguida por um empate entre as outras duas fases, considerando o desvio.

### 3.2 Análise Cinética

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para os ajustes não lineares para remoção de sulfato realizados em todas as fases de operação.

Figura 11 – Gráficos de Perfil Temporal de remoção de sulfato de cada fase estudada. (a) F1, (b) F2 Soro, (c) F2 Esgoto, (d) F2 Café, (e) F3 S1500, (f) F3 S2000, (g) F3 S2500, (h) F4 Fe100, (i) F4 Fe200, (j) F4 Fe400, (k) F5 R0,67, (l) F5 R1,0, (m) F5 R2,0.



FONTE: Autor (2021).

A Tabela 5 apresenta os resultados numéricos dos parâmetros obtidos no ajuste temporal. Pode-se observar nessa Tabela que as fases F2 Esgoto, F2 Café, F5 R0,67 e F5 R2,0, os ajustes das curvas não tiveram bons valores de  $R^2$ , devido à diferença entre os dados experimentais e a curva característica da equação de ajuste.

Com isso, os valores de velocidade de reação e sulfato residual para essas fases não devem ser levados em consideração.

Tabela 5 - Parâmetros Cinéticos de cada fase.

| Fases     | S <sub>0</sub> (mg/L) | S <sub>SR</sub> (mg/L) | K <sub>ap</sub> (h <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> |
|-----------|-----------------------|------------------------|------------------------------------|----------------|
| F1        | 1368,47±29,76         | 803,71±14,91           | 0,002±0,001                        | 0,95           |
| F2 Soro   | 1352,19±25,15         | 0,00±0,0,00            | 0,005±0,003                        | 0,99           |
| F2 Esgoto | 1346,81±260,67        | 247,3±211,13           | 0,009±0,001                        | 0,89           |
| F2 Café   | 1377,88±325,97        | 0,00±0,00              | 0,008±0,002                        | 0,72           |
| F3 S1500  | 1362,00±188,22        | 301,99±129,95          | 0,012±0,005                        | 0,95           |
| F3 S2000  | 2077,27±225,27        | 0,00±0,00              | 0,003±0,002                        | 0,93           |
| F3 S2500  | 2336,92±44,12         | 914,85±136,76          | 0,009±0,003                        | 0,99           |
| F4 Fe100  | 1378,25±50,77         | 274,56±54,56           | 0,005±0,003                        | 0,99           |
| F4 Fe200  | 1617,88±39,44         | 758,62±73,72           | 0,016±0,009                        | 0,99           |
| F4 Fe400  | 1794,21±119,51        | 1174,28±55,62          | 0,014±0,010                        | 0,93           |
| F5 R0,67  | 1876,88±486,81        | 0,00±0,00              | 0,007±0,003                        | 0,80           |
| F5 R1,0   | 1490,31±107,93        | 0,00±0,00              | 0,004±0,002                        | 0,95           |
| F5 R2,0   | 1892,29±389,56        | 0,00±0,00              | 0,005±0,003                        | 0,16           |

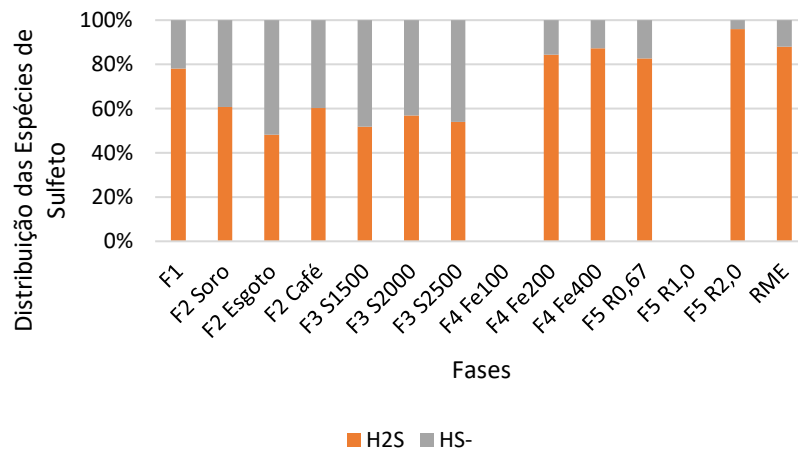
FONTE: Autor (2021).

Nota-se que nas fases com maior concentração de ferro (F4 Fe200 e F4 Fe400) os parâmetros de velocidade de reação K<sub>ap</sub> foram maiores, seguida pelas fases F3 S1500 e F3 S2500. Ao analisar a Figura 3, verifica-se que essas fases foram as únicas que apresentaram perfis com tendência de estabilização ao final do ensaio. Isso significa que o sulfato foi removido mais rapidamente do que nas outras fases alcançando a estabilização durante o período de estudo. Porém, pode-se observar que as fases F3 S2500, F4 Fe200 e F4 Fe400 apresentaram altas concentrações de sulfato residual, o que indica que, apesar de ter um consumo rápido do sulfato presente no meio, a eficiência nessas fases foi baixa.

Em relação as fases com maiores concentrações de ferro, as maiores velocidades de reação podem ser explicadas pelo fato de que, na presença de metais, o equilíbrio é deslocado para a precipitação e, consequentemente, há maior consumo de sulfato inicialmente.

A partir da análise do sulfeto total dissolvido (Tabela 2), pôde-se analisar a distribuição das espécies de sulfeto em cada fase. Uma vez que o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é predominante em pHs baixos e o hidrogenossulfeto (HS<sup>-</sup>) em ambientes alcalinos, utilizou-se as Eqs. (2) e (3) e um pK igual a 6,9, considerando que todas as fases foram realizadas a 30°C e 1 atm. As porcentagens de cada uma das espécies apresentadas, estão dispostas na Figura 12.

Figura 12 - Porcentagens de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e o hidrogenossulfeto ( $HS^-$ ) nos efluentes de cada fase estudada



FONTE: Autor (2021).

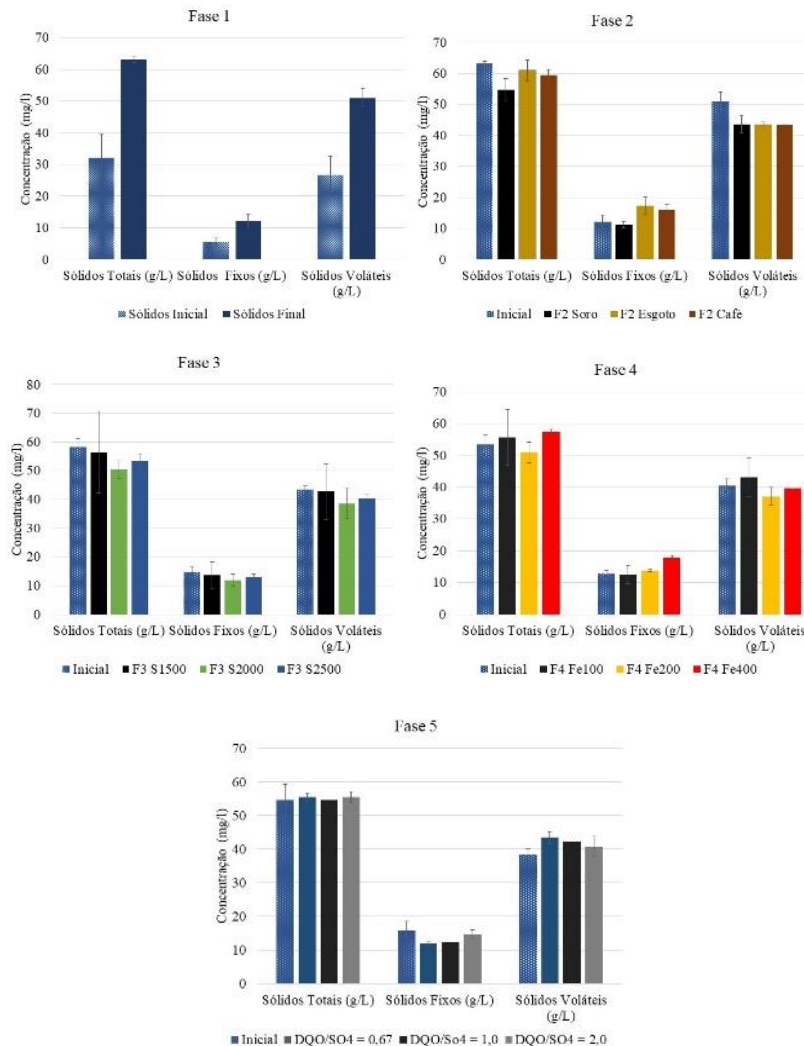
Ressalta-se que as fases F4Fe100 e F5R1,0 apresentaram concentração de sulfeto inferior ao limite de detecção do método empregado. Observa-se que, os reatores com menores valores de pH final, como nas fases F1, F4 Fe200, F4 Fe400, F5 R0,67 e F5 R2,0 apresentaram predominância de  $H_2S$  no meio. Isso se deve ao fato de que, nessas fases, os valores de pH finais ficaram abaixo do pK de 6,9 e, portanto, contribuíram para a prevalência do sulfeto de hidrogênio no meio.

A predominância do sulfeto de hidrogênio no meio causa toxicidade aos microrganismos presentes, pois impossibilita a passagem dos nutrientes até as células (Pol *et al.* 1998). Portanto, nessas fases, a atividade das BRS pode ter sido prejudicada, devido à toxicidade causada pela predominância de sulfeto na forma de  $H_2S$  e, por isso, essas fases citadas apresentaram valores de remoção de sulfato baixas. Isso confirma a necessidade de se alcançar pH próximo ao neutro nos sistemas de tratamento da DAM. Primeiro para que o descarte não prejudique o meio ambiente e também para que essa alteração no meio não prejudique o metabolismo das BRS promovendo assim melhores eficiências de remoção.

### 3.3 Análise de sólidos

A Figura 13 apresenta os resultados de análise de sólidos fixos, voláteis e totais, iniciais e finais para todas as fases do projeto.

Figura 13 - Resultado das análises de sólidos totais, sólidos fixos e sólidos voláteis



FONTE: Autor (2021)

Nota-se que na Fase 1, ocorreu um acréscimo de 96% de sólidos totais, 123% de sólidos fixos e 90% de sólidos voláteis. Isso se deu pelo fato de o lodo estar há muito tempo sem ação e, com isso, quando foi reativado com DAM, ocorreu um grande aumento nos sólidos.

Na Fase 2, observou-se uma estabilização do lodo. Com as bactérias já adaptadas ao meio por mais de 15 dias, não ocorreu aumento na concentração de sólidos no reator.

Na Fase 3, é importante ressaltar que mesmo com o aumento na concentração de sulfato nas fases F3 S2000 e F3 S2500, os sólidos voláteis se mantiveram bem próximos à concentração de sólidos iniciais, indicando que não houve crescimento microbiano considerável e nem perda celular devido ao aumento de sulfato no meio.

Na Fase 4, notou-se que a concentração de sólidos totais e fixos da fase F4 Fe400 aumentou em relação aos sólidos iniciais. Isso pode ser explicado pela concentração maior de ferro inicial nessa fase que, por consequência, teve uma maior quantidade precipitada, ajudando assim a aumentar o valor dos sólidos fixos e totais.

Na Fase 5, assim como nas Fases 3 e 4, não houve acréscimo nem decréscimo na concentração de sólidos.

Esses resultados confirmam que, quando comparado à Fase estritamente anterior, não ocorreu mudanças grandes na composição do lodo, mas se comparar o lodo utilizado na Fase 1 com o utilizado na Fase 5, pode-se

observar que ocorreu uma queda na composição de sólidos totais e voláteis de 12% e 15%, respectivamente, confirmando que ocorreu um estresse metabólico nas bactérias ao decorrer do estudo.

## 4 Conclusão

Destaca-se que em concentrações altas de metais, como ferro, o pH do meio tende a não atingir a neutralidade, sendo necessário utilizar um sistema muito eficiente que consiga remover o sulfato do meio de tal forma que altas concentrações de bicarbonato sejam geradas no meio, neutralizando a ação dos íons  $H^+$ . Isso foi comprovado após as fases com 200 mg/L e 400mg/L de ferro inicial, obterem pH final de 6,17 e 6,06, respectivamente, sendo que a média de pH final de todas as outras fases foi de 6,61, excluindo a Fase F5 R2,0.

A condição empregando 1500mg/L de soro de leite, razão DQO/  $SO_4^{2-}$  igual a 1 e 100mg/L de ferro, foi a melhor condição para o tratamento da DAM no presente estudo (chegando a atingir 92% e 81% de eficiência de remoção de DQO e sulfato, respectivamente).

Vale destacar a robustez do lodo utilizado como fator de extrema relevância. Mesmo submetido a diferentes condições operacionais, a comunidade microbiana presente no lodo foi capaz de atuar metabolicamente. Isso mostra que mesmo em situações adversas de substratos e concentrações, o lodo consegue atingir sua atividade ideal de forma rápida quando encontra condições propícias e favoráveis para o crescimento e manutenção das populações desejadas.

Observou-se que nos reatores com menores valores de pH final, como nas fases F1, F4 Fe200, F4 Fe400, F5 R0,67 e F5 R2,0, além da fase RMV, ocorreu predominância de  $H_2S$  no meio e isso pode ter causado toxicidade às BRS, sendo mais um ponto que explica os baixos valores de remoção de sulfato nessas fases.

Para trabalhos futuros, sugere-se testar outras fontes de carbono in natura, mas com aplicação de algum pré-tratamento que favoreça melhor acesso dos microrganismos ao substrato. Além disso, recomenda-se empregar mecanismos de agitação para que o substrato se torne mais disponível.

## Referências

- APHA. (2012). *Standard Methods for the examination for water and wastewater*. American Public Health Association, 22th ed. New York.
- Callado, N.H. (2001). *Reatores sequenciais em batelada em sistema anaeróbio/aeróbio tratando esgoto sanitário sintético e com remoção de nutrientes*. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP.
- Cao, J.; ZHANG, g.; MAO, Z.; FANG, Z.; YANG, C. (2009). Precipitation of valuable metals from bioleaching solution by biogenic sulfides. *Minerals Engineering*, v. 22, p. 289 – 295.
- Camargo, E. F. M. & Ratusznei, S. M. & Rodrigues, J. A. D. & Zaiat, M. & Borzani, W. (2002). Treatment of low-strength wastewater using immobilized biomass in a sequencing batch external loop reactor: Influence of the medium superficial velocity on the stability and performance. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 3, p. 267-275.
- Campos-Vega, R. & Larca-Piña, G. & Vergara-Catañeda, H. & Oomah, B.D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology* 45, p. 24-36.
- Costa, M. C. *et al.* (2009). Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage. *Chemosphere*, v. 75, n. 6, p. 831–836.
- Costa, J. M. (2017). *Remoção de sulfato e metais presentes na drenagem ácida de mina utilizando reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG.
- Costa, J. M. & Verola, L. M. & Braga, J. K. & Rodriguez, R. P. & Sancinetti, G. P. (2020). Biologic removal of sulfate from acid mine drainage in an anaerobic sequencing batch reactor: Temperature and inoculum origin effects on the startup operation. *Journal of Water Process Engineering*.

- Cunha, M. P. & Ferraz, R. M. & Sancinetti, G. P. & Rodriguez, R. P. (2018). Long-term performance of a UASB reactor treating acid mine drainage: effects of sulfate loading rate, hydraulic retention time, and COD/SseO4<sup>2-</sup> ratio. *Biodegradation*.
- Dev, S. & Patra, A. K. & Mukherjee, A. & Bhattacharya, J. (2015). Suitability of different growth substrates as source of nitrogen for sulfate reducing bacteria. *Biodegradation*, v. 26, n. 6, p. 415–430.
- Guo, J. & Kang, Y. & Feng, Y. (2017). Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. *Journal of Environmental Management*, v. 203, p. 278–285.
- Hussain, A. & Hasan, A. & Javid, A. & Qazi, J. I. (2016). Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. *3 Biotech*, v. 6, n. 119, p. 1–10.
- Jiménez-Rodríguez, A.M. & Duran-Barrantes, M.M. & Borjas, R. & Sanchez, E. (2009). Biological sulphate removal in acid mine drainage using anaerobic fixed bed reactors with cheese whey as carbon source. *Latin American Applied Research*, v. 40, p. 329-335.
- Lau, G.N. & Sharma, K.R. & Chen, G.H. & Van Loosdrecht, M.C.M. (2006). Integration of sulphate reduction, autotrophic denitrification and nitrification to achieve low-cost excess sludge minimization for Hong Kong sewage. *Water Science & Technology*, v.53 No 3 pp 227–235.
- Liamleam, W. & Annachhatre, A. P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 452-463.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. & Bender, K. & Buckley, D. H. & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock. Artmed*, v.14, p. 960.
- Mello, J. W. V. & Duarte, H. A. & Ladeira, A. C. Q. (2014). Origem e Controle do Fenômeno Drenagem Ácida de Mina. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 8: 24-29.
- Muyzer, G. & Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews - Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 441–454.
- Ribeiro, M. I. V.O. & Braga, J. K. & Rodriguez, R. P. & Sancinetti, G. P. (2020). Effects of Hydraulic Retention Time, COD/SO4<sup>2-</sup> Ratio, Influent Iron Concentration, and Sulfate Kinetics on Treatment of a Synthetic Acid Mine Drainage. *Mine Water and the Environment*.
- Sampaio, G.P. (2015). *Tratamento de água residuária ácida proveniente de mina utilizando soro de leite como doador de elétrons*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG.
- Sani, R.K. & Geesey, G. & Peyton, B.M. (2001). Assessment of lead toxicity to *Desulfovibrio desulfuricans* G20: influence of components of Lactate Cmedium. *Adv. Environ. Res.* 5 p. 269–276.
- Santos, A. M. & Costa, J. M. & Braga, J. K. & Flynn, T. M. & Brucha, G. & Sancinetti, G. P. & Rodriguez, R. P. (2021). Lactate as an effective electron donor in the sulfate reduction: impacts on the microbial diversity. *Environmental Technology*, 1–12.
- Serrano, A. & Astals, M.P.S. & Villa-Gómez, D.K. (2020). Batch assays for biological sulfate-reduction: a review towards a standardized protocol. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.50:12, p.1195-1223.
- Sheoran, A.S. & Sheoran, V. & Choudhary, R.P. (2010). Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. *Minerals Engineering*.v.23, p. 1073-1100.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins – from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 695-704.
- Tang K. & Baskaran, V. & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulfur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 73-94.
- Vieira, B.F. & Couto, P.T. & Sancinetti, G.P. & Klein, B. & Van Zyl, D. & Rodriguez, R.P. (2016). The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic process in anaerobic reactor. *J Environ Sci Health A* v.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se tirar algumas conclusões em relação às condições de operação estudadas e as respostas geradas pelo sistema.

Primeiro, destaca-se que em concentrações altas de metais, como ferro, o pH do meio tende a não atingir a neutralidade, sendo necessário utilizar um sistema muito eficiente que consiga remover o sulfato do meio de tal forma que altas concentrações de bicarbonato sejam geradas no meio, neutralizando a ação dos íons  $H^+$ . Isso foi comprovado após as fases com 200 mg/L e 400mg/L de ferro inicial, obterem pH final de 6,17 e 6,06, respectivamente, sendo que a média de pH final de todas as outras fases foi de 6,61, excluindo a Fase F5 R2,0.

Outro ponto a se destacar é o fato de que doadores de elétrons naturais, precisam passar por algum processo que facilite a utilização deles pelas BRS, como foi o caso da borra de café no presente estudo. Como o substrato utilizado não ficou totalmente dissolvido no meio, a ação das bactérias pode ter sido prejudicada e, com isso, os resultados de eficiência de remoção não foram satisfatórios (82% e 52% para DQO e sulfato, respectivamente).

A condição empregando 1500mg/L de soro de leite, razão DQO/  $SO_4^{2-}$  igual a 1 e 100mg/L de ferro, foi a melhor condição para o tratamento da DAM no presente estudo (chegando a atingir 92% e 81% de eficiência de remoção de DQO e sulfato, respectivamente).

Vale destacar a robustez do lodo utilizado como fator de extrema relevância. Mesmo submetido a diferentes condições operacionais, a comunidade microbiana presente no lodo foi capaz de atuar metabolicamente. Isso mostra que mesmo em situações adversas de substratos e concentrações, o lodo consegue atingir sua atividade ideal de forma rápida quando encontra condições propícias e favoráveis para o crescimento e manutenção das populações desejadas.

Provavelmente, a ausência de agitação do meio prejudicou o ensaio com maior volume reacional (RME), menor contato do inoculo com o substrato pode ter propiciado menores eficiências de remoção tanto de DQO quanto de sulfato, comparado com os reatores com menores volumes.

Observou-se que nos reatores com menores valores de pH final, como nas fases F1, F4 Fe200, F4 Fe400, F5 R0,67 e F5 R2,0, além da fase RMV, ocorreu predominância de  $H_2S$  no meio e isso pode ter causado toxicidade às BRS, sendo mais um ponto que explica os baixos valores de remoção de sulfato nessas fases.

Para trabalhos futuros, sugere-se testar outras fontes de carbono in natura, mas com aplicação de algum pré-tratamento que favoreça melhor acesso dos microrganismos ao substrato. Além disso, recomenda-se empregar mecanismos de agitação para que o substrato se torne mais disponível.

## REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the examination for water and wastewater**. 22th ed. New York. 2012.

BORMA, L. S.; SOARES, P. S. M. Drenagem ácida e gestão de resíduos sólidos de mineração. In: TRINDADES, B. E.; BARBOSA FILHO, O. **Extração de ouro - Princípios, tecnologias e meio ambiente**. Centro de Tecnologia Mineral. Rio de Janeiro, cap. 10, p. 243-266, 2002

CALLADO, N.H. **Reatores sequenciais em batelada em sistema anaeróbio/aeróbio tratando esgoto sanitário sintético e com remoção de nutrientes**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP. 2001

CAMARGO, E. F. M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. Treatment of low-strength wastewater using immobilized biomass in a sequencing batch external loop reactor: Influence of the medium superficial velocity on the stability and performance. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 3, p. 267-275, 2002.

CAMILOTI, P. R.; MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 2014.

CAMPOS-VEGA, R., LOARCA-PIÑA, G., VERGARA-CASTAÑEDA, H., OOMAH, B.D. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology** v.45, p. 24-36, 2015.

CANFIELD, D.E. The evolution of the Earth surface sulfur reservoir. **American Journal of Science**, v. 304, p. 839-861, 2004.

CELIS-GARCIA, L.B.; RAZO-FLORES, E.; MONROY, O. Performance of a down-flow fluidized-bed reactor under sulfate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, p.771-779, 2007.

CHEN, T., WANG, J., JIN, X., YUE, Z. Goethite-enhanced anaerobic bio-decomposition of sulfate minerals. **Frontiers of Earth Science in China**, v. 4(2), p. 160–166, 2010

CHERNICHARO, C.A.L.; **Anaerobic reactors**. 1 ed. London: IWA Publishing, 2007.

COSTA, J. M. **Remoção de sulfato e metais presentes na drenagem ácida de mina utilizando reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

COSTA, M. C. *et al.* Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage. **Chemosphere**, v. 75, n. 6, p. 831–836, 2009.

- COSTA, J. M., VEROLA, L. M., BRAGA, J. K., ROFRIGUEZ, R. P., SANCINETTI, G. P. Biologic removal of sulfate from acid mine drainage in an anaerobic sequencing batch reactor: Temperature and inoculum origin effects on the startup operation. **Journal of Water Process Engineering**, 2020.
- DEV, S.; PATRA, A. K.; MUKHERJEE, A.; BHATTACHARYA, J. Suitability of different growth substrates as source of nitrogen for sulfate reducing bacteria. **Biodegradation**, v. 26, n. 6, p. 415–430, 2015.
- DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, L. 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.
- ELLIOT, P.; RAGUSA, S.; CATCHESIDE, D. Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in a upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. **Water Research**, v.32, n.12, p.3724-3730, 1998.
- ESPOSITO, G.; VEEKEN, A.; WEIJMA, J.; LENS, P.N.L. Use of biogenic sulfide for ZnS precipitation. **Separation and Purification Technology**, v., p.31-39, 2006.
- FANG, H. H. P., ZHOU, G. M. Anaerobic degradation of benzoate and cresol isomers in sulfate-rich wastewater. **Water Science and Technology**, v. 36(6–7), p. 7–14, 1997.
- FIKE, D. A.; BRADLEY, A. S.; ROSE, C. V. Rethinking the Ancient Sulfur Cycle. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v.43(1), p.593–622, 2015.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L., PERALTA-VIDEA, J.R., ROSA, G.D., PARSONOS, J.G. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. **Coord. Chem. Rev.**, v. 249(17-18), p. 1797-1810, 2005.
- GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p. 1644–1652, 2015.
- 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.
- GUO, J.; KANG, Y.; FENG, Y. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 278–285, 2017.
- HANSEN, T.A. Metabolism of sulphate-reducing prokaryotes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, p. 165-185, 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.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUSSAIN, A.; HASAN, A.; JAVID, A.; QAZI, J. I. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. **3 Biotech**, v. 6, n. 119, p. 1–10, 2016.

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

JOHNSON, D.B.; SEN, A.M.; KIMURA, S.; ROWE, O.F.; HALLBERG, K.B. Novel biosulfidogenic system for selective recovery of metals from acidic leach liquors and waste streams. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy**, v.115, p.19-24, 2006.

KAKSONEN, A.H.; FRANZMANN, P.D.; PUHAKKA, J.A. Performance and ethanol oxidation kinetics of sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. **Biodegradation**, v.14, p.207-217, 2003

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**, v.7, p.541-564, 2007

KEFENI, K.K.; MSAGATI, T.A.M.; MAMBA, B.B. Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 151, p. 474-493, 2017.

KEFENI, K. K.; MSAGATI, T. M.; MAREE, J. P.; MAMBA, B. B. Metals and sulphate removal from acid mine drainage in two steps via ferrite sludge and barium sulphate formation. **Minerals Engineering**, v. 81, p. 79–87, 2015.

LADEIRA, A. C. Q.; DUARTE, H. A.; MELLO, J. W. V. Origem e Controle do Fenômeno Drenagem Ácida de Mina. **Química Nova**, n. 8, p. 24-29, 2014.

LAU, G.N, SHARMA, K.R., CHEN, G.H., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Integration of sulphate reduction, autotrophic denitrification and nitrification to achieve low-cost excess sludge minimization for Hong Kong sewage. **Water Science & Technology** Vol 53 No 3 pp 227–235, 2006.

LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSSEN, A.J.H.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.28, n.1, p.41-88, 1998.

LEWIS, A.M., Review of metal sulphide precipitation. **Hydrometallurgy**, v.104, p.222-234, 2010

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 452-463. 2007.

LIU, Z.; MASZENAN, A. M.; LIU, Y.; NG, W. J. A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 10, p. 2799–2807, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, v.14, 2016.

MELLO, J. W. V.; DUARTE, H. A.; LADEIRA, A. C. Q. Origem e Controle do Fenômeno Drenagem Ácida de Mina. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 8: 24-29, 2014.

MUCHIE, M.; AKPOR, O. B. Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems: processes and applications. **International Journal of the Physical Sciences**, v. 5, 12, p. 1807-1817, 2010.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008.

NAGPAL, S. *et al.* Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: An experimental and modeling study. **Biotechnology and bioengineering, Wiley Online Library**, v. 70, n. 5, p. 533–543, 2000.

NAJIB, T., SOLGI, M., FARAZMAND, A., HEYDARIAN, S. M., NASERNEJAD, B. Optimization of sulfate removal by sulfate reducing bacteria using response surface methodology and heavy metal removal in a sulfidogenic UASB reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5(4), p. 3256–3265, 2017.

RABUS, R.; VENCESLAU, S. S.; WÖHLBRAND, L.; VOORDOUW, G.; WALL, J. D.; PEREIRA, I. A. C. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 66, p. 55–321, 2015.

RASOL, R. M., NOOR, N. M., MAT, M.D. **Effect of temperature in SRB growth for oil and gas pipeline**. Conference: International Conference on Computer Engineering & Mathematical Sciences (ICCEMS 2014)., 2015.

RIBEIRO, M. I. V.O, BRAGA, J. K., RODRIGUEZ, R. P., SANCINETTI, G. P. Effects of Hydraulic Retention Time, COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Ratio, Influent Iron Concentration, and Sulfate Kinetics on Treatment of a Synthetic Acid Mine Drainage. **Mine Water and the Environment**, 2020.

RODRIGUEZ, R.P.; OLIVEIRA, G.H.D.; RAIMUNDI, I.M.; ZAIAT, M. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.74, p.48-53, 2012

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.

ROBINSON-LORA, M. A.; BRENNAN, R. A. Efficient metal removal and neutralization of acid mine drainage by crab-shell chitin under batch and continuous-flow conditions. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5063–5071, 2009.

SAHINKAYA, E.; OZKAYA, B.; KAKSONEN, A.H., PUHAKKA, J.A. Sulfidogenic fluidized-bed treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.96, n.6, p.1064-1072, 2007

SANCHEZ-ANDREA, I.; SANZ, J.L.; BIJMANS, M.F.M.; STAMS, A.M.J. Sulphate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v.269, p.98-109, 2014.

SANTOS, A. M., COSTA, J. M., BRAGA, J. K., FLYNN, T. M., BRUCHA, G., SANCINETTI, G. P., RODRIGUEZ, R. P. Lactate as an effective electron donor in the sulfate reduction: impacts on the microbial diversity. **Environmental Technology**, 1–12. 2021

SERRANO, A., ASTALS, M.P.S., VILLA-GÓMEZ, D.K. Batch assays for biological sulfate-reduction: a review towards a standardized protocol, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.50:12, p.1195-1223, 2020

SIERRA-ALVAREZ, R.; HOLLINGSWORTH, J.; ZHOU, M.S. Removal of copper in an integrated sulfate reducing bioreactor-crystallization reactor system. **Environmental Science and Technology**, v.41, n.4, p.1426-1431, 2007.

SKOUSEN, J., ZIPPER, C.E., ROSE, A., ZIEMKIEWICZ, P.F., MCDONALD, L.M., KLEINMANN, R.L. Review of Passive Systems for Acid Mine Drainage Treatment. **Mine Water Environ**, 2017.

STADNITSKAIA, A.; MUYZER, G.; ABBAS, B.; COOLEN, M.J.L.; HOPMANS, M.; BAAS, M; VAN WEERING, T.C.E.; IVANOV, M.K.; POLUDETkina, E.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S. Biomarker and 16S rDNA evidence for anaerobic oxidation of methane and related carbonate precipitation in deep-sea mud volcanoes of the Sorokin Trough Black Sea. **Mar. Geol.** v.217, p.67–96. 2005.

STAMS, A. J., HUISMAN, J., ENCINA, P. A. G., MUYZER, G. Citric acid wastewater as electron donor for biological sulfate reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83(5), p. 957–963, 2009.

TANG K.; BASKARAN, V.; NEMATl, M. Bacteria of the sulfur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 73-94, 2009.

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

VILLA-GOMEZ, D.; ABABNEH, H.; PAPIRIO, S.; ROUSSEAU, D.P.L.; LENS, P.N.L. Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inversed fluidized bed reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v.192, p.200-207, 2011

WEBSTER, G.; WATT, L. C.; RINNA, J.; FRY, J. C.; EVERSLED, R. P.; PARKERS, R. J.; WEIGHTMAN, A. J. A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. **Environmental Microbiology**, v. 8(9), p. 1575–1589. 2006

XINGYU, L.; GANG, Z.; XIAOQUIANG, W.; LAICHANG, Z.; JIANKANG, W.; RENAMAN, R.; DIANZUO, W. A novel low pH sulfidogenic bioreactor using activated sludge as carbon source to treat acid mine drainage (AMD) and recovery metal sulfides: **Pilot scale study. Minerals Engineering**, v.48, p.51-55, 2013.

ZHOU, J.; XING, J. Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors. **Biochemical Engineering Journal**, v.96, p.14-22, 2015.