MIRABELLE PEROSI CUNHA

Aplicação do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) na remoção de sulfato e precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de mina (DAM)

São Carlos

2020

MIRABELLE PEROSSO CUNHA

Aplicação do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) na remoção de sulfato e precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de mina (DAM)

Tese apresentada à escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Tit. Dr. Marcelo Zaiat

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Piacentini Rodriguez

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

C972a Cunha, Mirabelle Perossi
Aplicação do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) na remoção de sulfato e precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de mina (DAM) / Mirabelle Perossi Cunha; orientador Marcelo Zaiat; coorientadora Renata Piacentini Rodriguez. São Carlos, 2020.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Sulfetogênese. 2. Biorremediação. 3. Sulfetos Metálicos. 4. Metais Raros. 5. Cobalto. 6. Gálio. 7. Germânio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **MIRABELLE PEROSSO CUNHA.**

Título da tese: "Aplicação do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) na remoção de sulfato e precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de mina (DAM)".

Data da defesa: 17/07/2020.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Prof. Dr. **Theo Syrto Octavio de Souza**
(Escola Politécnica/EP-USP)

Aprovada

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)

Aprovada

Profa. Dra. **Iolanda Cristina Silveira Duarte**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Dra. **Priscila Rossetto Camiloti**
(Ergostech Renewal Energy Solutions)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendonço**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

*Dedico esta tese à minha mãe (em memória)
e a meu pai, meu porto seguro,
por todo carinho e
amor imensurável.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e por nunca me desamparar quaisquer fossem os momentos, bons ou ruins.

À minha família, meu pai, irmãos e cunhadas, por toda paciência e sempre fazerem o possível e impossível para me verem bem e feliz. Em especial, minha mãe, que apesar de não estar mais entre nós, sempre senti sua presença em todos os momentos e muitas vezes foi meu motivo de força para continuar quando o desânimo tomava conta.

A meus orientadores do Brasil, Renata e Marcelo. Renata, se não fosse você acreditar em mim mais do que eu mesma, jamais teria chegado onde cheguei, obrigada por ter sido minha guia esses últimos anos e por toda a amizade desde a iniciação científica. Zaiat, que orgulho eu sinto de ter feito parte do seu time, obrigada por me acolher e mostrar o mundo, literalmente e como ele realmente é! Com certeza eu não sou a mesma de quando entrei nesse doutorado, sou muito melhor, pessoalmente e profissionalmente. Obrigada aos dois por honrarem a missão de orientadores e professores, vocês são maravilhosos!

Ao professor Piet Lens que me orientou na última etapa experimental lá em Galway, na Irlanda, e que me proporcionou uma experiência maravilhosa, única e imensurável!

Aos professores Eugênio Foresti, Márcia, Maria Bernadete, Vitor e Wiclef pelos momentos compartilhados com boas conversas regada de muito conhecimento e sabedoria.

Aos membros da banca de defesa, Theo, Priscila, Iolanda e Simone, que dispuseram de um tempo para ler meu trabalho cuidadosamente e contribuir cientificamente. Obrigada também pelo maravilhoso momento que passamos todos juntos, mesmo que de forma remota no nosso novo normal de pandemia.

Às minhas tias, tios, primos e agregados por todo apoio e amor. E também às crianças por me proporcionarem os sorrisos mais sinceros e mostrarem que o dia a dia pode ser mais leve.

Às meninas de “Poços”, Paula e Jéssica, que apesar da distância diária, sempre se fizeram presente. E a querida Patty, por toda atenção e cuidado, sempre e em todos os momentos da minha vida. Patty, seus conselhos sempre me deram forças para continuar em frente, muito obrigada!

Obrigada também a Pam e a Elis, parceiras de doutorado e da vida, que sempre fizeram de tudo para que eu ficasse melhor nos momentos de desânimo. Agradeço cada ligação por Whatsapp e jantares com pão com ovo ou macarrão com brócolis, regados sempre

de muita risada e momentos inesquecíveis. Vocês moram no meu coração, só desejo melhor pra vocês!

À Manu e a Laís, que embora fôssemos totalmente diferentes, compartilhávamos das mesmas aflições da vida. Foi muito bom ter vocês duas por perto me ajudando, acolhendo, dando colo e puxões de orelha quando necessários. Que a vida as surpreenda com o melhor e traga apenas felicidade e realizações pra vocês, meninas!

À Drica e a Rachel pela parceria especial e querida na segunda parte experimental do doutorado e que me lembraram o quanto é bom trabalhar em grupo mesmo quando tudo dá errado e tem que refazer todo o experimento. (Roniete manda lembranças!!! Hahaha)

À Cris e Carol, as cabritas, melhores parceiras de lojinhas e gordices. Desejo muita sorte e sucesso pra vocês, meninas!

À Camila, Vivian e Renata, as mamães do laboratório, grandes exemplos de determinação e garra de uma vida dúbia de filhos *versus* doutorado/pós doc.

À Fran, rainha dos memes, e o Henrique, o esposo da Colômbia, por todos os bons e alegres momentos comendo muita farofa vegetariana, torta de limão ou bebendo café. Sucesso e felicidade pra vocês, vizinhos!!

À Carla e o Leandro, parceiros do mau cheiro de sulfeto e exemplos de dedicação e seriedade para com a pesquisa.

Ao Lucas, por toda ajuda profissional e pessoal. Que a vida um dia te retribua tudo o que você faz pelos outros, foi uma honra ter aprendido e compartilhado a bancada da sala de análises com você!

Agradeço também aos meninos: Elias, ou melhor, Sr. Elias, o amigo pau pra toda obra e conselheiro. Guilherme, o GHDO, que muitas vezes tive vergonha de conversar e falar alguma besteira, mas que eu tenho uma admiração imensurável. Tiago, Tiaguinho, ou Cebola, o típico mineiro enrolado, mas que no fim faz tudo dar certo. Rodrigo, o mineiro de “Pódicarda”, especialista na degradação dos antibióticos com nomes estranhos e que conquistava todos os ICs.

Às meninas, a Mirian e a Natália, que talvez não façam ideia do quanto me ajudaram a passar por alguns perrengues durante o doutorado e que eu desejo tudo de melhor nessa vida.

Aos outros colegas de laboratório que embora talvez não tivesse tanto contato, contribuíam com um bom dia motivador, conversas produtivas e boas risadas na hora do café, festa junina, congressos e confraternizações, foram eles: Alana, Alejandra, Aline, Bruno Giz, Carol Granato, Carol Garcia, Fabrício, Felipe, Guilherme, Inaê, Inês, Jaque, Jámille, Jean,

Jenn, Lili, Luana, Lucas Maroubo, Luciana, Mara, Michael, Rafael, Rafaela, Raíssa, Maiara, Mariê, Marina, Tainá, Thaís, Vanessa, Willame, Williane.

À Carol e a Janja, técnicas dos laboratórios de análise e cromatografia, que nunca mediram esforços para me ajudar quando foi preciso, sem contar nas proveitosas conversas e conselhos sobre a vida.

À Bel e a Helô, técnicas da microbiologia, por todo suporte e ajuda.

À Sá e a Priscila por todo carinho e sempre estarem a disposição para ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

Ao Fernando e a Silvana, servidores da USP, e também as meninas da limpeza, Andréia e Fátima.

Aos amigos e colegas que fizeram parte da minha história na NUIG e Galway. Às conterrâneas brasileiras, Anna (companheira de gordices), Fabiana e Rachel, que sempre foram suporte nas horas de desânimo. À italianada animada e querida que fizeram meu intercâmbio muito melhor: Fabiano (o fofo), Paolo, Federica e Simone (casal companheiro que eu adoro), Martina, Francesco, Stéfano (o italiano mais mineiro que eu conheço) e a Laura. Aos espanhóis Borja (técnico querido) e Carlos. Agradeço também aos agregados e outros colegas do grupo de pesquisa: Ana Maria, Armando, Claribel, Yuchen, Chiara, Tania, Lea, Rosalia, Marcos, Natália, Juan, Flora, Alexia, Yaxue, Harish, George, Peyman, Jewel e Sudeshna.

Aos amigos que fiz no hostel, na primeira semana de Galway, causando um curto circuito com o adaptador universal (rs): Melissa e Adrien, o casal francês, e coreano Min Jin, que fizeram toda a diferença na minha chegada à Irlanda.

À minha família irlandesa, que me acolheu de braços abertos e sempre foi meu alicerce: Sandra, Robert e o querido Porthus, e o *housemate* italiano Gabriele. Foram tantos momentos maravilhosos na Irlanda e um crescimento pessoal e profissional tão imensurável que só tenho a agradecer e desejar tudo de melhor e mais maravilhoso que a vida possa oferecer a todos que fizeram parte dessa fase da minha vida. *Sláinte* meus amigos, sejam felizes! It was amazing!!!

À Bruna e o Hugo que me receberam de braços abertos quando voltei do intercâmbio e fizeram das minhas semanas muito melhores e mais felizes na fase final de escrita dessa tese. Obrigada por toda paciência e amizade.

À minha terapeuta Milena, que até hoje me ensina a ser uma pessoa melhor, me conhecendo, entendendo e compreendo melhor os outros e a mim mesma.

Agradeço em especial ao programa de pós-graduação em engenharia hidráulica e saneamento da USP São Carlos, ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Science Foundation Ireland (SFI - Irlanda) pelas bolsas concedidas e financiamento de toda a pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de mais esta etapa da minha vida, o meu muito obrigada!!

Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas.

Ayrton Senna

*“ (...)Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém*

*Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo*

Quem acredita sempre alcança...”

(Flavio Venturini / Renato Russo)

RESUMO

Cunha, M. P. **Aplicação do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) na remoção de sulfato e precipitação de metais provenientes de drenagem ácida de mina (DAM)**. 2020. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Indústrias de mineração sofrem com um grave problema ambiental que é a geração natural e incessante de águas ácidas ricas em sulfato e metais como consequência da oxidação dos minerais sulfetados, presentes nos rejeitos e estéréis de mineração, pela água da chuva. Esta água ácida gerada pelo intemperismo químico é chamada de drenagem ácida de mina (DAM) e, quando é descartada *in natura* nos corpos d'água, pode contaminar ou causar a morte de espécies aquáticas, bem como causar problemas de saúde nos seres humanos. A remediação desse passivo ambiental torna-se essencial e, nesse sentido, os processos anaeróbios, utilizando reatores biológicos, apresentam-se como a alternativa mais vantajosa por oferecer baixo custo, possibilitar a precipitação e posterior recuperação de metais, além da baixa geração de lodo (resíduos sólidos), quando comparados aos processos químicos. Nesse contexto, o objetivo principal dessa pesquisa foi avaliar o desempenho do reator anaeróbio de leito fixo estruturado, o AnSTBR, que tem como grande benefício a configuração do leito estruturado e fundo cônico que permite descartes de biomassa, prevenindo entupimentos e toxicidade durante sua operação, na biorremediação de DAM. Na primeira parte da pesquisa, o AnSTBR foi avaliado ao ser submetido à estratégia de adição gradual dos metais e nutrientes ao meio contendo DAM sintética, por um período total de 300 dias. Na segunda parte, o objetivo foi identificar se algum metal presente na DAM, utilizada na fase de operação do AnSTBR, influenciou diretamente a concentração de sulfato residual do efluente tratado por meio da utilização da metodologia estatística de planejamento experimental. Na terceira parte, avaliou-se a precipitação dos metais zinco, gálio e germânio, utilizando sulfeto de sódio e sulfeto biogênico a fim de comparação. Como conclusões, verificou-se que o AnSTBR foi satisfatório por remover sulfato e matéria orgânica (demanda química de oxigênio - DQO) no tratamento biológico da DAM sintética, tendo eficiências de remoção variando de 42 a 83% e 68 a 90%, para sulfato e DQO, respectivamente, para uma carga orgânica volumétrica (COV) e carga de sulfato volumétrica (CSV) iguais a $2,25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 16 h. Além disso, notou-se a seleção dos microrganismos de interesse no processo de remoção de sulfato ao comparar as amostras do inóculo (início da operação do AnSTBR) e das biomassa aderida na espuma e suspensa no leito, amostradas no último dia de operação do AnSTBR, pelo sequenciamento genético. Também foi possível verificar que o elemento cobalto foi importante para o estabelecimento da sulfetogênese na operação do AnSTBR, obtendo as menores concentrações de sulfato residual no efluente tratado e que a concentração para uma ótima minimização da concentração de sulfato residual no efluente foi a de 10 mg-Co L^{-1} . Em relação à precipitação de sulfetos metálicos de zinco, gálio e germânio, foi identificado uma significativa diferença visual nas partículas sedimentadas e suspensas nos experimentos, principalmente nas amostras com sulfeto biogênico, as quais apresentaram um precipitado marrom no fundo dos tubos falcon, indicando a possível precipitação dos metais. Entretanto, os estudos ainda apresentam desafios e adversidades que apontam para a necessidade de mais detalhes, principalmente dos metais raros, gálio e germânio.

Palavras-chave: Sulfetogênese. Biorremediação. Sulfetos metálicos. Metais raros. Cobalto. Gálio. Germânio.

ABSTRACT

Cunha, M. P. **Anaerobic structured-bed reactor (AnSTBR) applied to sulfate removal and metals precipitation from acid mine drainage (AMD)**. 2020. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Mining industries face a serious environmental problem, which is the natural and incessant generation of acidic waters rich in sulfate and metals, resulting from sulfide-mineral oxidation found in tailings and mining waste by rainwater. This acidic water generated by chemical weathering is called acid mine drainage (AMD) and when it is discarded *in natura* in water bodies, it can contaminate or lead to death of aquatic species and could cause health problems to humans. Remediating this environmental problem is essential. Anaerobic processes, using biological reactors, have been shown to be the most advantageous alternative as they are low cost, they enable precipitation and lead to recovery of metals. They also generate less sludge compared to chemical processes. Taking all this into account, in this research, the main objective was to evaluate the anaerobic structured-bed reactor (AnSTBR), which offers a major benefit of configuring the structured-bed and tapered bottom that allows biomass discharges, preventing clogging and toxicity during its operation in AMD bioremediation. In the first stage of the research, the AnSTBR was evaluated when adopting the strategy of gradually adding metals and nutrients present in the synthetic AMD for a total period of 300 days. In the second stage, the aim was to identify if any metal present in the AMD, used in the AnSTBR operation, directly influenced the residual sulfate concentration of the treated effluent using the statistical methodology of experimental planning. Moreover, in the third stage, the precipitation of the metals zinc, gallium and germanium was evaluated using sodium sulfide and biogenic sulfide for the sake of comparison. As conclusions, it was found that AnSTBR was satisfactory removing sulfate and organic matter (chemical oxygen demand - COD) in the biological synthetic AMD treatment, by removal efficiencies ranging from 42 to 83% and 68 to 90%, for sulfate and organic matter, respectively. The organic loading rate (OLR) and sulfate loading rate (SLR) was equal to $2.25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and the hydraulic retention time (TDH) of 16 h. In addition, selecting the microorganisms of interest in the sulfate removal process was noted when comparing the samples of the inoculum (beginning of the AnSTBR operation) and the biomass adhered to the foam and suspended in the bed reactor (sampled on the last day of AnSTBR operation) by genetic sequencing. It was also observed that the cobalt element was important for establishing sulfidogenesis in the AnSTBR operation, obtaining the lowest concentrations of residual sulfate in the treated effluent. The concentration for an optimal minimization of residual sulfate in the effluent identified was 10 mg-Co L^{-1} . Regarding the metal precipitation of zinc, gallium and germanium sulfides, a significant visual difference was observed in the sedimented and suspended particles in the experiments, mainly in the samples with biogenic sulfide, which showed a brown precipitate at the bottom of the falcon tubes, indicating possible metal precipitation. However, the studies still present challenges and adversities needing more details, especially of rare metals, gallium and germanium.

Keywords: Sulfidogenesis. Bioremediation. Metal sulfide. Rare metals. Cobalt. Gallium. Germanium

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição de diferentes drenagens ácidas de mina (DAM)- Brasil, Índia, Suécia e Espanha.....	38
Tabela 2- Trabalhos em que se utilizou o reator de leito fixo estruturado (AnSTBR) do ano de 2012 até 2019.....	48
Tabela 3- Composição (mg L^{-1}) do meio sintético simulando a drenagem ácida de mina (DAM) durante os 300 dias de operação do reator na Etapa 1.....	60
Tabela 4- Fatores e seus níveis codificados no planejamento experimental Plackett–Burman, Etapa 2A.	69
Tabela 5- Matriz com as concentrações dos metais adicionados no planejamento experimental Plackett–Burman, Etapa 2A.	69
Tabela 6- Volumes (mL) adicionados nos tubos falcon correspondentes à água Milli-Q, solução de sulfeto (químico e biológico) e solução estoque de metais (Zn, Ga, Ge) na Etapa 3.....	74
Tabela 7- Resultados obtidos nos 300 dias de operação do AnSTBR, dividido nas 5 fases operadas (Etapa 1).	79
Tabela 8- Índices de dominância (Simpson), de diversidade (Shannon-Weaver) e de riqueza (Chao-1) para as amostras do inóculo, biomassa suspensa e biomassa aderida- Etapa 1 de operação do AnSTBR.	94
Tabela 9- Comparação dos principais gêneros nas três amostras (inóculo, Biomassa aderida e biomassa suspensa) referentes à Etapa 1 de operação do AnSTBR.	95
Tabela 10- Valores das variáveis independentes e da variável resposta obtida em cada condição experimental- Etapa 2A.....	102
Tabela 11- ANOVA para o planejamento experimental Plackett- Burman para a concentração de sulfato residual- Etapa 2A.....	103
Tabela 12- Valores de concentração inicial de sulfato (CS_0), constante cinética (k) e valores de chi quadrado (Chi^2), reduzido e ajustado, obtidos pelo ajuste cinético de primeira ordem – Etapa 2B.	108
Tabela 13- Valores de pH, inicial e final, dos três testes relacionando o uso do sulfeto de origem química e do sulfeto de origem biológica, para qualquer metal ou a mistura deles- Etapa 3.	114
Tabela 14- Parâmetros (k , Chi^2 e R^2) dos ajustes de decaimento de primeira ordem para as concentrações de sulfeto químico e biológico para todos os metais e a mistura deles, referentes à Etapa 3.....	128
Tabela 15- Resultado do cálculo da quantidade máxima do metal que seria precipitado para as concentrações de sulfeto de (6,67, 20 e $50 \text{ mg-S}^{2-} \text{ L}^{-1}$) - Etapa 3.....	131
Tabela 16- Resumo de trabalhos sobre remoção de sulfato proveniente de DAM e suas particularidades.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Esquema representativo de como a tese foi dividida e quais são os assuntos tratados em cada seção.	33
Figura 2- Etapas da digestão anaeróbia (DA).....	51
Figura 3- Esquema representativo da etapa de operação do reator AnSTBR com as condições operacionais do sistema- Etapa 1.....	56
Figura 4- Esquema simplificado do AnSTBR utilizado na Etapa 1: 1- Reservatório da água residuária sintética (DAM sintética); 2- Bomba peristáltica, 3- Ponto de descarte de biomassa; 4- Câmara de entrada, 5- Amostradores (região de reação), 6- Amostrador de coleta de gás, 7- Selo hídrico, 8- Saída de efluente tratada, 9-Câmara de saída, A- Conexões (tela de aço inox malha) onde as hastes de PVC foram fixadas e B- Hastes de PVC revestidas com espuma de poliuretano (PU).....	57
Figura 5- Esquema representativo da inoculação e começo da operação do reator AnSTBR.	59
Figura 6- Figura representativa de quando foram separadas as amostras de inóculo e da biomassa (aderida e suspensão) para a análise de biologia molecular da Etapa 1, fase de operação do AnSTBR.	64
Figura 7- Esquema representativo da Etapa experimental 2.	65
Figura 8- Esquema simplificado de como foram montados os frascos para os ensaios da segunda etapa experimental (Etapas 2A e 2B).	67
Figura 9- Esquema representativo da montagem de cada teste composto pelos 16 tubos falcon, mantidos a temperatura ambiente (25°C), e dentro de uma caixa de fibra de papelão- Etapa 3.	73
Figura 10- Esquema representativo com todas as amostras da Etapa 3 e a organização das análises físico-químicas feitas nos testes.	76
Figura 11- Esquema representativo da divisão dos resultados da Etapa 1.	77
Figura 12- Perfil temporal de pH efluente(■), alcalinidade parcial (AP) em $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (▲) e ácidos voláteis totais (AVT) em mg L^{-1} (▼), ressaltando também os dois descartes de biomassa feitos nos dias 14 (Fase I) e 199 (Fase V)- Etapa 1, operação do reator AnSTBR.	80
Figura 13- Resultados de eficiência de remoção de sulfato e demanda química de oxigênio (DQO) em termos de porcentagem (%) expressados por fases- Etapa 1, operação do reator AnSTBR.	80
Figura 14- Frações da DQO utilizadas nos processos metanogênico (DQO_{CH_4}) e sulfetogênico (DQO_{BRS}) na Etapa 1 de operação do AnSTBR.	82
Figura 15- Quantidade de sulfeto teórico dissolvido e suas especiações; sulfeto ionizado (HS^-) e sulfeto não ionizado (H_2S), em termos de concentração (mg L^{-1}), referentes à Etapa 1 de operação do reator AnSTBR.	85
Figura 16- Valores, em $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, de alcalinidade parcial (AP), alcalinidade proveniente do íon bicarbonato (A_{BIC}) e alcalinidade do bisulfeto (A_{HS^-}) -Etapa 1, operação do reator AnSTBR.	87
Figura 17- Fotos resultantes da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)- Amostra A: inóculo; Amostra B: dia 14- Fase I; Amostra C: dia 199-Fase IV; Amostra D: dia 300- Fase V- Etapa 1 de operação do AnSTBR.	88
Figura 18- Fotos de MEV representando as estruturas encontradas nas amostras C (dia 199-, Fase IV) e D (dia 300- Fase V) da Etapa 1 de operação do reator AnSTBR.	89
Figura 19- Fotos do mapeamento quantitativo dos elementos químicos presentes nas amostras do inóculo e do descarte do dia 14 na Fase I e seus respectivos espectrogramas da análise de EDS/EDX- Etapa 1 de operação do AnSTBR.	91

Figura 20- Fotos do mapeamento quantitativo dos elementos químicos presentes nas amostras das amostras do dia 199 (Fase IV) e 300 (Fase V) e seus respectivos espectrogramas da análise de EDS/EDX- Etapa 1 de operação do AnSTBR.	92
Figura 21- Comparação entre os principais domínios presentes nas amostras de inóculo, biomassa aderida e biomassa suspensa, referentes à Etapa 1 de operação do AnSTBR. .	93
Figura 22- Comparação dos principais gêneros nas três amostras (inóculo, Biomassa aderida e biomassa suspensa) referentes à Etapa 1 de operação do AnSTBR.	96
Figura 23- Gêneros com abundância relativa acima de 1% na amostra de inóculo utilizado para a operação do AnSTBR.	98
Figura 24- Gêneros com abundância relativa acima de 1% na amostra de biomassa aderida da Etapa 1 de operação do AnSTBR.	99
Figura 25- Gêneros com abundância relativa acima de 1% na amostra de biomassa suspensa da Etapa 1 de operação do AnSTBR.	101
Figura 26- Esquema representativo dos resultados da Etapa experimental 2.....	102
Figura 27- Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos metais sobre a concentração de sulfato residual, ao nível de significância de 10% - Etapa 2A.	104
Figura 28- Efeito principais (valor-p = 0,1) dos elementos químicos cobalto e ferro na influência da concentração de sulfato residual, dentro dos níveis avaliados – Etapa 2A.	105
Figura 29- Superfície de resposta da concentração de sulfato residual (mg L^{-1}) em função dos metais ferro e cobalto – Etapa 2A.	105
Figura 30- Ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados experimentais de concentração de sulfato residual (mg L^{-1}) para as diferentes concentrações de cobalto (10, 30, 50 e 90 mg L^{-1}) e também do controle (zero concentração de cobalto), em função do tempo de experimento (dia)- Etapa 2B.	108
Figura 31- Concentrações de cobalto versus valores da constante cinética k (dia^{-1}) apresentados na Tabela 12- Etapa 2B.....	109
Figura 32- Perfil de degradação de sulfato e de matéria orgânica, representada pela DQO, em função do tempo para as diferentes concentrações de cobalto (10, 30, 50 e 90 mg-Co L^{-1}) e controle(0 mg-Co L^{-1}) - Etapa 2B.....	111
Figura 33- Esquema representativo da divisão dos resultados da Etapa 3.	112
Figura 34- Apresentação da solução turva observada no sulfeto químico, o precipitado marrom observado nas soluções com sulfeto biológico e a exceção da duplicata de tubos falcon constituintes dos três metais juntos (Zn+Ga+Ge)- solução química de sulfeto com um precipitado branco- Etapa 3.....	113
Figura 35- Resultados de FEEM para o primeiro teste- Etapa 3.	116
Figura 36- Resultados de FEEM para o segundo teste- Etapa 3.	117
Figura 37- Resultados de FEEM para o terceiro teste- Etapa 3.....	118
Figura 38- Resultados SEM/EDX amostra de zinco com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.	120
Figura 39- Resultados MEV/EDX amostra de gálio com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.	121
Figura 40- Resultados MEV/EDX amostra de germânio com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.....	121
Figura 41- Resultados MEV/EDX amostra da mistura de metais (Zn+Ga+Ge) com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.....	122
Figura 42- Resultados MEV/EDX amostra de zinco com sulfeto biológico, segundo teste- Etapa 3.	122
Figura 43- Resultados MEV/EDX amostra de gálio com sulfeto químico e biológico, segundo teste- Etapa 3.	123

Figura 44- Resultados MEV/EDX amostra de germânio com sulfeto biológico, segundo teste- Etapa 3.	123
Figura 45- Resultados MEV/EDX amostra da mistura de metais (Zn+Ga+Ge) com sulfeto biológico, segundo teste- Etapa 3.	124
Figura 46- Resultados MEV/EDX amostra de gálio com sulfeto químico e biológico, terceiro teste- Etapa 3.	124
Figura 47- Resultados das análises de sulfeto e metais no líquido: a) referente ao primeiro teste; b) referente ao segundo teste e c) referente ao terceiro teste, da terceira etapa experimental (Etapa 3).....	126
Figura 48- Ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados de sulfeto químico e biológico, para cada metal isoladamente (Zn, Ga e Ge) e a misturas deles (Zn+Ga+Ge) em cada um dos testes- Etapa 3.	129
Figura 49- Tipos de reatores utilizados em processos de redução de sulfato. a) <i>Continuous Stirred Tank Reactor</i> (CSTR); b) <i>Gas-Lift Bioreactor</i> (GLB); c) <i>Submerged Membrane Bioreactor</i> (MBR); d) <i>Fluidized Bed Reactor</i> (FBR); e) <i>Upflow Anaerobic Granular Sludge Bed</i> (UASB); f) <i>Expanded Granular Sludge Bed</i> (EGSB); g) <i>Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Biomass</i> (HAIB), h) <i>Down-flow Fixed-structured Bed Reactor</i> (DFSBR) e i) <i>Anaerobic Structured-Bed Reactor</i> (AnSTBR).	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $C_{\text{Sresidual}}$ - concentração de sulfato residual (mg L^{-1})
- SO_4^{2-} removido - concentração de sulfato removido (mg L^{-1})
- A_{HS} - alcalinidade proveniente do sulfeto biogênico ($\text{mg-CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
- A_{BIC} - alcalinidade proveniente do bicarbonato ($\text{mg-CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
- DQO- demanda química de oxigênio
- DQO_{CH_4} - porcentagem de DQO utilizada no processo metanogênico (%)
- DQO_{BRS} - porcentagem de DQO utilizada no processo sulfetogênico (%)
- $\text{DQO}_{\text{removida}}$ - demanda química de oxigênio removida (mg L^{-1})
- AnSTBR- reator anaeróbio de leito estruturado (*anaerobic structured-bed reactor*)
- AP- alcalinidade parcial ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
- AVT- ácidos voláteis totais (mg HAc L^{-1})
- BRS- bactérias redutoras de sulfato
- COV- carga orgânica volumétrica ($\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)
- CSTR- *continuous stirred tank reactor*
- CSV- carga de sulfato volumétrica ($\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)
- DAM- drenagem ácida de mina
- DFSBR- *down-flow fixed-structured bed*
- DQO- demanda química de oxigênio (mg L^{-1})
- EGSB- *expanded Granular Sludge Bed*
- EUA- Estados Unidos da América
- FBR- *fluidized bed reactor*
- GLB- *gas-lift bioreactor*
- HAIB- *horizontal-flow anaerobic immobilized biomass*
- MBR- *submerged Membrane Bioreactor*
- SSV- sólidos suspensos voláteis (g g^{-1})
- ST- sulfeto total dissolvido no líquido (mg L^{-1})
- STD- sulfeto teórico dissolvido (mg L^{-1})
- SVT- sólidos voláteis totais (g L^{-1})
- T-temperatura
- TDH- tempo de detenção hidráulica (h)
- UASB- reator anaeróbio de manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Bed*)

LISTA DE SÍMBOLOS

SO_4^{2-} -íon sulfato

Co- cobalto

Cu- cobre

Fe- ferro

Ga^{3+} - gálio

Ge^{4+} - germânio

$\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$ - sulfeto de hidrogênio aquoso

HCO_3^- - íon bicarbonato

HS^- - sulfeto de hidrogênio ionizado

Mg- manganês

Mn- magnésio

Mo- molibdênio

Ni- níquel

pH- potencial hidrogeniônico

pKa- constante de dissociação

S^{2-} - íon sulfeto

Zn^{2+} - zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
2. HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJETIVOS PROPOSTOS	34
3. REVISÃO DA LITERATURA	36
3.1 Drenagem ácida de mina (DAM) e impactos causados no ambiente e nos processos industriais.....	36
3.2 Processos de remediação e mitigação dos impactos causados pela DAM.....	39
3.3 Aplicação de reatores anaeróbios para o tratamento biológico de DAM.....	42
3.4 Reator de leito fixo estruturado.....	44
3.5 Importância dos metais no processo de digestão anaeróbia (DA)	49
3.6 Precipitação e o interesse de recuperação dos metais	52
3.7 Considerações relevantes a partir da literatura abordada.....	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Etapa experimental 1- Operação AnSTBR	55
4.1.1 Reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) com espuma de poliuretano como material suporte	56
4.1.2 Meio sintético simulando a drenagem ácida de mina (DAM) real, doador de elétrons, inoculação das espumas e parâmetros operacionais do AnSTBR	57
4.1.3 Avaliação de desempenho, métodos analíticos e cálculos	61
4.1.4 Análise de biologia molecular.....	63
4.2 Etapa experimental 2- Planejamento experimental para a avaliação da influência dos metais na concentração de sulfato	64
4.2.1 Definição das Etapas 2A (Plackett-Burman) e 2B (ensaio de um fator simples).	66
4.2.2 Materiais, procedimentos e delineamentos experimentais das Etapas 2A e 2B	66
4.2.3 Monitoramento dos frascos, análises químicas e métodos avaliativos	70
4.3 Etapa experimental 3- Estudo da precipitação dos metais (Zn, Ga e Ge) com sulfeto ..	71
4.3.1 Procedência das fontes de sulfeto (químico e biológico) e dos metais	71

4.3.2	Montagem dos testes de precipitação de metais	72
4.3.3	Amostragem e métodos analíticos	74
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1	Etapa experimental 1- Operação do AnSTBR	77
5.1.1	Desempenho geral do reator AnSTBR.....	78
5.1.2	Especiação do sulfeto e alcalinidade a bisulfeto (A_{HS^-})	84
5.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS/EDX) das amostras do descarte de biomassa.....	87
5.1.4	Biologia molecular	92
5.2	Etapa experimental 2- Planejamento experimental para a avaliação da influência dos metais na concentração de sulfato	101
5.2.1	Etapa 2A.....	102
5.2.2	Etapa 2B	107
5.3	Etapa experimental 3- Estudo da precipitação dos metais (Zn, Ga e Ge) com sulfeto	112
5.3.1	Primeiras observações e pH	112
5.3.2	Análise de FEEM nas amostras líquidas	115
5.3.3	Análise de MEV/EDX em amostras sólidas/pó	119
5.3.4	Quantificação de sulfeto e metais nas amostras líquidas	125
6.	CONTRIBUIÇÕES DESTA PESQUISA PARA O AVANÇO DA CIÊNCIA NO TEMA DE REDUÇÃO DE SULFATO PROVENIENTE DE DAM E PRECIPITAÇÃO DE SULFETOS METÁLICOS	132
7.	CONCLUSÕES	137
8.	RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	139

1.INTRODUÇÃO

Águas residuárias ricas em sulfato, como a drenagem ácida de mina (DAM), apresentam considerável concentração de metais e sulfato que justificam o não descarte destes efluentes *in natura* em um corpo d'água. A DAM é um efluente da indústria de mineração que tem gerado grandes preocupações ambientais. Mesmo quando o processo de mineração cessa ainda se tem a geração desta água ácida rica em metais e sulfato em larga escala, já que o processo ocorre naturalmente quando um mineral sulfetado é exposto a água e oxigênio.

O processo de geração da DAM pode ser melhor explicado pela oxidação da pirita (FeS_2), principal mineral sulfetado presente nos rejeitos e estéréis de mineração, o qual, quando exposto à água da chuva e oxigênio, produz uma água ácida, com pH em torno de 2 a 3, devido a geração de prótons H^+ e contendo ferro dissolvido e sulfato (AKCIL; KOLDAS, 2006).

O descarte de DAM *in natura* nos corpos d'água pode causar intoxicação ao ser humano por meio da ingestão indireta de peixes contaminados, bem como diminuir a diversidade e a riqueza da biota aquática, quando se atingem níveis elevados de metais. Além disso, a presença de sulfato na água pode ter um efeito laxativo em seres humanos por meio de sua ingestão, além de provocar incrustações nas caldeiras e trocadores de calor das indústrias.

A poluição ambiental causada pela DAM é algo difícil de avaliar em termos numéricos e os dados encontrados podem estar defasados, porém, em 1989, já se estimava que cerca de 19.300 km de córregos e rios, e 72.000 ha de lagos e reservatórios em todo o mundo tinham sido seriamente danificados (JOHNSON; HALLBERG, 2005). Rimstidt e Vaughan (2014) mencionaram que apenas nos Estados Unidos da América (EUA), mais de 15.000 km de rios estavam poluídos pela DAM devido à mineração de metais e carvão.

De acordo com Fungaro e Izidoro (2006), ainda com relação aos EUA, a DAM afetava aproximadamente 23.000 km de cursos d'água e se estimava que minas abandonadas há mais de 100 anos requereriam o tratamento de quase 3 milhões de m^3 de DAM por ano.

Com relação ao Brasil, mais especificamente nos Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, a lavra e o beneficiamento do carvão mineral geravam cerca de 60% de resíduos sólidos e aproximadamente $1,5 \text{ m}^3$ de efluentes ácidos para cada tonelada lavrada. No ano 2000, foram geradas cerca de 4 milhões de toneladas de rejeitos e estéréis do carvão beneficiado nas carboníferas brasileiras e três bacias hidrográficas foram impactadas pela

atividade mineradora de carvão: a Bacia do Rio Araranguá, do Rio Tubarão e do Rio Urussanga, todas situadas no Estado de Santa Catarina (FUNGARO; IZIDORO, 2006).

Em 2009, era estimada uma geração maior que 300 milhões de toneladas de rejeitos de mineração de carvão na região sul do Brasil e entre os anos de 2010 e 2016, foram gerados 87,2 milhões de toneladas de rejeitos e em torno de 52,3 milhões de toneladas desses recursos eram inexplorados comercialmente, os quais foram acumulados no ambiente devido à mineração de carvão durante os seis anos (DE OLIVEIRA et al., 2019).

Diante de toda problemática relatada, propostas de tratamento de tais efluentes vêm sendo desenvolvidas e estudadas a fim de mitigar os problemas associados e atender às especificações exigidas pelos órgãos ambientais para descarte de efluentes nos corpos hídricos. Por exemplo, a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) n° 430/11, que complementa e altera a resolução n° 357/05, art. 12 a 16 do cap. II, descreve as especificações de descarte de efluentes nos corpos de água conforme os padrões de qualidade de água e a norma da ABNT NBR ISO 14001:2015 refere-se às funções exigidas da empresa para com o meio ambiente, considerando poluição do ar, questões referentes à água e ao esgoto, gestão de resíduos, contaminação do solo, mitigação e adaptação às alterações climáticas e a utilização e eficiência dos recursos.

O tratamento convencional de DAM acontece por meio da neutralização por compostos alcalinos, ou seja, óxido e hidróxido de cálcio são adicionados na água e reagem com o sulfato, formando um precipitado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que é responsável pelo aumento do pH do meio para valores entre 6 e 9 e pode haver a formação de hidróxidos e oxi- hidróxidos metálicos insolúveis. Na literatura foi relatada a remoção de 90% dos metais pesados presentes em DAM na Malásia, como Cd, Pb, Zn, Ni, Cu e Cr (III), no valor de pH igual a 8,5 e utilizando calcário (CaCO_3) (AZIZ; ADLAN; ARIFFIN, 2008; KAUR et al., 2018). Por outro lado, essa prática traz algumas desvantagens como o alto custo dos reagentes (BAI et al., 2013a), a baixa eficiência na remoção de sulfato e a grande produção de lodo químico que exige uma disposição adequada no ambiente (GARCÍA et al., 2001; KAUR et al., 2018).

Como forma de contornar as desvantagens do tratamento convencional da DAM, o processo de redução de sulfato envolvendo as bactérias redutoras de sulfato (BRS) remove sulfato juntamente com a elevação do pH por um processo natural, devido a produção de alcalinidade. Os metais dissolvidos podem também ser precipitados na forma de sulfetos metálicos (mais eficiente que no processo químico anteriormente relatado) e recuperados para posterior utilização na indústria (metalúrgicas, indústrias ópticas, dentre outras) (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

O processo de redução de sulfato, envolvendo as BRS e a DAM, é bastante atrativo devido à baixa produção do lodo e a redução da toxicidade gerada pelo sulfeto e pelos metais pesados presentes em tal efluente da mineração, devido à precipitação dos sulfetos metálicos (VAN DEN BRAND et al., 2018).

Diversas configurações de reatores anaeróbios foram aplicadas para a avaliação do processo de redução de sulfato em tratamentos da DAM, a saber: RAHLF- reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RODRIGUEZ, 2010), UASB – *upflow anaerobic sludge blanket* - (RODRIGUEZ et al., 2012; SAHINKAYA et al., 2015; CUNHA et al., 2019), reator anaeróbio de fluxo ascendente de múltiplas camadas (BAI et al., 2013b) e reatores operados em batelada (ZHANG; WANG, 2014). Apesar dos resultados desses trabalhos terem sido positivos, ainda é necessária a otimização do processo, aliando fatores que são considerados importantes como, por exemplo, o tipo de reator empregado e as condições operacionais (pH, tempo de detenção hidráulica, material suporte, dentre outros).

Uma configuração de reator promissor para aplicação da biorremediação da DAM é o reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR – *anaerobic structured-bed reactor*), o qual foi desenvolvido para aliar as vantagens do crescimento microbiano aderido em material suporte (obtenção de altos tempos de retenção celular e alta concentração de biomassa) com um alto volume de vazios no leito (elevada porosidade de leito), mitigando o inconveniente problema de colmatção, comum nos tradicionais reatores de leito empacotado. Mockaitis (2011) desenvolveu essa configuração para permitir a precipitação de metais no próprio leito do reator, sem provocar distúrbios hidrodinâmicos como canais preferenciais ou formação de zonas mortas, comuns em reatores de crescimento microbiano aderido. Além da aplicação originalmente proposta, tal configuração de reator tem apresentado resultados satisfatórios em diferentes processos biológicos, a citar: produção de hidrogênio (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2015), remoção de carbono e nitrogênio (MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012; WOSIACK et al., 2015), biodigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar (SOARES, 2015; FUESS et al., 2017) e remoção de sulfato e matéria orgânica para uma água residuária complexa simulando esgoto sanitário (CAMILOTI, 2015).

Apesar do recente desenvolvimento associado ao AnSTBR, várias aplicações ainda são necessárias para elucidar sua robustez sob diversas condições, principalmente quando há possibilidade de acúmulo de precipitados no leito ou crescimento excessivo de biomassa. Assim, a aplicação de tal configuração para biorremediação de DAM surge como alternativa natural, pois atende às bases conceituais sobre as quais a proposta da configuração está fundamentada.

Propôs-se, portanto, avaliar o impacto do aumento sequencial na concentração de metais proveniente de uma água residuária rica em sulfato, simulando uma DAM, e utilizando o AnSTBR com espuma de poliuretano como material suporte para crescimento da biomassa, bem como o estabelecimento da comunidade microbiana na biomassa suspensa no leito do reator e na biomassa presa na espuma. Posteriormente, também foi avaliado como alguns metais, tais como: ferro, zinco, cobre, cobalto, manganês e magnésio, podem impactar diretamente na concentração de sulfato residual de um efluente tratado proveniente da indústria de mineração. Adicionalmente, foi realizado um estudo fundamental sobre precipitação de metais raros (gálio e germânio) que aparecem na natureza sempre associados a outros, tais como zinco e alumínio

Diante disso, a tese estará dividida em seções, sendo a primeira (Seção 1) introdutória abordando a problemática por trás das águas residuárias ricas em sulfato, metais e nutrientes, mais precisamente a drenagem ácida de mina (DAM), bem como a justificativa e originalidade do doutorado ao utilizar uma atrativa tecnologia, que é o AnSTBR. Na segunda seção (Seção 2) são apresentadas as hipóteses do trabalho e os objetivos e na Seção 3 são abordados os temas relacionados com a tese, servindo de base para contextualização e entendimento sobre o que foi estudado.

Os métodos e etapas experimentais são descritas na Seção 4. Esta é dividida em 3 etapas experimentais: (i) avaliação do processo de redução de sulfato utilizando o reator AnSTBR; (ii) estudo, de forma mais específica, de como os metais provenientes da água residuária simulando a DAM podem ter influenciado na redução de sulfato e (iii) estudo da precipitação e possibilidade de recuperação de metais raros, junto com o zinco, presentes nos rejeitos de mineração.

A Seção 5 aborda todos os resultados obtidos nas 3 etapas experimentais e discute as hipóteses definidas a fim de aceitá-las ou refutá-las. A Seção 6 ressalva as contribuições dessa pesquisa para o avanço da ciência no tema estudado e para finalizar, na Seção 7, são apresentadas as conclusões do trabalho com base nos objetivos propostos e a Seção 8 traz recomendações e sugestões as para futuras pesquisas vinculadas à mesma temática de biorremediação de DAM e precipitação de metais. As referências utilizadas para a construção e embasamento da tese são encontradas posteriormente.

Para melhor entendimento, a Figura 1 traz um esquema explicitando como foi desenvolvida a pesquisa e respectiva descrição na tese.

Figura 1-Esquema representativo de como a tese foi dividida e quais são os assuntos tratados em cada seção.

Fonte: Próprio autor.

2. HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJETIVOS PROPOSTOS

A hipótese central postulada na presente tese é a seguinte: “O AnSTBR é um reator adequado para biorremediação de um efluente rico em sulfato e metais, simulando a DAM, por aliar as vantagens inerentes de um reator de crescimento aderido, a obtenção de altos tempos de retenção celulares e elevadas concentrações de microrganismos, à alta porosidade de leito que permite que sulfetos de metais se precipitem sem que problemas hidrodinâmicos afetem o comportamento do reator”. Consequentemente, o objetivo principal foi: **Avaliar o desempenho do AnSTBR aplicado à biorremediação do efluente simulando uma DAM, estudando também como os metais influenciam no processo de redução de sulfato e a precipitação de sulfetos metálicos.**

As sub-hipóteses e os respectivos objetivos específicos foram:

Sub-hipótese 1: A combinação do uso de espumas de poliuretano e da configuração do AnSTBR favorece o processo sulfetogênico, resultando em maior eficiência do processo com relação à redução de sulfato, quando se submete o sistema à adição crescente de metais, e à precipitação de metais.

Objetivo específico 1: Avaliar o AnSTBR quanto ao processo sulfetogênico e a precipitação de metais, adotando a estratégia operacional de adição gradativa de metais proveniente de uma água residuária rica em metais e sulfato, simulando uma DAM.

Sub-hipótese 2: Os metais impactam diretamente o processo de digestão anaeróbia, visto que estes apresentam importância na atividade enzimática e, dependendo de sua concentração, estes podem ser tóxicos aos microrganismos ou sua carência pode causar baixa eficiência de processo.

Objetivo específico 2: Avaliar os metais bivalentes que estavam presentes na composição do meio sintético utilizado para avaliar o reator AnSTBR, a fim de saber qual foi o impacto que estes podem ter causado na concentração de sulfato residual no tratamento biológico da DAM.

Sub-hipótese 3: É possível a precipitação de metais raros, como o gálio e o germânio, que aparecem juntamente com o zinco e o alumínio nos resíduos de mineração, utilizando sulfeto, para a posterior recuperação dos metais e sua utilização na indústria.

Objetivo específico 3: Analisar fundamentalmente o processo de precipitação dos metais zinco, gálio e germânio, utilizando fonte biogênica e química de sulfeto objetivando a possível recuperação destes metais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Esta seção da tese engloba todos os assuntos pertinentes ao tema de biorremediação de águas residuárias ricas em sulfato e metais, mais precisamente sobre DAM e precipitação de metais, bem como a importância dos metais na digestão anaeróbia. Todas as informações foram consultadas na literatura e serviram como base para a construção da hipótese central, das sub-hipóteses e os respectivos objetivos específicos da pesquisa, além da fundamentação e discussão dos resultados.

3.1 Drenagem ácida de mina (DAM) e impactos causados no ambiente e nos processos industriais

Algumas águas residuárias se destacam por apresentar significativa concentração de sulfato, metais e nutrientes, os quais inviabilizam seu descarte no meio ambiente sem um tratamento, pois afetam direta ou indiretamente o ser humano e o meio ambiente. Geralmente, essas águas são provenientes de processos industriais, tal como a vinhaça de cana-de-açúcar, que é um subproduto na geração do etanol, a água utilizada no processo de branqueamento do papel, ou também podem ser geradas pela oxidação de minerais sulfetados em áreas mineradoras, resultando na drenagem ácida de mina (DAM), a qual é o destaque neste trabalho.

A DAM é um efluente da indústria de mineração que tem merecido bastante destaque ambiental, pois sua geração ocorre de forma natural e em larga escala no meio ambiente, mesmo quando as minas de carvão ou de metais cessam suas atividades.

O processo de geração de DAM pode ser melhor explicado com a Reação 1, a qual descreve a oxidação química da pirita (FeS_2) na presença de água e oxigênio no processo de geração de DAM, segundo Akcil e Koldas (2006). Ou seja, o contato do mineral sulfetado, por exemplo, a pirita, com água, oxigênio e bactérias quimioautotróficas, gera uma água ácida, com pH entre 2 e 3 devido à produção de H^+ , com considerada concentração de sulfato e metais dissolvidos (zinco, cobre, cobalto, ferro, entre outros) (UTGIKAR et al., 2002; AKCIL; KOLDAS, 2006; KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017).

A pirita também pode ser oxidada por meio do ferro férrico (Fe^{3+}), em condições anóxicas e presença de água, de maneira bem mais rápida do que quando há presença de oxigênio molar, de 18 a 170 vezes mais rápido, segundo Reação 2:

Tal conversão ainda pode acontecer de forma parcial, conforme apresentada na Reação 3 e na Reação 4, em que primeiro a pirita é convertida em tiosulfato e, posteriormente, o restante é oxidado a sulfato pelo ataque do íon ferro férrico, tendo o ácido sulfúrico como produto final da reação total (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

Além da geração natural e em larga escala, preocupa-se com o descarte de DAM *in natura* no meio ambiente, pois o sulfato pode causar incrustações nos equipamentos das indústrias, causando obstrução parcial ou total de tubulações (COSTA et al., 2019), bem como causar um efeito laxativo ao ser humano na faixa de 630 a 1150 mg L⁻¹ (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

A composição da DAM, em termos de metais, nutrientes e sulfato, depende da geologia de cada região e, por isso, é bastante variável conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Composição de diferentes drenagens ácidas de mina (DAM)- Brasil, Índia, Suécia e Espanha.

	Charqueada (Brasil/RS)¹	Tikak (Índia)²	Maurtiden (Suécia)³	Monte Romero (Espanha)⁴
pH	2,7	2,4	2,3	2,7
DQO (mg L⁻¹)	43	NE	NE	NE
DBO (mg L⁻¹)	5,0	NE	NE	NE
NTK (mg L⁻¹)	4,0	NE	NE	NE
Fósforo (mg L⁻¹)	0,03	NE	NE	NE
Potássio (mg L⁻¹)	NE	105	NE	NE
Sulfato (mg L⁻¹)	989	3615	NE	3500
Ferro (mg L⁻¹)	208	255,6	403	161
Alumínio (mg L⁻¹)	19	34,6	132	128
Manganês (mg L⁻¹)	9	18,2	49	18
Cobre (mg L⁻¹)	0,03	1,38	7,7	7
Zinco (mg L⁻¹)	0,1	5,04	464	431
Níquel (mg L⁻¹)	NE	11,13	0,3	NE
Cádmio (mg L⁻¹)	NE	0,051	1,0	NE
Cromo (mg L⁻¹)	NE	0,126	NE	NE
Chumbo (mg L⁻¹)	NE	0,38	NE	NE
Cobalto (mg L⁻¹)	NE	1,62	0,4	NE
Arsênio (mg L⁻¹)	NE	NE	1,3	NE
Cálcio(mg L⁻¹)	NE	181,3	271	218
Flúor(mg L⁻¹)	NE	NE	NE	0,5
Magnésio(mg L⁻¹)	NE	115	123	263

NE: não especificado;¹(KONARZEWSKI, 2009); ²(EQUEENUDDIN et al., 2010); ³(HEDRICH; JOHNSON, 2014); ⁴(AYORA et al., 2016).

Fonte: Próprio autor.

Como é observado na Tabela 1, a DAM apresenta metais como o arsênio e o cádmio que podem afetar a saúde humana quando entram em contato de forma direta ou indireta. Um dos casos mais conhecidos no mundo, que não aconteceu devido à DAM, mas é um bom exemplo, é o caso de Minamata, no Japão, onde teve uma epidemia devido à ingestão humana de peixes contaminados com mercúrio. Depois do ocorrido, várias pessoas apresentaram alguns sintomas de doenças neurológicas, como a perda de controle motor, comprometimento

da fala, cegueira, deficiência mental e, em casos mais extremos, a ingestão levou pessoas a óbito (GENCHI et al., 2017).

Outra grande preocupação com relação à DAM é a quantidade de sulfato presente nessa água ácida, chegando a mais de 3 g L^{-1} , como é o caso das minas na Espanha e na Índia (Tabela 1), pois quando o sulfato é reduzido a sulfeto, dependendo da concentração e do tempo em que o ser humano é exposto a esse composto tóxico, sua saúde pode ser comprometida. Segundo Guidotti (2007), uma concentração de 500 mg L^{-1} de sulfeto pode causar lesões graves nos olhos em 30 minutos, irritação pulmonar grave, inconsciência e morte dentro de 4 a 8 horas, além de amnésia pelo período de exposição. Caso a concentração dobre para 1000 mg L^{-1} , a respiração pode cessar e ser fatal.

3.2 Processos de remediação e mitigação dos impactos causados pela DAM

Os processos de remediação de efluentes industriais podem ser divididos em ativos e passivos, e combinam os processos químicos, físicos e biológicos. Os tratamentos ativos envolvem reagentes químicos e contínua operação e manutenção do sistema, incluindo também os tratamentos biológicos. Tais alternativas são compostas por equipamentos, como tanques, misturadores e bombas para regular a dosagem dos compostos químicos. Apesar deste tratamento cumprir seu papel na remediação de contaminantes dos efluentes (como, por exemplo, sulfato e metais tóxicos), demanda alto custo de capital, energia disponível para os equipamentos e altos custos de operação e manutenção (TAYLOR; PAPE; MURPHY, 2005; TRUMM, 2010). Já os tratamentos passivos, estes contam com recursos físicos, geoquímicos naturais, incluindo os processos biológicos, e, por isso, podem falhar se não forem cuidadosamente selecionados e projetados, pois não são tão estáveis quanto os ativos, além de requererem extensas áreas para implantação. Os tratamentos passivos são mais adequados para complementar sistemas ativos e, em longo prazo, são mais econômicos devido ao seu custo de instalação único, pouco ou nenhum custo de operação e manutenção, além de poderem ser aplicados em áreas remotas (ZIEMKIEWICZ; SKOUSEN; SIMMONS, 2001; TRUMM, 2010).

Dentre os diversos tipos de tratamento ativos, o tratamento convencional de DAM acontece por meio da neutralização química por compostos alcalinos, ou seja, óxido ou hidróxido de cálcio são adicionados na água, reagem com o sulfato e formam um precipitado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que é responsável pelo aumento do pH do meio (BIGHAM; NORDSTROM, 2000; JOHNSON; HALLBERG, 2005). As desvantagens deste tratamento são o alto custo dos reagentes (BAI et al., 2013a), a baixa eficiência na remoção de sulfato e a produção do

resíduo sólido (lodo químico), ainda com considerável concentração de metais e sulfato, que exige uma disposição adequada no meio ambiente (GARCÍA et al., 2001; GHAEDI et al., 2012).

A fim de superar as desvantagens do tratamento físico-químico convencional, surgiu o tratamento biológico. Este pode ser passivo (leitos de infiltração, lagoas anóxicas e *wetlands*) ou ativo (reatores em batelada, bateladas sequenciais, UASB, filtros anaeróbios e outros), e acontece por meio do enriquecimento da atividade microbiana (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

Comparando o tratamento convencional com o biológico, o primeiro resulta em concentrações finais de sulfato da ordem de 1500 mg L^{-1} e o segundo pode atingir concentrações de sulfato efluente muito mais baixas, menores que 250 mg L^{-1} , evidenciando sua vantagem em uma eficiência maior de remoção de sulfato, além de também permitir remoções de metais (BENNER et al., 1999).

Os tratamentos biológicos fundamentam-se basicamente no enriquecimento da atividade microbiana por meio da injeção de substrato adequado ou pela inserção de barreiras permeáveis reativas (BENNER et al., 1999) para a decomposição da matéria orgânica, objetivando a geração de energia e compostos inertes, de maneira aeróbia ou anaeróbia. A DAM, por sua vez, é um efluente deficiente em fonte de carbono (vide Tabela 1) e, por isso, é necessária a adição de uma fonte de carbono externa ao processo (exógena).

As fontes de carbono utilizadas no processo de redução de sulfato provenientes de DAM são as mais diversas, pois as BRS possuem grande versatilidade em metabolizar compostos desde hidrogênio a compostos mais complexos, como: lactato, etanol, acetato, soro de leite, etc (MUYZER; STAMS, 2008; HAO et al., 2014). Dentre os citados, o etanol merece destaque, pois além de ser um composto de fácil degradação para as BRS, ele é considerado barato, no caso do Brasil (GlobalPetrolPrices.com, 2020), e leva a baixa geração de lodo biológico (HAO et al., 2014).

O que acontece nos processos biológicos anaeróbios de tratamento de DAM é a conversão dos compostos orgânicos (fontes exógenas) por microrganismos que utilizam o sulfato, presente na água, como receptor de elétrons, de forma completa ou incompleta. A oxidação completa da matéria orgânica, produz HCO_3^- , responsável por consumir a acidez do meio e aumentar o pH, e sulfeto (HAMILTON, 1985; HANSEN, 1994; KAKSONEN; PUHAKKA, 2007) – Reação 5. Já a rota incompleta, acontece pela produção de compostos intermediários, como acetato e hidrogênio, para depois serem convertidos em compostos inertes.

O sulfeto gerado na conversão do sulfato pode apresentar diferentes formas (S^{2-} , HS^- , H_2S em solução, H_2S na fase gasosa) dependendo do pH do meio, sendo as formas aquosas mais instáveis, que se dissociam conforme Reação 6 e Reação 7.

Em valores de pH próximos do neutro, apenas a Reação 6 é importante devido ao seu valor de pKa e pequenas variações de pH, entre 6,0 e 8,0, levam ao deslocamento do equilíbrio para a produção de H_2S na forma dissociada (LENS et al., 1998; KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

Independente da forma (molecular ou iônica) do sulfeto, efeitos tóxicos sobre a biomassa podem ocorrer, conforme já mencionado no item 3.1. Por isso, estudam-se formas de contornar os problemas associados ao sulfeto, precipitando os metais presentes na DAM, de forma natural, como sulfetos metálicos insolúveis. Dessa forma, pode ser viabilizado o processo de separação dos metais para posterior uso na indústria e o sulfeto deixa de estar disponível no meio (CAO et al., 2009; CASTILLO et al., 2012)- Reação 8.

Em que:

Me^{2+} é o metal catiônico bivalente, podendo ser: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Ag^{2+} .

Por exemplo, Castillo et al. (2012) relataram que a formação do ZnS , levou à remoção completa do metal devido à diminuição da detecção da presença de zinco nas amostras, prevenindo, assim, a toxicidade no meio para os microrganismos, pelo sulfeto ou pelo metal, por tornarem-se indisponíveis no meio líquido.

3.3 Aplicação de reatores anaeróbios para o tratamento biológico de DAM

Diversos tipos e configurações de reatores vêm sendo estudados no tratamento biológico de DAM, bem como as diversas condições operacionais, visto que podem impactar diretamente no processo de redução de sulfato. Por exemplo, o pH ótimo para atividade das BRS é em torno de 5,5 a 10; a relação DQO/SO₄, não pode ser tão baixa ou tão alta, mas no mínimo de 0,67 para assegurar que todo o sulfato seja convertido pela matéria orgânica; o TDH deve ser o suficiente para haver a conversão do substrato; reatores do tipo UASB possuem biomassa em grânulo, outros reatores, possuem biomassa imobilizada; alguns apresentam condição de mistura e outros não (HAO et al., 2014).

Outro fator importante do processo anaeróbio de redução de sulfato proveniente de DAM é a concentração dos metais e sua precipitação dentro do reator, pois em longo prazo, dependendo da concentração dos sulfetos metálicos ou dos metais na forma não ionizada, podem causar a inibição da atividade das BRS (UTGIKAR et al., 2002; GUO; KANG; FENG, 2017).

Utgikar et al. (2002) e Hao et al. (2014), por exemplo, relataram que um teor total de 10 mg L⁻¹ de metais no sistema já pode ser considerada tóxico aos microrganismos redutores de sulfato (BRS) e a ordem decrescente de toxicidade dos metais, em mg L⁻¹, é: Cu < 4, Cd < 11, Ni < 13, Zn < 16.5, Cr < 35, Pb < 80.

Ochoa-Herrera et al. (2011) e Azabou; Mechichi e Sayadi (2007) constataram que compostos de cobre e zinco podem inibir a atividade das BRS a uma concentração de 0,84 mg L⁻¹ a 200 mg L⁻¹ para compostos de cobre e superiores a 150 mg L⁻¹ para compostos de zinco. Já Utgikar et al. (2002) verificaram que a concentração de 1000 mg L⁻¹ de sulfeto livre no líquido também pode inibir a atividade dos microrganismo redutores de sulfato.

A exemplo da aplicação de reatores anaeróbios no processo sulfetogênico da DAM, tem-se: Rodriguez et al. (2012) que estudaram o reator UASB no tratamento da DAM da mina de urânio Osamu Utsumi (Caldas, MG- Brasil), em escala de bancada. Usando etanol como fonte externa de carbono, os autores encontraram remoções de sulfato de 46,3% para a relação DQO/SO₄²⁻ estequiométrica de 0,67, com aumento para 85,6% quando a relação DQO/SO₄²⁻ foi elevada para 1,0.

Cunha et al. (2019) também avaliaram o tratamento biológico de uma DAM sintética e pH afluente próximo de 4,0, caracterizada por Vieira et al. (2016), simulando a real, em reator UASB por 739 dias, variando o TDH (14, 16 e 24 h), a relação DQO/SO₄²⁻ (0,67, 0,8 e 1,0) e também foi avaliada a remoção dos metais ferro, cobre e zinco, cujas concentrações eram 100 mg Fe²⁺ L⁻¹, 20 mg Zn²⁺ L⁻¹ e 5 mg Cu²⁺ L⁻¹. Como resultado, foram obtidas

remoções totais dos metais para quaisquer que fossem os metais e condições estudadas. Também foi atingido um ápice na eficiência de remoção de sulfato de $(92,1 \pm 1,8)\%$, com 80% de remoção de matéria orgânica, representada pela DQO, sob TDH de 16 h.

Bai et al. (2013) desenvolveram um estudo adicionando ferro metálico a fim de aumentar a atividade das BRS no tratamento de DAM de uma mina de cobre na China e verificaram remoção de sulfato na ordem de 61% ao diminuir a concentração de sulfato de 20800 mg L^{-1} para 8200 mg L^{-1} , a uma carga aplicada de sulfato de $217 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, resultando em taxa de redução de sulfato de $131 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O pH aumentou de 2,75 para 6,2 durante a operação do reator anaeróbio de leito múltiplo de fluxo ascendente (*up-flow anaerobic multiple-bed* - UAMB), e foram observadas remoções de 99% para o Cu^{2+} e 86% para o Fe^{2+} .

Rodriguez et al. (2016) avaliaram o desempenho de um reator anaeróbio de escoamento horizontal e biomassa imobilizada para tratamento de DAM da mina Osamu Utsumi (Caldas, MG- Brasil) e verificaram que a relação estequiométrica para redução de sulfato, $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ igual a 0,67 (etanol foi a fonte exógena), apresentou remoções de sulfato próximas a 70% quando o pH efluente era próximo do neutro. Quanto à remoção de metais, nas mesmas condições, a porcentagem removida de níquel foi de 30% e de zinco, 60%. O TDH utilizado neste estudo foi de 24 h e a concentração inicial de sulfato era em torno de 1200 a 1500 mg L^{-1} .

Vieira et al. (2016) estudaram o desempenho de um reator em batelada, aplicado para o tratamento biológico de DAM sintética, variando os valores de pH e avaliaram como essas mudanças influenciaram nas eficiências de remoção de sulfato e de metais (Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}). A relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ aplicada foi de 1,0, utilizando o etanol como fonte de carbono e os valores de pH foram variados de 7,0 para 4,0 progressivamente. Neste trabalho foi verificado que a eficiência da remoção de sulfato e matéria orgânica aumentou à medida que o pH inicial foi reduzido (38,5 para 52,2%- remoção de sulfato; 91,7 para 99%- remoção de matéria orgânica. As remoções dos metais foram acima de 80% independente da condição e do metal.

Dev, Roy e Bhattacharya (2017) avaliaram o tratamento da DAM proveniente de uma mina de carvão e metais em um biorreator de leito empacotado, com contas(miçangas) de poliuretano, utilizando lactato de sódio como doador de elétrons (3500 mg L^{-1}). As remoções dos metais (ferro, cobre, zinco, magnésio e zinco) foram da ordem de 94 a 98% e a remoção de sulfato obtida foi de 98,3% para uma carga de sulfato de $769,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e 95% para $732,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. O TDH aplicado foi de 48 h e a concentração de sulfato inicial era de 1500 mg L^{-1} .

3.4 Reator de leito fixo estruturado

Uma forma de contornar as toxicidades, por sulfeto e/ou metais nos sistemas, é a retenção da biomassa em materiais suporte conforme relatado por Chen; Cheng e Creamer (2008). Diante disso e tentando aliar configuração de reator e condições operacionais do sistema, uma nova tecnologia de reator tem se mostrado bastante promissora e versátil, que é o caso do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR), sendo amplamente estudado no Brasil, o qual alia as vantagens do crescimento microbiano aderido em material suporte com elevada porosidade de leito.

A Tabela 2 resume, em ordem cronológica, todos os trabalhos que vêm sendo desenvolvidos com a configuração de leito fixo estruturado nos últimos anos; com os diferentes materiais suportes e fluxos.

O trabalho pioneiro a estudar o reator de leito fixo estruturado foi o de Mockaitis et al. (2012), no qual é relatado um estudo fundamental sobre a toxicidade de cádmio proveniente de uma água residuária sintética simulando o esgoto doméstico. Os autores utilizaram espumas de poliuretano para a adesão da biomassa e atingiram remoções de matéria orgânica de 84%, 82%, 72% e 52%, quando as concentrações iniciais de cádmio foram 0,0, 0,4, 4,4 e 6,2 mg L⁻¹, respectivamente.

Moura, Damianovic e Foresti (2012) também avaliaram esse tipo de reator na remoção de nitrogênio e carbono de uma água residuária sintética simulando o esgoto doméstico. O reator foi operado com aeração intermitente e com reciclo de efluente, se mostrando efetivo e uma alternativa com custos reduzidos de construção e operação em escala real. O reator também continha seu leito com espumas de poliuretano e as condições ótimas de operação foram obtidas com um TDH de 12 h, aeração a cada 2 horas e 1 hora sem, e uma razão de recirculação de 5.

Camiloti et al. (2014) avaliaram remoções de sulfato e matéria orgânica de uma água residuária complexa rica em sulfato e substrato orgânico e também utilizaram as espumas de poliuretano como material suporte para adesão da biomassa. A temperatura do sistema era mantida em 30°C, avaliando quatro diferentes razões DQO/SO₄²⁻ (0,72; 1,7; 3,5 e 6,1), sendo que as maiores remoções de sulfato e matéria orgânica atingidas foram com a relação de 1,7 nos valores de 82 e 89%, respectivamente, com concentração de sulfato de (225±10) mg L⁻¹ e de matéria orgânica (DQO) igual a (381±59) mg L⁻¹.

Anzola-Rojas e Zaiat (2015) utilizaram reator de leito estruturado para avaliar a produção de hidrogênio utilizando três tipos de material suporte: polietileno de baixa densidade reciclado, espuma de poliuretano e cerâmica, utilizando como substrato sacarose e

uréia. Além disso, o escoamento neste caso foi descendente e não mais ascendente como nos outros trabalhos citados. Com essas mudanças, o resultado obtido, não antes observado em outros reatores deste tipo com imobilização de biomassa, foi a produção contínua de hidrogênio por 120 dias a uma vazão de $0,6 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e com rendimento de $0,5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$, sendo justificado pela renovação da biomassa, principalmente após descartes periódicos no fundo do reator. Tais descartes foram possíveis pela estruturação do leito que leva ao aumento do volume de vazios.

Em continuação ao trabalho de Moura, Damianovic e Foresti (2012), Santos et al. (2016) avaliaram a influência da razão DQO/N (9,7 e 2,9 para sacarose; 7,6 e 2,9 para a peptona de carne) e da fonte de carbono (peptona de carne e sacarose) nos processos simultâneos de remoção de nitrogênio e carbono, tendo como resultados valores de remoção de DQO de 90% ou mais, em toda a operação do reator, e o sistema alcançou eficiências totais de remoção de nitrogênio de $(84,6 \pm 10,1)\%$ e $(81,5 \pm 5,3)\%$, sob baixa disponibilidade de doadores de elétrons orgânicos.

Godoi, Foresti e Damianovic (2017) também operaram o reator com escoamento descendente, alimentado com água residuária simulando DAM. O material suporte utilizado foi o polietileno de baixa densidade e a fonte de carbono era a vinhaça. Como resultados, o reator se mostrou uma alternativa adequada para remover metais, sulfato e matéria orgânica nas condições estudadas. As concentrações afluentes de matéria orgânica (como DQO) e sulfato eram da ordem de 4000 mg.L^{-1} e 2000 mg.L^{-1} , respectivamente e o TDH foi de 20 h por 547 dias de operação do reator. O elemento ferro foi adicionado de forma gradativa no sistema ($0,07$ a $0,51 \text{ g Fe}^{2+} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para avaliação do potencial de remoção de metais, atingindo remoção de até $95 \pm 5\%$, e as eficiências de remoção de matéria orgânica (DQO) e SO_4^{2-} foram de $94 \pm 2\%$ e $97 \pm 3\%$, respectivamente.

No tema de biodigestão da vinhaça em AnSTBR, dois trabalhos merecem destaque, o de Aquino, Fuess e Pires (2017) e o de Fuess et al. (2017), os quais mostraram que o reator de leito estruturado é uma configuração adequada para substituir os sistemas convencionais de leito empacotado para tratar águas residuárias ricas em sólidos, sem limitações operacionais observadas (por exemplo, entupimento do leito).

Aquino, Fuess e Pires (2017) avaliaram a aplicabilidade do reator variando as cargas orgânicas de vinhaça entre $2,4$ e $18,0 \text{ kg DQO m}^3 \text{ dia}^{-1}$, apresentando eficiências de conversão dos substratos maior que 80% com coeficiente de rendimento celular de $0,095 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ DQO}$, sendo maior que o encontrado para o leito empacotado tradicional nas mesmas condições ($0,066 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ DQO}$). Fuess et al. (2017) verificaram remoção de matéria

orgânica da vinhaça superior a 80% na fase metanogênica, quando o reator de leito estruturado era mantido com uma carga orgânica de $30 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$, operado em duas fases - sistema acidogênico-metanogênico.

No tema de nitrificação e desnitrificação em AnSTBR destaca-se o trabalho de Silva, Damianovic e Foresti (2018) utilizando espuma de poliuretano como material suporte. Neste trabalho aplicou-se aeração intermitente e contínua, e obteve-se remoção de 80% do nitrogênio total Kjeldahl e 26% do nitrogênio total.

Na mesma linha de águas ricas em sulfato, Gil-Garcia et al. (2018) avaliaram o AnSTBR com polietileno de baixa densidade em condição acidogênica termofílica (55°C) a fim de melhorar a remoção de sulfato e a produção de acetato antes da metanogênese. A água residuária era composta de uma concentração inicial variável de 2000 a $4000 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$, mais solução de macro e micronutrientes e adição de $5000\text{-}10000 \text{ mg L}^{-1}$ de etanol. Como resultado, foi obtida uma remoção de sulfato menor que 27,5% quando o TDH era de 6 h e ao implementar a recirculação de sulfeto no reator, a remoção de sulfato aumentou para 60%, fornecendo um controle tampão adequado ao longo de toda a altura do sistema. Ademais, as BRS foram capazes de suportar concentrações de H_2S e acetato na ordem de 232 mg L^{-1} e 3111 mg L^{-1} , respectivamente.

Outros trabalhos recentes com o mesmo tipo de reator foram empregados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) e Carneiro et al. (2019) para avaliação da produção de hidrogênio na fermentação escura a partir de soro de queijo sintético e remoção dos fármacos sulfametoxazol e ciprofloxacina do esgoto doméstico, respectivamente. Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) verificaram uma taxa de produção volumétrica média de hidrogênio no valor de $1,6 \pm 0,7 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e um rendimento médio de hidrogênio de $(1,4 \pm 0,7) \text{ mol L de H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de lactose consumida, quando o sistema era mantido a 25°C com uma carga orgânica de $24 \text{ kg DQO m}^3 \text{ d}^{-1}$ e um TDH de 24 h. Carneiro et al. (2019) obtiveram remoções de sulfametoxazol e ciprofloxacina iguais a $(83 \pm 12)\%$ e $(81 \pm 15)\%$, respectivamente. As concentrações iniciais dos dois compostos avaliados eram de 439 mg L^{-1} de sulfametoxazol e 342 mg L^{-1} de ciprofloxacina, o TDH aplicado foi de 12 h e temperatura de 30°C .

Nogueira et al. (2019) utilizou as mesmas configurações de leito, material suporte (anéis de poliuretano de baixa densidade) e escoamento descendente de Godoi, Foresti e Damianovic (2017), para avaliar o tratamento biológico de uma DAM real (mina de urânio Osamu Otsumi- Caldas, MG) com concentração de sulfato de aproximadamente 1000 mg L^{-1} e metais dissolvidos; incluindo os metais terras raras, urânio e ítrio. O reator foi operado por 175 dias, em condição mesofílica (30°C), o TDH variou entre 16h e 18,5h e a vinhaça de

cana-de-açúcar foi utilizada como doador de elétrons (DQO de 1500 a 2000 mg L⁻¹) . Como resultado, os autores obtiveram remoções de metais acima de 70% para lantânio, cério, praseodímio, neodímio, samário e ítrio, e 79, 67, 48 e 25% para ferro, silício, alumínio e manganês, respectivamente. A redução de sulfato máxima obtida foi de $(67 \pm 22)\%$ e a remoção de DQO, acima de 56%.

Com base nesses estudos, fica evidente a versatilidade e o potencial do reator de leito estruturado, justificando seu interesse na utilização da presente pesquisa na avaliação da biorremediação de uma água residuária sintética rica em sulfato e metais, simulando a drenagem ácida de mina (DAM), utilizando como material suporte a espuma de poliuretano.

Tabela 2- Trabalhos em que se utilizou o reator de leito fixo estruturado (AnSTBR) do ano de 2012 até 2019.

	Processo	Material Suporte	Escoamento
Mockaitis et al. (2012)	Estudo fundamental sobre a toxicidade de cádmio proveniente de uma água residuária sintética simulando o esgoto doméstico	Espumas de poliuretano	Ascendente
Moura, Damianovic e Foresti (2012)	Remoção de nitrogênio e carbono de uma água residuária sintética simulando o esgoto doméstico	Espumas de poliuretano	Ascendente
Camiloti et al. (2014)	Remoções de sulfato e matéria orgânica de uma água residuária complexa rica em sulfato e substrato orgânico	Espumas de poliuretano	Ascendente
Anzola-Rojas e Zaiat (2015)	Produção de hidrogênio	Polietileno de baixa densidade reciclado, espuma de poliuretano e cerâmica	Descendente
Santos et al. (2016)	Remoção de nitrogênio e carbono	Espumas de poliuretano	Ascendente
Godoi, Foresti e Damianovic (2017) e Nogueira et al. (2019)	Tratamento de DAM (sulfetogênese)	Polietileno de baixa densidade	Descendente
Aquino, Fuess e Pires (2017)	Biodigestão da vinhaça	Espuma de poliuretano	Ascendente
Fuess et al. (2017)	Biodigestão da vinhaça em sistema de duas fases - acidogênico-metanogênico	Espuma de poliuretano	Ascendente
Silva, Damianovic e Foresti (2018)	Nitrificação e desnitrificação	Espumas de poliuretano	Ascendente
Gil-Garcia et al. (2018)	Remoção de sulfato e produção de acetato antes da metanogênese, em condição acidogênica termofílica (55°C)	Polietileno de baixa densidade	Ascendente
Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)	Produção de hidrogênio na fermentação escura a partir de soro de queijo sintético	Polietileno de baixa densidade	Ascendente
Carneiro et al. (2019)	Remoção dos fármacos sulfametoxazol e ciprofloxacina do esgoto doméstico	Espumas de poliuretano	Ascendente

3.5 Importância dos metais no processo de digestão anaeróbia (DA)

O processo de digestão anaeróbia (DA) é a conversão de compostos orgânicos complexos em outros mais simples e estáveis, por meio de 4 etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e a metanogênese. Em paralelo, tem-se o processo sulfetogênico conforme já foi mencionado no item de remediação das águas ricas em sulfato, que é responsável pela conversão de compostos a H_2S e CO_2 . A Figura 2 mostra de forma mais detalhada como essas etapas estão interligadas e quais as bactérias ou arqueias responsáveis por cada processo.

Os metais apresentam significativa importância sobre o processo de DA, afetando a eficiência do tratamento de uma água residuária. Em alguns casos, a concentração dos metais é adequada para se ter uma eficiente DA, porém os metais não se encontram disponíveis, podendo estar ligados a outros íons, por exemplo.

A concentração necessária de cada metal traço na DA é determinado pelo tipo de reator anaeróbio empregado, tipo de substrato, temperatura, entre outros fatores (THANH et al., 2016). Na literatura, comumente se encontram vários estudos sobre determinado metal e sua influência na metanogênese, devido esta ser a etapa mais sensível à deficiência de metais (GOODWIN; WASE; FORSTER, 1990).

Segundo Choong et al. (2016), a ordem de necessidade dos elementos químicos para o processo metanogênico, é: $Fe \gg Zn > Ni > Cu \approx Co \approx Mo > Mn$, além de ressaltarem alguns trabalhos relacionando o processo, a razão enzima/cofator, o(s) elemento(s) traço e as reações para cada caso. Por exemplo, os elementos Fe, Co, Ni, Se e Mo controlam os processos de acetogênese e metanogênese e quem faz isso são as enzimas hidrogenase na presença de Fe e/ou Ni. Já o cobalto tem um impacto na atividade da metil transferase e o níquel não apenas forma a monóxido de carbono desidrogenase para participar de reações acetoclásticas e acetogênicas, como também serve como elemento central da coenzima F430, sendo importante na metanogênese autotrófica (ZHANG; ZHANG; LI, 2015; CHOONG et al., 2016).

Zhang, Zhang e Li (2015) avaliaram os efeitos sinérgicos de alguns metais na produção de metano a partir de resíduo de alimentos e os resultados mostraram que os reatores que continham mais tipos de metais atuando juntos exibiram maiores rendimentos de metano do que aqueles com menor diversidade desses metais. Por exemplo, a combinação de ferro com cobalto gerou um rendimento de metano maior que quando continha apenas o elemento ferro ou somente o cobalto e o mesmo ocorreu com a combinação de ferro, cobalto e

molibdênio. As concentrações utilizadas dos metais neste experimento foram: Fe = 100 mg L⁻¹, Co = 1 mg L⁻¹ e Mo = 5 mg L⁻¹.

Ferro é considerado o elemento mais requerido dentre os metais traço e na metanogênese ele está envolvido em quase todas as metaloenzimas nas rotas que contém os clusters Fe-S (GLASS; ORPHAN, 2012). O ferro pode ser doador ou receptor de elétrons para a produção de metano e CO₂ pelas arqueias metanogênicas e é bastante utilizado para precipitação de sulfetos nos reatores anaeróbios (THANH et al., 2016). Vieira et al. (2016), Costa, Rodriguez e Sancinetti (2017) e Cunha et al. (2019) avaliaram a suplementação de ferro em águas residuárias ricas em sulfato e verificaram uma remoção quase total do metal no efluente em qualquer caso, evidenciando, assim, a formação do sulfeto ferroso e precipitação deste dentro do reator.

Banks et al. (2012) verificaram que o acúmulo de ácido propiônico na DA de resíduos alimentares está intimamente ligada à deficiência de selênio e Speece; Parkin; Gallagher (1983) observaram que a degradação de acetato pode ser estimulada na presença de níquel (Ni), além deste elemento ser requerido para crescimento de todas as arqueias metanogênicas (CHOONG et al., 2016).

O manganês (Mn) atua como receptor de elétrons no processo de respiração anaeróbia, e o zinco atua na metanogênese pela coenzima M metiltransferase, sendo também encontrado na hidrogenase.

Outros elementos como o tungstênio (W) e o molibdênio (Mo) são encontrados nas enzimas desidrogenase das arqueias metanogênicas, catalisando a produção de formiato por microrganismos oxidantes de propionato (THANH et al., 2016).

Jarvis et al. (1997) relataram o Co como um dos elementos cruciais para manter a estabilidade do processo de digestão da silagem de trevo (planta que serve como forragem, rica em proteína), permitindo uma maior carga orgânica no sistema e Moestedt et al. (2016) verificaram que, com a adição de cobalto no sistema, a velocidade da acetogênese foi maior que a da metanogênese.

Apesar de a literatura trazer todas essas evidências da influência dos metais sobre a DA, ainda não é bem compreendido como a suplementação de metais interfere nos microrganismos anaeróbios e em todas as etapas da DA, sejam eles isolados ou em sinergismo, e por isso esse tema ainda demanda estudos, como é o caso da rota sulfetogênica. Por outro lado, uma afirmação que pode ser feita é que a precipitação e a adsorção de metais estão intimamente ligadas à biodisponibilidade do metal no meio e às condições operacionais

empregadas nos reator (THANH et al., 2016). Isso será melhor explicitado no item 3.5 a seguir.

Figura 2- Etapas da digestão anaeróbia (DA).

Fonte: Adaptado de Chernicharo, 1997 e Muyzer, Stams, 2008.

3.6 Precipitação e o interesse de recuperação dos metais

Tornar os metais indisponíveis interfere diretamente no processo de DA, mas, em contrapartida, é uma alternativa de prevenir a toxicidade proveniente dos mesmos no meio líquido. Isso é o que acontece quando os sulfetos metálicos são precipitados e é diante deste argumento que nos últimos anos tem se estudado mais sobre precipitação seletiva de metais oriundos de águas residuárias ricas em sulfato e metais, controlando alguns parâmetros químicos no processo.

Dentre os métodos de precipitação, estão os eletroquímicos, eletrocoagulação, eletroflotação, porém estes são considerados caros (AZIMI et al., 2017) e, entre os mais baratos, estão a precipitação por sulfeto e hidróxidos. Veeken et al. (2003) ressaltam que o método com sulfeto é melhor que a precipitação utilizando hidróxidos, pois resulta em efluentes com menores concentrações de metais. Tal evidência foi comprovada em sistemas contínuos e descontínuos utilizando uma água residuária sintética contendo Cd, Cu, Ni, Pb e Zn e o monitoramento da remoção dos metais era feito com o controle de pH e sulfeto no sistema. Como resultado, os autores observaram que, em pH igual a 6,0 e concentração de sulfeto menor que $0,02 \text{ mg L}^{-1}$, a concentração dos metais no efluente era menor que $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

As condições operacionais a serem controladas no processo de precipitação são o pH, pois está intimamente ligado ao produto de solubilidade de cada metal, a concentração de sulfeto e a temperatura. Não podendo também ser desconsiderado o fato de que cada metal, compostos intermediários e complexos metálicos possuem comportamentos distintos no processo de precipitação com sulfetos (VEEKEN et al., 2003; MOKONE; VAN HILLE; LEWIS, 2012).

O elemento zinco é comumente escolhido como metal de comparação por ter somente um estado de oxidação (2+), o que facilita o entendimento do processo de precipitação química. Mokone, Van Hille e Lewis (2012) relataram que a origem do sulfeto, química ou biológica, não interfere na precipitação de sulfeto de zinco. O cobre é considerado um elemento difícil de estudar devido a sua capacidade de formar vários complexos de bissulfeto, sulfeto e polissulfeto. Já o ferro forma compostos intermediários em poucos segundos, mas estes também são decompostos rapidamente. Por outro lado, Cu e Zn formam complexos estáveis quando não se tem agitação e complexos de zinco se dissociam em pH abaixo de 6,7, liberando H_2S (LEWIS, 2010).

Wang et al. (2014) realizaram um estudo de precipitação de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) de uma DAM gerada de uma mina de cobre abandonada no Japão que tinha pH

igual a 2,8. Os autores utilizaram uma fonte química de sulfeto (NaHS) com concentração acima de 20 mg L^{-1} do composto e no início não fizeram ajuste nenhum de pH. Nesse caso, foi observado que o Cu precipitou, enquanto Fe e Zn não. Quando o pH foi aumentado para 5, os íons ferrosos foram oxidados com peróxido de hidrogênio e posteriormente, com a utilização da cal, ocorreu a completa precipitação de Fe. O Cu só começou a precipitar em pH entre 5 e 6 e em pH de 8 ele foi totalmente precipitado, quando foi adicionado de 10 a 15 mg L^{-1} de NaHS no sistema. O Zn começou a precipitar em pH igual a 7 e em pH de 9 foi totalmente precipitado. No intervalo de pH entre 6 e 8, Cu e Zn foram coprecipitados.

Com o processo de precipitação dos metais, sendo de forma biológica ou química, os metais podem ser recuperados para posterior uso na indústria. As águas residuárias ricas em metais, a destacar a DAM, apresentam metais raros integrados, os quais geralmente permanecem inexplorados e sua recuperação possui informações limitadas (BINNEMANS et al., 2013).

Ayora et al. (2016) estudaram a recuperação de ítrio fazendo o tratamento passivo da DAM usando calcita e depois lagoas de sedimentação e os autores observaram que o elemento foi removido do efluente com concentrações efluentes abaixo do limite de detecção do método utilizado para medição ($0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).

O processo de extração por solvente é o preferido para as recuperações de elementos terras raras provenientes de resíduos aquosos concentrados e soluções de lixiviação. Geralmente são utilizadas as resinas de troca iônica e as resinas quelantes para a recuperação dos metais, mas, em alguns casos, adsorventes biológicos, como a quitosana, são utilizados. Além disso, há estudos da biossorção de metais e urânio por algas, fungos, bactérias e leveduras (BINNEMANS et al., 2013).

Liu et al. (2016, 2017) avaliaram o processo de extração de gálio (Ga) e germânio (Ge) de resíduos da refinaria do zinco por meio da lixiviação ácida com ácido sulfúrico sob pressão, com posterior filtração. Os resultados desse processo foram satisfatórios, com lixiviação dos metais na ordem de 98% para o Ga e 94% para o Ge.

Das e Das (2013) apresentaram um resumo sobre a recuperação de terras raras pelo processo de biossorção e relataram várias vantagens sobre os métodos convencionais, como a não produção de lodo químico (originário de tratamentos físico e químico), facilidade de operação, além de ser uma alternativa altamente econômica para a descontaminação de efluentes contendo metais, podendo ser integrado a outros sistemas. Os terras raras estudadas foram o lantânio, neodímio, cério, érbio, dentre outros. Os processos adsorventes foram realizados em batelada e os parâmetros que influenciaram no processo foram o pH, a

temperatura, a dosagem do material biossorvente, o tempo de contato e a concentração inicial do metal.

3.7 Considerações relevantes a partir da literatura abordada

A partir da revisão da literatura pode-se observar o vasto estudo que vem sendo feito sobre o processo de redução de sulfato e metais a partir da água residuária de mineração. Diante disso e como forma de complementar e otimizar os processos e tecnologias já estudados, a presente pesquisa poderá contribuir com uma nova e promissora configuração de reator, o AnSTBR, para remediação de águas residuárias ricas em sulfato e metais. Será possível também entender como os metais Mg, Fe, Zn, Co, Ni, Cu e Mn influenciam na redução de sulfato, seja positivamente ou negativamente, tema este ainda pouco explorado e que pode ser crucial para um eficiente processo de remediação de sulfato da DAM. Ademais, preocupa-se em entender melhor a questão da precipitação dos sulfetos metálicos para recuperação de metais raros, tais como o gálio e o germânio, os quais tem alto valor agregado para a indústria.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são abordados todos os aparatos experimentais, metodologias e como foi realizado o monitoramento de cada etapa experimental para posterior avaliação e discussão dos resultados.

O trabalho foi estruturado em três etapas experimentais, sendo as duas primeiras realizadas no Brasil, no Laboratório de Processos Biológicos, da cidade de São Carlos, e a terceira etapa foi realizada em Galway, na Irlanda, no departamento de microbiologia da Universidade Nacional da Irlanda (NUIG).

A primeira etapa foi a avaliação do reator de leito fixo estruturado (AnSTBR) quando submetido a crescentes concentrações de metais e nutrientes e como essa estratégia impactou na eficiência do reator em termos de remoção de sulfato, de matéria orgânica e outros parâmetros de monitoramento. A segunda etapa foi uma complementação da primeira com a investigação de quais metais presentes no efluente sintético da primeira etapa influenciaram, positiva ou negativamente, no processo sulfetogênico. E a terceira etapa consistiu em estudo fundamental sobre precipitação de metais na forma de sulfetos metálicos, utilizando sulfeto de sódio (fonte química) e sulfeto biológico proveniente de um reator anaeróbio em batelada.

4.1 Etapa experimental 1- Operação AnSTBR

Nesta etapa experimental foi operado um reator de leito fixo estruturado (AnSTBR), de escoamento ascendente, por um período de 300 dias, correspondendo a 5 fases, com diferentes concentrações de metais no meio sintético, para avaliar a influência dessa estratégia operacional no processo sulfetogênico. Também houve o sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S da amostra do inóculo já triturado no liquidificador e da biomassa, aderida na espuma e suspensa no leito do AnSTBR, retiradas no último dia de operação.

A Figura 3 mostra um esquema representativo da Etapa 1.

Figura 3- Esquema representativo da etapa de operação do reator AnSTBR com as condições operacionais do sistema- Etapa 1.

Fonte: Próprio autor.

4.1.1 Reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) com espuma de poliuretano como material suporte

A Figura 4 mostra o reator que foi operado continuamente por 300 dias nesta etapa, mas que foi completamente desativado somente após a Etapa 2, que será posteriormente descrita no item 4.2 desta tese.

O AnSTBR era dividido em três compartimentos: câmara de entrada, região de reação e câmara de saída. A câmara de entrada era formada por uma seção cônica, projetada para descargas de biomassa e material eventualmente precipitado. A região da reação, isto é, o leito estruturado, foi formada por oito hastes de PVC revestidas de espuma de poliuretano (PU), semelhantes a Aquino; Fuess e Pires (2017) e Fuess et al. (2017). A seleção do material de suporte foi baseada em resultados anteriores os quais indicaram melhor aderência das BRS em PU e carvão ativado quando comparados com polietileno de baixa densidade e cerâmica (SILVA et al., 2006).

O material utilizado na construção do reator foi o acrílico e seu volume de líquido reacional era de 2,25 L. Este possuía 84,5 cm de altura total, sendo dividido em 52 cm de

corpo (região de reação) mais 16,5 cm de altura da câmara de saída e 16 cm da câmara de entrada. Os amostradores da região de reação estavam espaçados a cada 7,5 cm e 10,5 cm.

Figura 4- Esquema simplificado do AnSTBR utilizado na Etapa 1: 1- Reservatório da água residuária sintética (DAM sintética); 2- Bomba peristáltica, 3- Ponto de descarte de biomassa; 4- Câmara de entrada, 5- Amostradores (região de reação), 6- Amostrador de coleta de gás, 7- Selo hídrico, 8- Saída de efluente tratada, 9- Câmara de saída, A- Conexões (tela de aço inox malha) onde as hastes de PVC foram fixadas e B- Hastes de PVC revestidas com espuma de poliuretano (PU).

Fonte: Próprio autor

4.1.2 Meio sintético simulando a drenagem ácida de mina (DAM) real, doador de elétrons, inoculação das espumas e parâmetros operacionais do AnSTBR

O reator foi alimentado continuamente por uma bomba peristáltica (Gilson, Inc., modelo Minupuls 3) com um efluente sintético que teve a concentração de metais e nutrientes aumentadas gradualmente ao longo de todo o período de operação do reator, até que fossem atingidas as concentrações próximas aos valores observados na literatura; que correspondeu à composição da Fase V.

Com relação à da DAM sintética utilizada, ela foi baseada em Vieira et al. (2016), Bekmezci et al. (2011) e Guo e Cutright (2015), cuja composição era: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl e KH_2PO_4 . Seu preparo era feito com água de abastecimento (duas vezes por semana), o pH era ajustado para $(4,0 \pm 1,0)$ com HCl (6 mol L^{-1}), quando necessário, e mantida sob refrigeração, na geladeira, a 4°C .

A Tabela 3 traz as particularidades de cada fase de operação do reator, bem como a composição meio sintético, em termos de valores, destacando as fontes de metais e nutrientes, tempo de operação de cada fase e o número de amostras retiradas em cada uma delas. É importante destacar que cada fase correspondeu a uma diluição feita a partir da composição da Fase V (sem diluição), ou seja, a Fase I foi dez vezes diluída, a Fase 2 cinco vezes, a Fase III- duas vezes e meia, a Fase IV- 1,67 vez, e estas especificações também podem ser notadas na Tabela 3.

O etanol foi usado como fonte de carbono com uma demanda química de oxigênio (DQO) de 1500 mg L^{-1} e a fonte de sulfato, na forma de Na_2SO_4 , foi adicionada na mesma concentração, a fim de se obter uma relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ fixa equivalente a 1,0. Tal valor de concentração corresponde, em termos de carga volumétrica de sulfato e orgânica, a $2,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para um tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado de 16 h (vazão de aproximadamente 140 mL h^{-1}).

As condições operacionais adotadas na presente pesquisa foram baseadas nos resultados obtidos por Cunha et al. (2019) em reator UASB sob condições mesofílicas (30°C). A relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ no valor de 1,0 foi escolhida justificada pela remoção de sulfato de $(79 \pm 11)\%$ quando o TDH era de 14 h e a carga volumétrica de sulfato igual a $2,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A mudança no TDH de 24 h para 16 h, com uma carga de $2,25 \text{ g SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ foi o que provocou o ápice na remoção de sulfato no valor de $(92,1 \pm 1,8)\%$, juntamente com remoção de 80% da matéria orgânica (CUNHA et al., 2019).

A escolha do etanol como doador de elétrons teve como objetivo, favorecer o estabelecimento de populações sulfato redutoras (BRS), pois além de ser uma fonte de carbono facilmente degradável, também foi utilizado com sucesso por Vieira et al. (2016), Gil-Garcia et al. (2018) e Cunha et al. (2019) em trabalhos com redução de sulfato. Além disso, tem-se que levar em consideração seu baixo custo de produção no Brasil quando comparado aos países da Europa e os EUA (MAĆZYŃSKA et al., 2019).

Com relação à inoculação das espumas de PU, esta ocorreu conforme Zaiat; Cabral; Foresti (1994), isto é, o lodo granular ($\text{SVT} = 59,25 \text{ g L}^{-1}$) coletado no ano de 2015 de um

reator UASB em larga escala tratando água residuária de um abatedouro de aves (Avícola Dacar, Tietê- SP), que estava sendo reativado, foi triturado conforme Figura 5 e aplicado às tiras de espuma de PU por 2 h, já dentro do reator montado (devidamente alocado na câmara a 30°C), apenas sem a câmara de saída - Figura 4. O excesso de lodo foi drenado do reator e este começou a ser alimentado continuamente com a DAM sintética na condução das cinco fases relatadas na Tabela 3.

Figura 5- Esquema representativo da inoculação e começo da operação do reator AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3- Composição (mg L^{-1}) do meio sintético simulando a drenagem ácida de mina (DAM) durante os 300 dias de operação do reator na Etapa 1.

		Fase I (mg L^{-1})	Fase II (mg L^{-1})	Fase III (mg L^{-1})	Fase IV (mg L^{-1})	Fase V (mg L^{-1})
Metais	Mg	0,003	0,006	0,012	0,018	0,03
	Fe	10,0	20,0	40,0	60,0	100
	Zn	2,00	4,00	8,00	12,0	20,0
	Co	1,00	2,00	4,00	6,00	10,0
	Ni	1,00	2,00	4,00	6,00	10,0
	Cu	0,50	1,00	2,00	3,00	5,00
	Al	1,00	2,00	4,00	6,00	10,0
	Mn	3,00	6,00	12,0	18,0	30,0
Nutrientes	P	2,00	4,00	8,00	12,0	20,0
	N	1,50	3,00	6,00	9,00	15,0
	K	1,60	3,20	6,40	9,60	16,0
Número de amostras retiradas		14	18	14	8	17
Operação de cada fase (dia)		1-44	45-98	99-162	163-219	220-300

4.1.3 Avaliação de desempenho, métodos analíticos e cálculos

O reator AnSTBR foi monitorado tanto pela corrente gasosa quanto pela corrente líquida. As quantificações de sulfato, sulfeto total (ST) no líquido, demanda química de oxigênio (DQO) e pH, afluente e efluente, foram realizadas obedecendo às técnicas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

Os métodos para quantificação do sulfato e sulfeto total (ST) no líquido, em suas diversas formas, utilizaram um espectrofotômetro da marca Hach, sendo o sulfato determinado pelo kit Hach SulfaVer4 e o sulfeto por meio de kit Hach específico para análises de sulfeto. Para a DQO, foi utilizado o método colorimétrico de refluxo fechado 5220 D e a DQO do sulfeto foi descontada adicionando sulfato de zinco na amostra (pontinha da espátula de metal; quantidade em excesso) e submetendo-a a centrifugação (1500 rpm) por três minutos. Os efeitos dos sólidos orgânicos na DQO também foram descontados por filtração da amostra em membrana de 0,45 µm. O pH foi medido de acordo com o método eletrométrico 4500-H⁺ B.

A especiação de sulfeto foi contabilizada usando os valores obtidos experimentalmente de ST no líquido, pH e a temperatura (T) admitida foi de 30°C. Assim, o valor de pK_a (6,9) foi calculado pela Equação 1.

$$pK_a = 7,257 + \exp(-0,00172 \times T)$$

Equação 1

A Equação 2 foi utilizada para obter as frações de sulfeto na forma ionizada ([HS⁻]) e aquosa ([H₂S]_{aq}). O pH utilizado nessa fórmula é o pH do efluente tratado.

$$pH = pK_a + \log \frac{[HS^-]}{[H_2S]_{aq}} = pK_a + \log \frac{[HS^-]}{[ST] - [HS^-]}$$

Equação 2

Cálculos adicionais foram feitos para a determinação do fluxo de elétrons associado à remoção de matéria orgânica nas vias metanogênica e sulfetogênica (Equação 3 e Equação 4). As porcentagens de DQO utilizadas pelos organismos metanogênicos (DQO_{CH₄}) e pelas BRS (DQO_{BRS}), foram determinadas de acordo com Godoi; Foresti e Damianovic (2017). Nesse caso, os cálculos incluíram uma relação estequiométrica de 0,67 g DQO g⁻¹SO₄²⁻ (LENS et al., 1998), a qual representa a quantidade teórica de matéria orgânica completamente

oxidada pelas BRS no processo sulfetogênico. Os termos DQO_{removida} e $SO_4^{2-} \text{ removido}$ são respectivamente as remoções de DQO e sulfato (mg L^{-1}) obtidas experimentalmente.

$$DQO_{\text{CH}_4}(\%) = \left(\frac{DQO_{\text{removida}} - 0.67 \times SO_4^{2-} \text{ removido}}{DQO_{\text{removida}}} \right) \times 100$$

Equação 3

$$DQO_{\text{BRS}}(\%) = \left(\frac{0.67 \times SO_4^{2-} \text{ removido}}{DQO_{\text{removida}}} \right) \times 100$$

Equação 4

A alcalinidade parcial (AP) foi medida usando o método titulométrico 2320B proposto por DiLallo e Albertson (1961) e com a concentração de sulfeto na forma ionizada foi possível estimar a alcalinidade teórica devido ao íon bissulfeto (A_{HS^-}) (GODOI et al., 2017) (Equação 5). A concentração de HS^- é a concentração molar obtida pela Equação 2.

$$A_{\text{HS}^-} (\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}) = [\text{HS}^-] \times 50.000$$

Equação 5

As concentrações de ácidos voláteis totais (AVT) também foram medidas pelo método titulométrico (Ripley et al., 1986) e sua composição foi determinada por cromatografia em fase líquida, realizada com detecção de ionização por chama (GC/FID; modelo GC-2010, Shimadzu Scientific Instruments) (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).

A composição do biogás (CH_4 , CO_2 , N_2 e H_2S) foi analisada por cromatografia em fase gasosa com detecção de condutividade térmica (GC/TCD; modelo GC-2014AT, Shimadzu Scientific Instruments), equipado com coluna HP-PLOT/Q (30m x 0,54mm x 40 μm), utilizando hidrogênio como gás de arraste (LEBRERO et al., 2015).

As análises de composição dos metais e de estruturas cristalinas na biomassa descartada, inóculo (já triturado) e a biomassa no final da operação do reator, foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG) e sistema de análise química qualitativa e quantitativa OXFORD para detecção de elementos entre Boro e Urânio (EDX). Para essa análise, todas as amostras foram todas colocadas em fundo de carbono e tiveram seu recobrimento com ouro.

4.1.4 Análise de biologia molecular

O inóculo e amostras da biomassa suspensa no leito do reator e aderida na espuma de poliuretano foram submetidos à análise de biologia molecular para caracterização da comunidade microbiana presente em cada uma delas. As amostras da biomassa suspensa e aderida foram retiradas do reator, abrindo-o minimamente para a coleta de um pedaço pequeno da espuma (aproximadamente 2 cm) e um pouco da biomassa suspensa no leito, assim que a operação completou 300 dias. Estas foram centrifugadas o suficiente para se ter apenas o material biológico de interesse para se guardar em solução de PBS (tampão fosfato-salino) até o dia da extração de DNA. A Figura 6 é uma adaptação da Figura 5 para apresentar em quais momentos foram separadas as amostras para a biologia molecular.

As extrações do DNA total das amostras foram realizadas com esferas de vidro, fenol e clorofórmio, conforme descrito por GRIFFITHS et al. (2000). A amplificação do DNA (empresa GenOne soluções em biotecnologia), pela técnica de PCR, foi feita no gene 16S RNAr, regiões 16SV4/16SV3-V4, utilizando os primers específicos (Região 16S V3V4, primers 341F / 806R - NGS grade - Fragmentos de ~470bp - Para bactérias e Região 16S V4, primers U519F / 806R - NGS grade - Fragmentos de ~288bp - Para arqueias) para os domínios bactéria e arqueia, seguida de sequenciamento na plataforma IlluminaHiSeq2500. A leitura das 250 pb pareadas foram geradas usando a ferramenta FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>).

Com o auxílio do software PAST (Paleontological Statistic Software) e com os resultados do sequenciamento para os domínios Bactéria e Arqueia das três amostras analisadas (inóculo, biomassa aderida e biomassa suspensa), foi possível obter os índices de diversidade (Shannon-Weaver), dominância e riqueza (Chao-1).

Figura 6- Figura representativa de quando foram separadas as amostras de inóculo e da biomassa (aderida e suspensa) para a análise de biologia molecular da Etapa 1, fase de operação do AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

4.2 Etapa experimental 2- Planejamento experimental para a avaliação da influência dos metais na concentração de sulfato

Conforme já exposto anteriormente, alguns elementos químicos são necessários nos processos biológicos, pois desempenham papéis essenciais no metabolismo celular, principalmente como cofatores enzimáticos. Entretanto, a gama de conhecimento em termos desse assunto ainda é limitada, principalmente em relação ao processo sulfetogênico, tornando a seleção dos metais traço e suas concentrações uma tarefa árdua quando se objetiva a otimização da redução de sulfato.

A partir das evidências relatadas, nesta segunda etapa experimental (Etapa 2), propôs-se avaliar a influência dos metais utilizados na primeira etapa (Etapa 1) sobre a concentração de sulfato residual no efluente tratado, utilizando o planejamento experimental. Esta é uma ferramenta estatística que avalia e identifica os efeitos que as variáveis de entrada (*inputs*) causam nas variáveis respostas (*outputs*), sejam elas influenciadoras de forma positiva ou negativa, para que assim sejam feitas mudanças, quando necessárias, para se obter a melhora e otimização de um processo ou sistema (MONTGOMERY, 2001)

O planejamento experimental se dividiu em dois momentos complementares, designados de Etapa 2A e Etapa 2B. Na Etapa 2A foi utilizada a metodologia estatística clássica de planejamento experimental fatorial para a triagem de variáveis chamada Plackett-Burman design (PBD), que avalia o efeito simultâneo de vários fatores e também do conjunto,

mas não são contabilizados os efeitos de interações entre os fatores, pois acabam sendo ocultados pelos efeitos principais devido ao tamanho pequeno da amostra (MONTGOMERY, 2001; SILVEIRA, 2003; EKPENYONG et al., 2017). Além disso, os efeitos obtidos pelo PBD são otimizados por meio do método da superfície de resposta e a construção de um modelo matemático capaz de avaliar o resultado do planejamento experimental, prevendo condições ideais para os fatores (EKPENYONG et al., 2017).

A partir do resultado da Etapa 2A, em que foi definido o elemento químico cobalto como influenciador positivo na minimização da concentração de sulfato residual no efluente tratado, foi realizado um experimento de um fator simples (Etapa 2B), estipulando o fator “base” e depois outros fatores com um intervalo constante. A resposta desse experimento mostra como a variável resposta é influenciada por cada fator quando os outros são considerados constantes. No entanto, também não é considerada a interação dos fatores (MONTGOMERY, 2001; SILVEIRA, 2003; EKPENYONG et al., 2017).

A Figura 7 mostra um esquema representativo de toda a Etapa 2.

Figura 7- Esquema representativo da Etapa experimental 2.

Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Definição das Etapas 2A (Plackett-Burman) e 2B (ensaio de um fator simples).

A fim de saber se algum metal utilizado na Etapa 1, destacado na Tabela 3, foi responsável pela melhora de eficiência do processo sulfetogênico durante toda a operação do AnSTBR, propôs-se utilizar os mesmos metais componentes do meio sintético simulando a DAM, aplicando o teste de Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) na Etapa 2A.

Assim, dentre os 8 metais (Mg, Fe, Zn, Co, Ni, Cu, Mn e Al) presentes na DAM sintética, apenas 7 foram avaliados no teste, pois buscava-se otimizar o teste escolhendo apenas os metais que realmente poderiam ter tido um efeito significativo na concentração de sulfato residual (variável resposta) no efluente tratado. Para tanto, baseando-se em Madigan et al. (2016), os metais escolhidos para o teste foram: Fe, Zn, Co, Ni, Cu e Mn, por serem considerados metais traço para os microrganismos, além do Mg, essencial à maioria dos microrganismos. O Al foi descartado por ser considerado não essencial aos microrganismos.

Com o resultado da Etapa 2A, definiu-se a Etapa 2B, ou seja, o metal cobalto resultado da Etapa 2A foi avaliado sob diferentes concentrações (10, 30, 50, 70 e 90 mg L⁻¹), a fim de se identificar a melhor concentração do elemento para a otimização da minimização da concentração de sulfato residual no efluente tratado.

4.2.2 Materiais, procedimentos e delineamentos experimentais das Etapas 2A e 2B

As Etapas 2A e 2B foram realizadas em batelada a fim de se ter uma resposta rápida. Para a Etapa 2A, foram utilizados, no total, 20 frascos de vidro com volume nominal de 500 mL e para a Etapa 2B, foram apenas 10 frascos, incluindo 2 frascos de controle. Ambos os ensaios foram realizados em duplicatas, exceto o frasco de ponto central que era uma quadruplicata na Etapa 2A do teste de Plackett-Burman.

Em ambos os experimentos todos os materiais utilizados eram lavados com solução de ácido nítrico (20%) por um período de 12 horas para assegurar que não houvesse nenhuma interferência nos resultados, o que também impossibilitou um planejamento experimental mais complexo e com mais variáveis, devido às condições exigidas no laboratório de espaço e tempo.

Como o objetivo desta segunda etapa experimental era simular as condições operacionais próximas do AnSTBR da Etapa 1 e avaliar qual ou quais metais que compunham a DAM sintética da Etapa 1 teve ou tiveram influência na concentração de sulfato residual do efluente tratado biologicamente no AnSTBR, todos os frascos eram compostos por um volume líquido reacional de 200 mL, composto pela DAM sintética, mais o doador de elétrons (etanol) e 10 cubos de espumas inoculadas, os quais eram retiradas do AnSTBR e

cortadas com 1 cm de aresta. A Figura 8 resume e mostra, simplificada, a montagem dos frascos nos experimentos e os detalhes serão apresentados no decorrer do texto.

Figura 8- Esquema simplificado de como foram montados os frascos para os ensaios da segunda etapa experimental (Etapas 2A e 2B).

Fonte: Próprio autor.

A composição da DAM sintética utilizada na Etapa 2A foi apresentada na Fase I da Tabela 3 do item 3.1 desta tese, cujas concentrações de metais e nutrientes foram as mais baixas avaliadas. A justificativa para tal escolha foi devido ao AnSTBR ainda estar sendo mantido em operação após os 300 dias da Etapa 1 com a composição da DAM sintética apresentada na Fase V (Tabela 3 – item 3.1) e portanto os microrganismo estavam adaptados à essas condições operacionais e não seria possível observar o que impulsionou à melhora na eficiência da remoção de sulfato observada na Etapa 1, de fase a fase. Assim, no dia 357, o reator começou a ser alimentado com a composição da DAM descrita para a Fase I e se estendeu até o final da Etapa 2B.

Para entender como aconteceu o processo de inoculação da biomassa utilizada na Etapa 2A e 2B é preciso voltar à descrição do AnSTBR no item 4.1.1 desta tese, quando é descrito que o reator possuía em seu interior, oito hastes revestidas com espumas de PU que

foram o meio suporte para a adesão dos microrganismos. Estas foram mantidas intactas e o reator fechado em operação e condição de anaerobiose até o dia 576 (mudando apenas a composição da alimentação todo esse tempo).

No primeiro dia da Etapa 2A, dia 577, o AnSTBR foi aberto e seis hastes contendo os microrganismos imobilizados foram retiradas e substituídas por novas, mantendo-se apenas duas originais que estavam no reator desde o primeiro dia da Etapa 1. Essas espumas novas foram retiradas do AnSTBR somente após 30 dias (dia 607) para garantir completa inoculação pelos microrganismos ali presentes.

No dia 607, as hastes inoculadas para a Etapa 2A foram retiradas do AnSTBR e novas seis hastes foram colocadas para a Etapa 2B, mantidas também por 30 dias dentro do reator. Tais hastes revestidas com espumas de PU, retiradas do reator, eram cortadas em cubos de 1 cm de aresta e separadas por grupos de 10 para serem adicionadas em todos os frascos do experimento, após a adição do meio líquido representativo da DAM sintética utilizada na Etapa 1.

A fonte de carbono, o etanol, era o último componente a ser adicionado nos frascos, cuja concentração era equivalente a $1500 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, e nesse momento, iniciava-se o teste tirando amostras para sulfato e DQO no tempo “zero”. Após isso, gás nitrogênio era fluxionado por 5 min para garantir a anaerobiose e os frascos eram levados à mesa agitadora da Marca Infors HT (Multitron Pro) a 30°C e 120 rpm. A Etapa 2A durou 13 dias e as amostras eram retiradas duas vezes ao dia, enquanto a Etapa 2B teve duração de 5 dias, com amostras retiradas uma vez ao dia.

A Tabela 4 e a Tabela 5 foram geradas pelo software Statistica 13.4 (TIBCO Software Inc., EUA) a partir do conceito do delineamento experimental de Plackett-Burman feito na Etapa 2A. Na Tabela 4 estão os sete fatores que foram investigados (Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mg e Zn) e os níveis (alto nível, baixo nível e ponto central) codificados com os valores reais de concentração. O alto nível é representado pelas concentrações dos elementos químicos da Fase V (Tabela 3 – item 3.1), o baixo nível pelas concentrações da Fase I (Tabela 3 – item 3.1) e o ponto central representavam a metade do intervalo entre os fatores de alto e baixo nível. Já na Tabela 5 tem-se a matriz codificada do planejamento com as concentrações dos fatores utilizados em cada ensaio, com os níveis entre parênteses.

Alguns compostos químicos que compõem a DAM sintética da Fase 1 (Etapa 1) não estão na Tabela 4, pois foram igualmente adicionados em todos os frascos de ambos os experimentos (Etapa 2A e 2B), incluindo os controles (concentração zero de cobalto da Etapa 2B). São eles: a fonte de nutrientes- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{O}$ ($34,1 \text{ mg L}^{-1}$); NH_4Cl ($57,7 \text{ mg L}^{-1}$) e

KH_2PO_4 (56,0 mg L⁻¹), a fonte de sulfato e o elemento químico alumínio (Al)- Na_2SO_4 (1892,7 mg L⁻¹); $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16 \text{H}_2\text{O}$ (235,0 mg L⁻¹).

Tabela 4- Fatores e seus níveis codificados no planejamento experimental Plackett–Burman, Etapa 2A.

Fatores (mg L ⁻¹)/Níveis	-1	0 (ponto central)	+1
Fe	10,0	45,0	100,0
Ni	1,0	4,5	10,0
Co	0,998	4,49	9,98
Cu	0,499	2,24	4,99
Mn	3,0	13,5	30,0
Mg	0,003	0,016	0,035
Zn	2,0	9,0	20,0

Tabela 5- Matriz com as concentrações dos metais adicionados no planejamento experimental Plackett–Burman, Etapa 2A.

Concentrações (mg L ⁻¹) dos metais adicionados em cada ensaio							
Ensaio	Fe	Ni	Co	Cu	Mn	Mg	Zn
1	10,0 (-1)	1,00 (-1)	0,998 (-1)	4,99 (1)	30,0 (1)	0,035 (1)	2,00 (-1)
2	100,0 (1)	10,0 (1)	0,998 (-1)	4,99 (1)	3,00(-1)	0,003 (-1)	2,00 (-1)
3	100,0 (1)	1,00 (-1)	9,98 (1)	0,499 (-1)	30,0 (1)	0,003 (-1)	2,00 (-1)
4	100,0 (1)	10,0 (1)	9,98 (1)	4,99 (1)	30,0 (1)	0,035 (1)	20,0 (1)
5	100,0 (1)	1,00 (-1)	0,998 (-1)	0,499 (-1)	3,00 (-1)	0,035 (1)	20,0 (1)
6	10,0 (-1)	10,0 (1)	0,998 (-1)	0,499 (-1)	30,0 (1)	0,003 (-1)	20,0 (1)
7	10,0 (-1)	1,00 (-1)	9,98 (1)	4,99 (1)	3,00 (-1)	0,003(-1)	20,0 (1)
8	10,0 (-1)	10,0 (1)	9,98 (1)	0,499 (-1)	3,00 (-1)	0,035 (1)	2,00 (-1)
9*	45,0 (0)	4,50 (0)	4,49 (0)	2,24(0)	13,5 (0)	0,016 (0)	9,00 (0)
10*	45,0 (0)	4,50 (0)	4,49 (0)	2,24(0)	13,5 (0)	0,016 (0)	9,00 (0)

*Ponto central

Na Etapa 2B foi feito um ensaio de um fator simples (*one by one*), iniciado no dia 637, realizado exatamente conforme toda a descrição feita para a Etapa 2A. Nesta etapa, por utilizar o resultado obtido na Etapa 2A o qual mostrou que somente o cobalto tinha efeito positivo sobre a concentração de sulfato residual, a DAM sintética composta pelos vários

metais foi substituída por uma solução que continha apenas esse metal, pois somente ele foi o avaliado na Etapa 2B. Assim, os frascos da Etapa 2B eram compostos pela solução de cobalto, as fontes de nutrientes, de sulfato e de alumínio, mais o etanol e os 10 cubos (1cm de areta) de espumas inoculadas. É importante destacar que, para a DAM sintética na Etapa 2A, o pH inicial dentro dos frascos era entre 5,0 e 6,0 e para a solução de cobalto na Etapa 2B, o pH inicial era de 4,0.

A concentração do cobalto foi variável nos frascos avaliados da Etapa 2B, sendo os teores definidos com base na literatura e nos resultados obtidos para a Etapa 2A, pois como o cobalto é um metal traço, sendo a concentração deste elemento para os microrganismos, bem baixa. Por exemplo, Takashima; Shimada e Speece (2011) ressaltam concentração de cobalto na ordem de $(0,16 \pm 0,01) \text{ mg L}^{-1}$ para condições mesofílicas e $(0,51 \pm 0,02) \text{ mg L}^{-1}$ em condições termofílicas na fermentação metanogênica. Já Bekmezci et al. (2011) referiram concentração de 10 mg L^{-1} de cobalto em sistema sulfetogênico tratando DAM e por isso tomou-se como a concentração mínima de cobalto a ser avaliada na Etapa 2B o valor de 10 mg L^{-1} .

Definido o valor base da concentração de cobalto a ser avaliada, definiu-se um intervalo entre os valores de 20 mg L^{-1} e que o valor máximo seria até dez vezes o valor mínimo da concentração, não descartando a possibilidade de avaliar a toxicidade dos teores para com as BRS. Dessa forma, avaliadas as concentrações de 10, 30, 50, 70 e 90 mg L^{-1} . Entretanto, a concentração de 70 mg L^{-1} não apresentou resultados dos frascos em duplicata replicáveis e por isso foi descartada.

4.2.3 Monitoramento dos frascos, análises químicas e métodos avaliativos

Em toda a Etapa experimental 2 foi realizado o monitoramento do decaimento da concentração de sulfato como parâmetro principal e a DQO foi monitorada na Etapa 2B como parâmetro secundário apenas para verificar o consumo do etanol frente ao consumo de sulfato. As análises de sulfato e DQO foram determinadas conforme descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), método turbidimétrico 4500 E e método colorimétrico de refluxo fechado 5220 D, respectivamente.

As avaliações dos experimentos foram feitas baseando-se na concentração de sulfato em cada ponto e foi feito o ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados de sulfato residual e DQO na Etapa 2B. Para tanto, é importante saber que a Etapa 2A teve um período de duração de 13 dias, com duas amostragens ao dia, e a Etapa 2B de apenas 5 dias, com uma amostragem por dia. Os experimentos foram finalizados apenas quando houve uma

estabilização no valor de concentração de sulfato residual no efluente tratado por três amostragens seguidas e a média desses valores, em cada tempo, foi submetida à análise de variância (ANOVA). Após tal avaliação, apenas os parâmetros com valor “p” próximo ao nível significância de 10% foram mantidos no modelo para aproximar o R-ajustado para o R², que são os coeficientes de correlação da regressão linear.

A Equação 6 mostra o modelo cinético de primeira ordem utilizado nos dados da Etapa 2B, tanto para a concentração de sulfato, quanto para as concentrações de DQO.

$$C_S(t) = C_{S_{\text{residual}}} + (C_{S0} - C_{S_{\text{residual}}}) * e^{-kt}$$

Equação 6

Em que:

$C_{S_{\text{residual}}}$: Concentração de sulfato residual (mg L⁻¹); C_{S0} : Concentração de sulfato inicial (mg L⁻¹); k: constante cinética (dia⁻¹); t: tempo (dia); $C_S(t)$: Concentração de sulfato em cada tempo “t” de amostragem.

4.3 Etapa experimental 3- Estudo da precipitação dos metais (Zn, Ga e Ge) com sulfeto

Essa etapa do doutorado foi desenvolvida durante seis meses na Universidade Nacional da Irlanda, a NUI Galway. Conforme já mencionado no item de revisão da literatura, os metais provenientes de DAM podem ser precipitados juntamente com o sulfeto produzido na redução de sulfato nos reatores anaeróbios, formando precipitados insolúveis, os sulfetos metálicos, permitindo a recuperação dos metais isoladamente. Diante disso, viu-se o interesse em estudar o processo de precipitação do zinco, tomando-o como metal modelo, visto que o elemento químico é comumente encontrado em DAMs e possui apenas um estado de oxidação, bem como avaliar a precipitação de metais raros, o gálio e o germânio, os quais aparecem nos resíduos de mineração de zinco e têm alto valor agregado para as indústrias.

4.3.1 Procedência das fontes de sulfeto (químico e biológico) e dos metais

A fonte química de sulfeto foi proveniente do composto Na₂S.9H₂O e a fonte de sulfeto biológico foi retirado de um reator operado em batelada utilizando grãos de cevada como doador de elétrons de lenta liberação para redução de sulfato. O grão de cevada foi coletado de uma cervejaria em Galway e o lodo anaeróbio foi coletado de um reator metanogênico que tratava águas residuárias de laticínios na Irlanda.

O reator em batelada, do qual se retirava as alíquotas da fonte biológica de sulfeto para os experimentos e as quais não passavam por nenhum tratamento antes de ser adicionado aos tubos falcon, havia sido operado em triplicata por 23 dias e em condição mesofílica

(30°C). A concentração inicial de sulfato foi igual a (1480 ± 27) mg L⁻¹ e a concentração de sulfeto dissolvido total no líquido, frequentemente monitorada antes da sua utilização nos testes de precipitação, esteve sempre em torno dos 300 mg L⁻¹.

Antes da inicialização dos testes, as soluções estoque de metais e de sulfeto químico foram preparadas com água milli-Q para facilitar o manuseio, assegurar que não houvesse interferência de outros metais nos resultados e para diminuir os erros sistemáticos. Todas as soluções tinham um volume final de 1 litro, cujas concentrações eram: 1000 mg L⁻¹ de sulfeto químico, 100 mg Zn L⁻¹ preparada com ZnCl₂, 200 mg Ga L⁻¹ e 200 mg Ge L⁻¹, preparadas com GaCl₃ e GeCl₄, respectivamente.

4.3.2 Montagem dos testes de precipitação de metais

Três testes foram montados e definidos pela razão metal-sulfeto (Me/S²⁻), sendo que a concentração de sulfeto era variável em cada teste e a concentração dos metais era fixa.

Para decidir a concentração dos metais a ser usada nos testes, consultou-se a literatura e verificou-se que as concentrações dos metais lixiviados com ácido sulfúrico são encontrados na ordem de 4900 mg Zn L⁻¹, 6,25 mg Ga L⁻¹ e 27,5 mg Ge L⁻¹ (RAO et al., 2019).

Diante das concentrações encontradas em Rao et al. (2019), adotou-se uma concentração igual e fixada para todos os três metais (Zn, Ga e Ge) no valor de 10 mg L⁻¹ em qualquer teste. Esta concentração pode até ser considerada baixa considerando que no lixiviado a concentração dos metais são bem maiores para o germânio e o zinco, porém levou-se em consideração que os sais de gálio e germânio são bastantes caros para compra e inviabiliza concentrações muito alta dos metais.

Após a definição das concentrações dos metais, foram também definidas as concentrações de sulfeto que seriam utilizadas para cada um dos três testes. As concentrações definidas foram: 50, 6,67 e 20 mg L⁻¹ e, conseqüentemente, as relações Me/S²⁻ (teóricas) em cada teste foram: 0,2 para o primeiro teste, 1,5 para o segundo e o terceiro tinha razão igual a 0,5. Tais escolhas foram definidas a fim de se ter o mínimo de erros e interferências externas possíveis, respeitando também o volume das soluções estoque e o sulfeto biológico que seriam utilizados nos três testes. As alíquotas de sulfeto e das soluções de metais eram sempre manuseadas com seringa e agulha ou pipeta, quando possível.

Cada um dos três testes foi realizado com um total de 16 tubos falcon de 50 mL, pois cada metal foi avaliado em duplicata (dois para sulfeto químico e dois para sulfeto biológico) e o mesmo foi feito para a mistura dos metais (Zn+Ga+Ge). A escolha do uso dos tubos

falcon foi devido a facilidade de realizar três testes ao mesmo tempo, fazendo os mesmos procedimentos e, conseqüentemente, minimizando os erros, tornando assim os resultados mais confiáveis e replicáveis. Ademais, o fundo cônico do falcon também é propício à precipitação.

A Figura 9 mostra como foi a montagem dos testes com o total de 16 tubos cada.

Figura 9- Esquema representativo da montagem de cada teste composto pelos 16 tubos falcon, mantidos a temperatura ambiente (25°C), e dentro de uma caixa de fibra de papelão- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Vale ressaltar que alguns testes já haviam sido feitos com volumes maiores em funis de separação com volumes de 250 mL, mas os resultados (não mostrados) não foram replicáveis e satisfatórios, o que impulsionou a mudança da metodologia aplicada para os tubos falcon e um período maior de duração dos experimentos (5 dias e não mais um único dia).

Cada um dos 16 tubos era composto pela solução do metal ou metais e pela fonte de sulfeto química ou biológica. Para tanto, foi calculado quanto das soluções estoque (sulfeto e metais) deveria ser adicionado dentro dos tubos para corresponder às concentrações desejadas. O volume total de líquido dentro de cada tubo deveria ser 30 mL e, por isso, o que faltava de líquido após a adição das soluções estoque de metais e sulfeto era sempre preenchido com água milli-Q.

A Tabela 6 traz todos os valores calculados das soluções de metal, de sulfeto (química ou biológica) e água, adicionados em cada duplicata em suas respectivas condições.

O pH do líquido não foi ajustado, pois acreditava-se que a adição de um composto extra pudesse interagir com outros já presentes ali no meio, mas este parâmetro foi monitorado no início e fim de cada teste.

A temperatura do teste era ambiente, em torno de $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$, e os testes eram mantidos dentro de caixas de fibra de papelão próprias para tubos falcon.

Tabela 6- Volumes (mL) adicionados nos tubos falcon correspondentes à água Milli-Q, solução de sulfeto (químico e biológico) e solução estoque de metais (Zn, Ga, Ge) na Etapa 3.

		Volumes (mL)				
		Sulfeto Químico	Sulfeto Biológico	Metais	Água (Químico)	Água (Biológico)
Primeiro Teste (Me/S ²⁻ =0,2)	Zn	2,18	6,04	3,00	24,82	20,96
	Ga	2,18	6,04	1,50	26,32	22,46
	Ge	2,18	6,04	1,50	26,32	22,46
	Zn+Ga+Ge	2,18	6,04	3,00+1,50+1,50	21,82	17,96
Segundo Teste (Me/S ²⁻ =1,5)	Zn	0,33	1,05	3,00	26,67	25,95
	Ga	0,33	1,05	1,50	28,17	27,45
	Ge	0,33	1,05	1,50	28,17	27,45
	Zn+Ga+Ge	0,33	1,05	3,00+1,50+1,50	23,67	22,95
Terceiro Teste (Me/S ²⁻ =0,5)	Zn	1,00	3,16	3,00	26,00	23,84
	Ga	1,00	3,16	1,50	27,50	25,34
	Ge	1,00	3,16	1,50	27,50	25,34
	Zn+Ga+Ge	1,00	3,16	3,00+1,50+1,50	23,00	20,84

4.3.3 Amostragem e métodos analíticos

O monitoramento da precipitação de metais foi realizado coletando amostras líquidas, com o auxílio de pipeta, uma vez ao dia por um período total de 5 dias, que foi o tempo de duração dos testes. Nas amostras líquidas diárias se media o sulfeto total (ST) dissolvido no líquido conforme descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012) e também mensuradas as concentrações de metais (Zn, Ga e Ge) por Espectroscopia de Emissão Plasma-Atômica Indutivamente Acoplada (ICP-AES) da marca Agilent- modelo 5110.

O pH foi medido apenas no início e final de cada teste também seguindo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

No último dia dos testes (5º dia), além de parte das alíquotas de amostras serem utilizadas para as realizações das análises supracitadas, outra parte foi utilizada por mais outras duas metodologias, a saber:

- (i) Aproximadamente 10 mL das amostras líquidas do último dia foram colocadas por 12 horas no congelador a -80°C e depois secas por uma semana em um liofilizador de bancada da marca Buchi L-200, tornando-as pó. Estas amostras em pó serviram para a captura de imagens por microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva por raios X (MEV/EDX), sendo realizada no centro de microscopia e imagem da NUIG no equipamento: *Hitachi S2600N Variable Pressure Scanning Electron Microscope*. As amostras foram colocadas em fundo de carbono e tiveram seu recobrimento com ouro;
- (ii) 3,5 mL foram utilizados para a obtenção dos espectros de fluorescência no modo matriz excitação-emissão (FEEM) foram obtidos de amostras líquidas da finalização do teste, sem prévio tratamento. O equipamento utilizado foi o RF-6000 *Fluorescence Spectrophotometer* da marca Shimadzu e o intervalo de varredura dos comprimentos de onda de emissão e excitação variaram de 200 a 300 nm, com velocidade de escaneamento de 2000 nm por minuto. O intervalo de comprimento de onda tomou como referência o artigo de Locquet e Cordella (2018) que relatam o intervalo de 200 a 500 nm de excitação para amostras de águas e águas residuárias.

A Figura 10 resume toda a Etapa 3 e mostra como foi a organização das amostras analisadas em cada metodologia.

Figura 10- Esquema representativo com todas as amostras da Etapa 3 e a organização das análises físico-químicas feitas nos testes.

Primeiro Teste $Me/S^{2-} = 0,2; 50 \text{ mg-}S^{2-} L^{-1}$		Segundo Teste $Me/S^{2-} = 1,5; 6,67 \text{ mg-}S^{2-} L^{-1}$		Terceiro Teste $Me/S^{2-} = 0,5; 20 \text{ mg-}S^{2-} L^{-1}$	
Duplicata Zn* (S^{2-} químico)	Duplicata Zn* (S^{2-} biológico)	Duplicata Zn (S^{2-} químico)	Duplicata Zn* (S^{2-} biológico)	Duplicata Zn (S^{2-} químico)	Duplicata Zn (S^{2-} biológico)
Duplicata Ga* (S^{2-} químico)	Duplicata Ga* (S^{2-} biológico)	Duplicata Ga* (S^{2-} químico)	Duplicata Ga* (S^{2-} biológico)	Duplicata Ga* (S^{2-} químico)	Duplicata Ga* (S^{2-} biológico)
Duplicata Ge* (S^{2-} químico)	Duplicata Ge* (S^{2-} biológico)	Duplicata Ge (S^{2-} químico)	Duplicata Ge* (S^{2-} biológico)	Duplicata Ge (S^{2-} químico)	Duplicata Ge (S^{2-} biológico)
Duplicata Zn+Ga+Ge* (S^{2-} químico)	Duplicata Zn+Ga+Ge* (S^{2-} biológico)	Duplicata Zn+Ga+Ge (S^{2-} químico)	Duplicata Zn+Ga+Ge* (S^{2-} biológico)	Duplicata Zn+Ga+Ge (S^{2-} químico)	Duplicata Zn+Ga+Ge (S^{2-} biológico)

➤ Monitoramento diária da concentração de sulfeto (ajuste cinético de primeira ordem) e dos metais durante todo o teste.

➤ Foi medido o pH inicial e final em cada teste

➤ Análise de FEEM feita em todas as amostras

*Amostras submetidas à análise de MEV/EDX

Fonte: Próprio autor.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são mostrados os resultados obtidos em toda a parte experimental e a discussão embasada no levantamento bibliográfico, de forma a aceitar ou refutar as hipóteses previamente apresentadas.

5.1 Etapa experimental 1- Operação do AnSTBR

Neste item da tese serão apresentados todos os resultados e discussões pertinentes à primeira etapa experimental, que foi a operação do AnSTBR por 300 dias submetido ao aumento gradual na concentração dos sais que compunham o meio sintético, simulando DAM. Após os 300 dias, o reator anaeróbio foi aberto para a retirada de amostra da biomassa suspensa no leito e também da biomassa aderida na espuma do material suporte. Estas duas, mais a amostra do inóculo, retirada antes de iniciar a operação do AnSTBR, foram submetidas ao sequenciamento genético do gene RNAr 16S para saber quais as populações predominantes em cada amostra e os resultados e discussão também serão apresentados nesta seção.

A Figura 11 mostra um esquema de como foram divididos os resultados da Etapa 1.

Figura 11- Esquema representativo da divisão dos resultados da Etapa 1.

Fonte: Próprio autor.

5.1.1 Desempenho geral do reator AnSTBR

O AnSTBR foi monitorado continuamente por 300 dias, com carga orgânica volumétrica (COV) e carga de sulfato volumétrica (CSV) iguais e fixadas em $2,25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os primeiros 60 dias de operação do reator foram essenciais para a adaptação da biomassa com o aumento da concentração de metais e nutrientes (ferro, manganês, magnésio, zinco, cobre, nitrogênio, fosfato, entre outros). A Tabela 7 resume todos os resultados obtidos em todo o período de operação do reator, dividido por fases.

No geral, a estratégia operacional de aumento gradativo das concentrações de metais e nutrientes provenientes da DAM sintética permitiu uma melhoria crescente na eficiência de desempenho do AnSTBR, visto que, conforme evidenciado na comparação dos resultados entre a Fase I e Fase V- Tabela 7, a redução de sulfato variou de 42 a 83% e a remoção de matéria orgânica entre 78 e 90%.

Na Tabela 7 também é possível verificar o aumento da alcalinidade parcial (AP) no efluente no valor de $(317 \pm 57) \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Fase I) para $(764 \pm 146) \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Fase V), contribuindo para o aumento do pH da DAM sintética, que inicialmente tinha um valor de $(3,9 \pm 0,3)$. A média do pH efluente entre as fases foi de $(7,0 \pm 0,1)$, sugerindo o estabelecimento progressivo de um ambiente anaeróbico sem adição externa de agentes alcalinizantes.

A fim de complementar e melhor visualizar os resultados apresentados na Tabela 7, foram construídas a Figura 12 e a Figura 13 que trazem os perfis temporais com relação às concentrações de AP, AVT e pH do efluente e as eficiências de remoção de sulfato e matéria orgânica (em termos de DQO) em cada estágio. Na Figura 12 também são mostrados dois descartes da biomassa suspensa no leito do reator que foram feitos nos dias 14 (Fase I) e 199 (Fase V), os quais serão melhor explicitados posteriormente.

Tabela 7- Resultados obtidos nos 300 dias de operação do AnSTBR, dividido nas 5 fases operadas (Etapa 1).

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
pH efluente	7,1±0,2	7,1±0,2	6,9±0,1	7,0±0,1	7,1±0,1
Eficiência de remoção de DQO(%) ⁽¹⁾	78 ±11	68±9	77±7	78±12	90±11
DQO _{CH₄} (%) ⁽¹⁾	64±12	54±14	62±7	54±8	31±10
DQO _{BRS} (%) ⁽¹⁾	36±12	46±14	38±7	46±8	69±10
Eficiência de remoção de sulfato (%)	42±9	45±8	49±6	59±6	83±7
C _{Sresidual} (mg L ⁻¹) ⁽²⁾	865±120	805±124	735±98	566±82	245±97
AP(mg CaCO ₃ L ⁻¹) ⁽³⁾	317±57	239±50	309±48	492±69	764±146
AVT (mg L ⁻¹) ⁽³⁾	424±176	591±110	507±107	455±157	413±106
ST (mg L ⁻¹) ⁽⁴⁾	224±48	299±40	213±64	199±51	296±62
HS ⁻ (mg L ⁻¹) ⁽⁴⁾	139±39	148±24	123±38	127±45	208±55
H ₂ S _(aq) mg L ⁻¹) ⁽⁴⁾	85±20	150±23	90±35	81±19	89±21
A _{BIC} (mg-CaCO ₃ L ⁻¹) ⁽²⁾	378±83	184±76	330±122	514±160	870±164
A _{HS⁻} (mg CaCO ₃ L ⁻¹) ⁽⁴⁾	210±59	224±37	187±57	193±68	314±84
Número de amostragens	14	18	14	8	17
Tempo de operação de cada fase (dias)	44	54	64	57	81

⁽¹⁾ DQO=demanda química de oxigênio; DQO_{CH₄}= porcentagem de DQO utilizada no processo metanogênico; DQO_{BRS}= porcentagem de DQO utilizada no processo sulfetogênico; ⁽²⁾ C_{Sresidual}: concentração de sulfato residual; ⁽³⁾ AP= Alcalinidade parcial, A_{BIC}= alcalinidade a bicarbonato; AVT=ácidos voláteis totais; ⁽⁴⁾ST= sulfeto total; H₂S_(aq) = sulfeto de hidrogênio aquoso; HS⁻= sulfeto de hidrogênio ionizado; A_{HS⁻}= Alcalinidade proveniente do sulfeto biogênico; ⁽⁵⁾ As fases operacionais estão descritas na Tabela 3 – item 4.1.2.

Figura 12- Perfil temporal de pH efluente(■), alcalinidade parcial (AP) em $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (▲) e ácidos voláteis totais (AVT) em mg L^{-1} (▼), ressaltando também os dois descartes de biomassa feitos nos dias 14 (Fase I) e 199 (Fase V)- Etapa 1, operação do reator AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

Figura 13- Resultados de eficiência de remoção de sulfato e demanda química de oxigênio (DQO) em termos de porcentagem (%) expressados por fases- Etapa 1, operação do reator AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

A geração de alcalinidade em sistemas anaeróbios, partindo do etanol, pode ser obtida por três vias. A primeira acontece pela oxidação completa do etanol via redução de sulfato (Reação 9), a segunda pela via metanogênica (Reação 12), após a oxidação do etanol em acetato por microrganismos acetogênicos (Reação 10; Saady, 2013), e a terceira acontece pelas BRS oxidantes incompletas (Reação 11; Zhou; Xing, 2015).

Algumas amostras das Fases IV e V foram submetidas a análise de cromatografia gasosa (GC) e indicaram a presença de acetato. Tal fato pode estar associado tanto à via acetogênica (Reação 10) quanto à via sulfetogênica por oxidação incompleta do etanol (Reação 11) (LENS et al., 1998; DAMIANOVIC; FORESTI, 2007). Porém, o padrão decrescente observado na concentração de acetato, de (601 ± 96) mg L⁻¹ a (311 ± 18) mg L⁻¹ (como também observado nas concentrações de AVT; Tabela 7 e Figura 12) sugere uma mudança na via sulfetogênica, isto é, da via de oxidação do etanol incompleta (Reação 11) para a completa (Reação 9). Isto também foi evidenciado pelo aumento da AP e do fluxo de elétrons da oxidação da matéria orgânica para a redução do sulfato, o qual é apresentado na Figura 14, em complementação à Tabela 7.

A fim de melhor entender os resultados apresentados na Figura 14, os dados podem ser agrupados pelas fases, ou seja, Fases I-III e Fases IV-V. Com isso, verificou-se que há uma predominância da utilização da DQO pelas arqueias metanogênicas entre as Fases I e III ($\text{DQO}_{\text{CH}_4} > 54\%$, Tabela 7 e Figura 14), porém tal fato foi modificado nas Fases IV-V, indicando que a conversão da matéria orgânica estava ocorrendo pela via sulfetogênica, atingindo seu máximo na Fase V com $\text{DQO}_{\text{BRS}} = 69\%$ (Tabela 7 e Figura 14). Corroborando com tal evidência, notou-se que, nas primeiras fases (Fases I-III), houve pequenas variações nas remoções de sulfato e DQO, de 42 a 49% e 68 a 78%, respectivamente (Tabela 7 e Figura 14) com variações mínimas nos valores de AP ($239\text{--}309$ mg CaCO₃ L⁻¹; Tabela 7 e Figura

14). Já na Fase V, as remoções de matéria orgânica e sulfato atingiram valores máximos, de $(90\pm 11)\%$ e $(83\pm 7)\%$, respectivamente (Tabela 7 e Figura 13), indicando a completa oxidação do etanol juntamente com a redução de sulfato (Reação 9) como a via metabólica primária. Concomitantemente, a queda observada nos valores de DQO_{CH_4} (Tabela 7 e Figura 14) relaciona-se à diminuição das frações de metano observadas no biogás nas Fases III a V, ou seja: $(61\pm 8)\%$, $(59\pm 7)\%$ e $(51\pm 6)\%$, respectivamente.

Figura 14- Frações da DQO utilizadas nos processos metanogênico (DQO_{CH_4}) e sulfetogênico (DQO_{BRS}) na Etapa 1 de operação do AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

A melhora na eficiência do reator em, principalmente, remover sulfato e aumentar a alcalinidade no sistema, pode estar intimamente relacionada com o aumento da disponibilidade de metais/nutrientes no meio a partir da Fase I até a Fase V e também à mudança da via de oxidação incompleta da matéria orgânica para a completa pelas relações estequiométricas apresentadas na Reação 9 e Reação 11, devido ao longo tempo de operação do AnSTBR.

A oxidação de quantidades iguais de etanol requer um consumo três vezes maior de sulfato na via de oxidação completa (Reação 9). Com base nos valores experimentais, a redução de sulfato foi aproximadamente dobrada ao comparar as Fases I e V, de $(42\pm 9)\%$

para $(83\pm 7)\%$, respectivamente, o que sugere alguma participação remanescente da oxidação incompleta na atividade sulfetogênica, como também evidenciado por concentrações residuais de acetato nas Fases IV e V, (601 ± 96) mg L⁻¹ e (311 ± 18) mg L⁻¹, respectivamente. Uma hipótese para essa discrepante mudança nos valores de remoção de sulfato, comprando a Fase I com a Fase V, é a falta de metais e nutrientes nas fases operacionais iniciais do AnSTBR, principalmente até a Fase III.

Schmidt et al. (2014) relacionaram o acúmulo de AVT com a deficiência de Fe e Ni em sistemas anaeróbios, favorecendo a via oxidativa incompleta. Tal fato está de acordo com o acúmulo de AVT observado principalmente nas Fases I e II (Tabela 7 e Figura 12). A carência de nutrientes e metais foi, pelo menos, minimizada a partir da Fase IV, refletindo na melhoria da redução de sulfato e remoção de matéria orgânica (DQO) (Tabela 7 e Figura 13). A menor dispersão dos dados em relação à redução de sulfato na Fase V (Figura 13) também sugere um processo mais estável.

Na literatura também é relatado que a suplementação de Fe impactou positivamente o processo sulfetogênico em experimentos em escala de bancada. Godoi; Foresti; Damianovic (2017) relataram a remoção completa do sulfato ao dosar até 400 mg-Fe L⁻¹ em um AnSTBR com escoamento descendente preenchido com anéis de polietileno de baixa densidade.

Choong et al. (2016) também relataram impactos positivos de Fe, Ni e Co no desempenho de sistemas anaeróbios para concentrações nas faixas de 1 a 100 mg Fe L⁻¹, 0,1 a 100 mg Ni L⁻¹ e 0,1 a 5 mg Co L⁻¹. Esses níveis estão de acordo com a faixa de valores de Fe e Ni aqui utilizados (Tabela 3- Item 4.1.2), exceto Co (concentração máxima equivalente a 10 mg L⁻¹, ou seja, duas vezes superior ao relatado pelos autores).

Apesar do que é relatado na literatura sobre concentrações dos elementos químicos em processos anaeróbios, ainda não há informações suficientes sobre como a disponibilidade de nutrientes afeta o metabolismo das BRS. Por exemplo, Dev; Roy; Bhattacharya (2017), como complemento ao estudo de El Bayoumy et al. (1999), encontraram concentrações ideais de nutrientes para o crescimento de BRS na ordem de 250 a 600 mg L⁻¹ (nitrogênio) e 50 mgL⁻¹ (fósforo), levando a uma relação DQO: N: P variando entre 100: 5: 1 e 100:12:1.

Lodos anaeróbios com baixo coeficiente de rendimento celular, acetogênicos e metanogênicos, requerem quantidades semelhantes de nitrogênio e fósforo, mas 10 vezes mais carbono com relação à proporção encontrada por Dev; Roy; Bhattacharya (2017) e El Bayoumy et al. (1999), ou seja, DQO: N: P=1000: 5: 1 (CHERNICHARO, 2007).

Ao aplicar o mesmo raciocínio para o presente estudo, verifica-se uma relação DQO: N: P variável de 750: 0,75: 1 (Fase I) a 75: 0,75: 1 (Fase V), com base nas concentrações de

nitrogênio e fósforo variando entre 1,5 a 15 mg L⁻¹ e 2 a 20 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 3 item 4.1.2). Independentemente da deficiência de nitrogênio e fósforo, comparado aos outros estudos, as condições operacionais iniciais (Fases I a III) provavelmente favoreceram a via metanogênica devido à maior disponibilidade de carbono. Por outro lado, a privação de carbono (em relação ao nitrogênio e fósforo) nas Fases IV e V pode ter prejudicado o metabolismo dos microrganismos metanogênicos, favorecendo a atividade sulfetogênica.

5.1.2 Especiação do sulfeto e alcalinidade a bisulfeto (A_{HS^-})

As concentrações de sulfeto total (ST) variaram dentro de uma faixa relativamente estreita, de (199±51) a (299±40) mg L⁻¹ (Tabela 7 - Item 5.1.1), durante todo o período operacional do AnSTBR, independentemente do aumento acentuado observado na redução de sulfato a partir da Fase IV.

O ST pode também ser avaliado conforme a especiação do sulfeto em termos das frações ionizada (HS⁻) e não ionizada (H₂S), conforme mostrado na Figura 15. No geral, foram observadas pequenas variações nas concentrações de HS⁻ entre as Fases I a IV ((123±38) a (148±24) mg L⁻¹ - Tabela 7), mas na Fase V a concentração de HS⁻ atingiu (208±55) mg L⁻¹. As concentrações de H₂S_(aq) foram geralmente abaixo de 90 mg L⁻¹, com exceção da Fase II em que o valor foi de (150±23) mg L⁻¹ - (Tabela 7 e Figura 15).

A proporção de HS⁻ apresentada na Tabela 7 correspondeu a, aproximadamente, 60 a 70% do ST como resultado direto das variações mínimas no pH do efluente (média do pH efluente (7,1±0,1) - Figura 12) e as concentrações experimentais de ST estavam geralmente abaixo da produção teórica de sulfeto (Figura 15), dado que a concentração esperada de sulfeto deve corresponder a aproximadamente um terço da concentração de sulfato removido (GIL-GARCIA et al., 2018).

A fração de sulfeto não detectada e contabilizada experimentalmente está relacionada, provavelmente, à formação de precipitados de sulfeto metálico, conforme Reação 13 e Reação 14 (LEWIS, 2010) no interior do reator, dadas as proporções mais altas da forma ionizada nas condições estudadas.

Figura 15- Quantidade de sulfeto teórico dissolvido e suas especiações; sulfeto ionizado (HS^-) e sulfeto não ionizado (H_2S), em termos de concentração (mg L^{-1}), referentes à Etapa 1 de operação do reator AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

O sulfeto gasoso ($\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})}$) também contribuiu para a fração não detectada de sulfeto; porém em proporções muito mais baixas. A proporção de sulfeto no biogás variou entre 3 a 7% e a vazão do biogás não foi mensurável no medidor de gás utilizado. Gil-Garcia et al. (2018) também relataram inconveniências na medição da vazão do biogás em um reator de leito fixo, alimentado com etanol em condição sulfetogênica-acidogênica, indicando que a maior parte do sulfeto produzido foi retida na fase líquida. Tal suposição também pode ser aplicada aqui, considerando que mais de 74% da produção teórica de sulfeto (Figura 15) correspondeu à fração ST no líquido.

Em relação à toxicidade por sulfeto, a literatura apresenta uma gama de concentrações inibitórias dependendo das condições de operação e configuração do reator. Por exemplo, usando um reator híbrido (retenção de biomassa em estruturas granulares autoimobilizadas e em material suporte), O'Flaherty; Colleran (1999) associaram uma redução acentuada na eficiência de redução de sulfato (87,5 a 50%) apenas com concentrações maiores de $1000 \text{ mg ST L}^{-1}$. Parkin et al. (1990), por sua vez, ao avaliarem a interação entre as BRS e arqueias metanogênicas em quimiostatos anaeróbios alimentados com acetato e propionato, relataram toxicidade do sulfeto de acordo com suas espécies

químicas. Teores de 100 a 800 mg $\text{HS}^- \text{ L}^{-1}$ e de 50 a 430 mg $\text{H}_2\text{S} \text{ L}^{-1}$ foram responsáveis por colapsar o sistema devido à toxicidade exercida nos sistemas anaeróbios aos microrganismos metanogênicos. Já Kiyuna; Fuess; Zaiat (2017) identificaram a inibição da metanogênese em concentrações relativamente baixas de HS^- (190 mg L^{-1}) na DA termofílica da vinhaça de cana-de-açúcar usando sistemas descontínuos.

Segundo Chen; Cheng; Creamer (2008), a forma não dissociada de sulfeto tende a ser mais tóxica em comparação com a forma ionizada, pois penetra facilmente nas membranas celulares e afeta diretamente o metabolismo celular. As concentrações de $\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$, (81 ± 19) a (150 ± 23) mg L^{-1} e HS^- (123 ± 38) a (208 ± 55) mg L^{-1} (Tabela 7), observadas na presente pesquisa foram próximas aos limites mais baixos dos níveis inibitórios relatados, sugerindo que a inibição por sulfeto foi, provavelmente, insignificante no AnSTBR. Ademais, reatores baseados em biofilme, como o AnSTBR, tendem a ser mais resilientes a compostos tóxicos, pois a resistência à transferência de massa desempenha o papel de barreira protetora às células. Tal fato reforça a hipótese de toxicidade de sulfeto baixa a nula.

Outra observação relevante a se fazer sobre o AnSTBR é que a predominância de HS^- observada pode estar relacionada com a estabilidade do sistema, juntamente com a contribuição do íon bicarbonato (HCO_3^-), pois segundo Godoi et al. (2017), a alcalinidade do sulfeto é geralmente contabilizada com a alcalinidade do bicarbonato (A_{BIC}) devido aos valores de pK_a muito próximos dos íons de interesse, ou seja, 6,99 (HS^-) e 6,3 (HCO_3^-). A contribuição de ambas as alcalinidades, a bisulfeto (A_{HS^-}) e a bicarbonato (A_{BIC}), são mostradas na Figura 16.

Figura 16- Valores, em $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, de alcalinidade parcial (AP), alcalinidade proveniente do íon bicarbonato (A_{BIC}) e alcalinidade do bisulfeto (A_{HS^-}) -Etapa 1, operação do reator AnSTBR.

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 16 observa-se que os valores da A_{HS^-} variaram estreitamente dentro das Fases I-IV, de (187 ± 57) a $(224 \pm 37) \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Tabela 7), apresentando um aumento acentuado na Fase V para um valor de $(314 \pm 84) \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Tabela 7) ligado à melhora de eficiência no processo sulfetogênico.

A dosagem de metal provavelmente não afetou a disponibilidade de HS^- (e consequentemente A_{HS^-}), como relatado por Godoi; Foresti; Damianovic (2017), que observaram uma queda acentuada na alcalinidade do sistema (de 2,45 a 1,30 $\text{g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) devido à precipitação do HS^- induzida pela dosagem de Fe^{2+} .

Na Figura 16, é possível notar que A_{HS^-} foi maior que o A_{BIC} apenas na Fase II, enquanto o A_{BIC} prevaleceu em todas as outras fases operacionais. Assim, a predominância da alcalinidade baseada em HCO_3^- é o principal fator para explicar a estabilidade do sistema, o que também reforça a contribuição predominante da oxidação completa do etanol para a redução de sulfato a partir da Fase IV.

5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS/EDX) das amostras do descarte de biomassa.

Durante os 300 dias de operação do reator, houve dois descartes de biomassa no fundo cônico do AnSTBR (Ponto 3 da Figura 4- Item 4.1.1), abrindo o amostrador e

coletando o material com um bquer, a fim de melhorar o escoamento do lquido, evitando caminhos preferencias, zonas mortas e entupimentos no leito. Essas duas amostras, do dia 14 (Fase I) e do dia 199 (Fase IV), junto com a do inculo e uma amostra no final da operao do reator, retirada no dia 300 (Fase V), foram submetidas s anlises de MEV e EDX com o objetivo de identificar diferenas morfolgicas dos microrganismos e algo correlacionado precipitao dos sulfetos metlicos.

Os resultados das anlises de MEV so mostrados na Figura 17 e na Figura 18 e os resultados de EDX so mostrados na Figura 19. As amostras foram denominadas de A, B, C e D de acordo com a ordem cronolgica de operao do reator.

Figura 17- Fotos resultantes da anlise de microscopia eletrnica de varredura (MEV)- Amostra A: inculo; Amostra B: dia 14- Fase I; Amostra C: dia 199-Fase IV; Amostra D: dia 300- Fase V- Etapa 1 de operao do AnSTBR.

Pela anlise de MEV, com resoluo na ordem de 1 m para as amostras A (inculo) e C (dia 199, Fase IV) e 2 m para as amostras B (dia 14, Fase I) e D (dia 300, Fase V), foi possvel observar uma diferena na composio das amostras. Na amostra A havia presena de bactrias do tipo bacilo e coco formando estruturas longas como aparece na amostra B

(aproximadamente 30 μm). Nas últimas duas amostras, C (dia 199, Fase IV) e D (dia 300, Fase V), havia estruturas formando flores que pareciam ser compostas por precipitados metálicos e a presença dos bacilos e dos cocos foi diminuída.

Tal observação é coerente com a lógica da precipitação de metais, pois no início provavelmente a precipitação de metais era insignificante (amostra B) ou inexistente, como era o caso da amostra A (lodo da Dacar, inóculo do reator AnSTBR). E mais para o final da operação do reator, amostras C e D, correspondentes aos dias 199 (Fase IV) e 300 (Fase V), a precipitação dos metais em sulfetos metálicos era considerável e, assim, visível nas amostras de MEV.

A Figura 18 mostra melhor e isoladamente as estruturas metálicas que apareceram nas amostras C (dia 199, Fase IV) e D (dia 300, Fase V). A justificativa pode se dar pelo trabalho de Ahmed et al. (2010) que encontraram fotos semelhantes de estruturas cristalinas, denominadas pelos autores de *green rust sulfate*, que são hidróxidos de ferro (II)-ferro(III), formadas em pH entre 7 e 8,5. E também pela pesquisa de Liu et al. (2017b) que identificaram estruturas semelhantes como FeS.

Figura 18- Fotos de MEV representando as estruturas encontradas nas amostras C (dia 199-, Fase IV) e D (dia 300- Fase V) da Etapa 1 de operação do reator AnSTBR.

O detector acoplado ao MEV possibilitou a identificação dos elementos químicos presentes em cada uma das amostras e a Figura 19 e a Figura 20 trazem os resultados do mapeamento e os espectrogramas. Os elementos químicos detectados nas amostras foram: Ca, Al, Pd, Fe, S, O, Zn, Cu, P, K e Si. Os elementos ouro (Au) e o carbono (C) são apresentados junto com os outros elementos químicos, mas podem ser desconsiderados, pois fizeram parte do recobrimento da amostra para análise.

Um resultado que deve ser destacado é a porcentagem do elemento ferro (Fe) encontrado na amostra C (dia 199- Fase IV) no valor de 42,9% que é o dobro encontrado nas

outras três amostras (A, B e D), supondo que nesta amostra a maior porcentagem dos compostos químicos ali precipitados eram provenientes do elemento ferro e talvez até mais estáveis do que nas outras amostras. Ademais, na Figura 19 e na Figura 20 foi possível verificar que na amostra A (inóculo) a porcentagem de S é de aproximadamente 5% e nas outras amostras (B, C e D) essa porcentagem era perto de 25%, indicando a presença dos precipitados de sulfetos metálicos.

A presença de oxigênio (O) e fósforo (P) nas amostras sugerem que além da possibilidade de formação de precipitados com sulfetos e hidróxidos, também pode ter havido a formação dos fosfatos e óxidos metálicos precipitados dentro do reator, visto que, de acordo com as regras de precipitação de metais, os sulfetos são insolúveis com metais do Grupo IIA da tabela periódica; todos os óxidos são insolúveis exceto os do Grupo IA e formados por Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} ; e todos os fosfatos também são insolúveis, com exceção dos formados por NH_4^+ e o Grupo IA. Na composição do meio sintético existiam os seguintes elementos químicos: Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cl^- , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Al^{3+} , Mn^{2+} , K^+ , além dos íons sulfato, fosfato e amônio (Tabela 3- Item 4.1.2).

Figura 19- Fotos do mapeamento quantitativo dos elementos químicos presentes nas amostras do inóculo e do descarte do dia 14 na Fase I e seus respectivos espectrogramas da análise de EDS/EDX- Etapa 1 de operação do AnSTBR.

Figura 20- Fotos do mapeamento quantitativo dos elementos químicos presentes nas amostras das amostras do dia 199 (Fase IV) e 300 (Fase V) e seus respectivos espectrogramas da análise de EDS/EDX- Etapa 1 de operação do AnSTBR.

5.1.4 Biologia molecular

As amostras, sem réplicas, do inóculo e da biomassa, aderida na espuma e a suspensão no interior do reator, retiradas após os 300 dias de operação do reator (Etapa 1), foram

analisadas quanto a biologia molecular a fim de complementar os resultados apresentados até aqui.

No geral, foram identificadas 1022 OTU (*Operational taxonomic unit*), sendo 509 OTUs do domínio Arqueia, 513 OTU do domínio Bactéria. A OTU é uma definição operacional a qual identifica o grupo de organismos atualmente em estudo em termos de similaridade.

A Figura 21 mostra a porcentagem dos domínios Bactéria e Arqueia em cada amostra analisada por biologia molecular.

Figura 21- Comparação entre os principais domínios presentes nas amostras de inóculo, biomassa aderida e biomassa suspensa, referentes à Etapa 1 de operação do AnSTBR.

Pela Figura 21 é observado que a amostra da biomassa suspensa no reator era composta por, praticamente, apenas bactérias (99,5%), enquanto que as amostras do inóculo e da biomassa aderida no material suporte apresentaram 74,5% e 64,0% de bactérias e 25,5% e 36,0% de arqueias, respectivamente.

Os resultados mostrados na Figura 21 estão de acordo com o trabalho de Silva et al. (2006), visto que os autores verificaram, pela técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), que as células bacterianas, em vez das arqueias, foram predominantes nos biofilmes.

Em paralelo, a diversidade de espécies presentes em cada amostra também pode ser avaliada por meio de índices biológicos. Para tanto, utilizou-se do software PAST para obtenção do índice de dominância (Simpson), de riqueza (Chao-1) e diversidade (Shannon-Weaver) das amostras (inóculo, biomassa aderida e biomassa suspensa) para os domínios

bactéria e arqueia. Os resultados dos índices biológicos de diversidade das espécies estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8- Índices de dominância (Simpson), de diversidade (Shannon-Weaver) e de riqueza (Chao-1) para as amostras do inóculo, biomassa suspensa e biomassa aderida- Etapa 1 de operação do AnSTBR.

	Índice de dominância (Simpson_1-D)	Índice de diversidade (Shannon-Weaver)	Índice de riqueza (Chao-1)
<i>Inóculo</i>	0,9298	3,825	823,4
<i>Biomassa Aderida</i>	0,8178	2,508	619,5
<i>Biomassa Suspensa</i>	0,6470	1,633	543,6

O índice de dominância de Simpson varia de 0 a 1 e refere-se à probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem a espécies diferentes. Isto é, quanto mais próximo de 1 o resultado do índice de Simpson, maior a probabilidade dos indivíduos serem de diferentes espécies logo, menor a dominância e maior a diversidade (SIMPSON, EDWARD, 1949). Dessa forma, de acordo com a Tabela 8, o inóculo é a amostra que apresenta a maior diversidade de espécies (0,9298), depois vem a biomassa aderida apresentando 81,78% de probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem a espécies diferentes e por último, a biomassa suspensa com 64,70%.

Tal resultado está em concordância com o índice de diversidade de Shannon-Weaver, o qual serve para medir o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido de forma aleatória da população, ou seja, quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e a diversidade da amostra é baixa (URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005), confirmando que a biomassa suspensa tem a menor diversidade de indivíduos na amostra. Da mesma forma, os resultados são confirmados pelo índice de riqueza de Chao de primeira ordem (Chao-1), que se baseia na abundância das espécies raras indicando que a riqueza aumenta com o aumento das espécies raras (ANNE CHAO, 1984), classificando o inóculo como rico em espécies raras.

Pelo sequenciamento genético foi possível destacar alguns gêneros, entre as arqueias e as bactérias, para cada amostra analisada a fim de visualizar a mudança que ocorreu das populações de microrganismos do inóculo para as amostras de biomassa (aderida e suspensa), retiradas no final de operação do AnSTBR na Etapa 1.

No geral, pela Tabela 9 e Figura 22, que mostra uma comparação das amostras submetidas ao sequenciamento genético, nota-se que inóculo era o mais diverso quando

comparado às outras duas amostras da biomassa (aderida e suspensa). Isso indica a seleção de grupos específicos de microrganismos especializados no processo redução de sulfato. Ademais, também foi possível observar que grupos com abundância relativa muito baixas no inóculo foram favorecidos ao longo da operação do AnSTBR. Por exemplo, o gênero *Desulfovibrio*, que é um microrganismo do ciclo do enxofre, apareceu na amostra de inóculo com abundância relativa de 0,17%. Na amostra da biomassa aderida a abundância relativa passou para 0,19% e 18,91% na biomassa suspensa, confirmando a seleção da bactéria e o estabelecimento da sulfetogênese no final dos 300 dias de operação do reator.

Tabela 9- Comparação dos principais gêneros nas três amostras (inóculo, Biomassa aderida e biomassa suspensa) referentes à Etapa 1 de operação do AnSTBR.

Gênero	Abundância Relativa(%)		
	Inóculo	Biomassa Aderida	Biomassa Suspensa
<i>Thermoanaerobaculum</i>	20,71	0,30	0,19
<i>Methanosaeta</i>	11,34	35,77	0,45
<i>Smithella</i>	7,05	0,14	0,10
<i>Sulfurovum</i>	4,73	0,02	0,03
<i>Methanolinea</i>	4,01	0,01	0,00
<i>Methanoregula</i>	3,26	0,01	0,00
<i>Methanobacterium</i>	2,07	0,20	0,03
<i>Sulfurimonas</i>	1,98	0,01	0,00
<i>Candidatus_Cloacamonas</i>	1,42	0,00	0,00
<i>Sporosarcina</i>	1,27	24,75	0,09
<i>Syntrophus</i>	1,16	0,02	0,03
<i>Tissierella</i>	0,15	22,29	0,09
<i>Bacillus</i>	0,09	1,81	0,00
<i>Paenibacillus</i>	0,03	1,04	0,00
<i>Pseudomonas</i>	0,03	0,01	0,51
<i>Thermodesulfobium</i>	0,35	0,40	53,80
<i>Desulfovibrio</i>	0,17	0,19	18,91
<i>Cellulomonas</i>	0,20	0,26	18,08
<i>Caldiisericum</i>	0,01	0,01	1,13
Outros	39,95	12,76	6,53

Figura 22- Comparação dos principais gêneros nas três amostras (inóculo, Biomassa aderida e biomassa suspensa) referentes à Etapa 1 de operação do AnSTBR.

Os gêneros com abundância relativa acima de 1% do inóculo, da biomassa aderida e da biomassa suspensa, conforme Tabela 9, estão destacados da Figura 23 até a Figura 25, respectivamente.

Na amostra de inóculo (Tabela 9 e Figura 23), a maior abundância relativa obtida foi para o gênero *Thermoanaerobaculum* (20,7%), que é uma bactéria que cresce em ambientes com altas temperaturas. Apesar do reator UASB do qual foi retirada a amostra na avícola Dacar operar em condições mesofílicas, no processo de abate de aves existe a etapa de escalda da ave para haver o afrouxamento das penas, em temperatura de 52°C (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal e o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves), o que pode ter proporcionado o aparecimento de tal microrganismo no inóculo.

O gênero *Thermoanaerobaculum* foi o primeiro identificado dentro do subgrupo 23 (de um total de 26) do filo Acidobactéria. Este filo é relatado na literatura como muito versátil, aparecendo em diferentes ecossistemas, tais como solos, cavernas, fontes termais e fontes hidrotermais do mar profundo, mas por outro lado é destacado que ainda faltam informações genéticas e fisiológicas sobre o gênero (QUAISER et al., 2003; STAMPS et al., 2014). Por exemplo, além dos locais citados, também foram encontradas bactérias

termofílicas acidofílicas em biorreatores tratando uma água residuária resultante de três processos fermentativos de origens diferentes (DQO variando de 5000 a 15000 mg L⁻¹). Este sistema compunha 7 reatores biológicos, sendo os 4 primeiros operados com temperatura entre 50 a 58°C e os últimos 3 reatores entre 28 a 32°C, e foi verificado que, mesmo com a mudança de temperatura durante o tratamento, os microrganismos termofílicos persistiram nas análises de sequenciamento genético dos tanques mesofílicos, o que não era esperado (LAPARA et al., 2000). Isso sugere um microrganismo termofílico moderado, justificando o seu aparecimento em ambientes mesofílicos.

O gênero *Methanosaeta* (11,3%) foi o segundo com maior abundância relativa na amostra do inóculo, sendo esta uma arqueia metanogênica com alta afinidade com o composto acetato, podendo crescer em concentrações de acetato menores que 5 μmol L⁻¹. Esta arqueia é considerada a produtora de metano na Terra, pois emprega diferentes enzimas para catalisar a metanogênese acetoclástica (SMITH; INGRAM-SMITH, 2007; HOLMES; SMITH, 2016).

Outras arqueias também foram significativas na amostra de inóculo, como: *Methanobacterium* (2,07%), *Methanoregula* (3,26%), *Methanolinea* (4,01%), o que pode explicar a presença de compostos intermediários no processo de redução de sulfato como, por exemplo, o ácido acético nas amostras de cromatografia líquida e consequentemente, a via incompleta de oxidação do etanol relatada no Item 5.1.4.

A bactéria do gênero *Smithella* (7,05%), também significativa no inóculo, é estritamente anaeróbia e cresce por meio do sintrofismo com arqueias metanogênicas (DELFORNO et al., 2012), o que justifica sua presença no inóculo diante das arqueias suprelatadas.

A bactéria do gênero *Sulfurovum* (4,73%) e a do gênero *Sulfurimonas* (1,98%) estão relacionadas ao ciclo do enxofre. Elas são quimiolitotróficas e usam enxofre como doador de elétrons, utilizando oxigênio e nitrato como receptores de elétrons (INAGAKI et al., 2004; MADIGAN et al., 2016).

Alguns gêneros sintróficos também foram identificados na amostra do inóculo, como o gênero *Candidatus Cloacamonas* (1,42%), que foi destacado por Pelletier et al. (2008) como uma bactéria presente em digestores anaeróbios que tem como característica a oxidação do propionato em acetato e dióxido de carbono. Já a bactéria do gênero *Synthrophus* (1,16%), ela é degradadora de ácidos graxos e ácidos aromáticos e foi encontrada na estação de tratamento de esgoto municipal de Norman, Oklahoma, EUA (MCINERNEY et al., 2007).

O gênero *Sporosarcina* teve uma abundância relativa de 1,27% na amostra de inóculo e essa bactéria apresenta um papel importante como potencial probiótico em aves,

podendo justificar sua aparição no sequenciamento (PRIYODIP; BALAJI, 2019). Delforno et al. (2017) avaliaram a diversidade microbiana do mesmo tipo inóculo e verificaram uma abundância relativa de 3,2%, sendo maior que a encontrada para a presente pesquisa, mostrando que havia maior número de microrganismos desse gênero na amostra dos autores em comparação com a amostra obtida nesse trabalho. Tal fato é justificado pela coleta do inóculo em que aconteceram em anos diferentes. O inóculo da presente pesquisa foi coletado em 2015 e se tratava de um momento de reativação do reator UASB da avícola Dacar.

Figura 23- Gêneros com abundância relativa acima de 1% na amostra de inóculo utilizado para a operação do AnSTBR.

Na amostra de biomassa aderida (Tabela 9 e Figura 24), os dois primeiros gêneros mais abundantes se repetem da amostra do inóculo, *Methanosaeta* (35,8%) e *Sporosarcina* (24,8%), mas com valores maiores, 11,3% e 1,27%, respectivamente. O aumento da presença da arqueia *Methanosaeta* na amostra de biomassa aderida relaciona-se com a necessidade desses microrganismos por ambientes anaeróbios estritos (HOLMES; SMITH, 2016) bem como para a bactéria do gênero *Sporosarcina* (JAIN; ARNEPALLI, 2019).

A bactéria do gênero *Tissierella* (22,3%) é um microrganismo estritamente anaeróbio, que pode produzir acetato, amônia e CO₂. Ele é apresentado como um sinônimo do gênero *Clostridium* que geralmente é encontrado na flora intestinal humana ou animal e em processos anaeróbios decompondo diversos compostos orgânicos (FARROW et al., 1995; YANG; TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2008; RILEY, 2012). Provavelmente este gênero é

proveniente do inóculo e com as condições de operação do reator, ele foi favorecido, apresentando abundância relativa maior que 1% na biomassa aderida. Yang; Tsukahara; Sawayama (2008) operaram um sistema termofílico-mesofílico com um biorreator de leito fixo com poliuretano como meio suporte e observaram uma abundância relativa do gênero *Clostridium* de 15%.

A presença de arqueias metanogênicas podem justificar os resultados apresentados no item 5.1.1 desta tese, justificando a utilização da DQO pela via metanogênica ($31 \pm 10\%$) mesmo na última fase de operação do reator (Fase V) - (Tabela 7). Ademais, a bactéria do gênero *Tissierella* pode ter contribuído com a sulfetogênese acetoclástica no reator.

O gênero *Bacillus* (1,81%) e o *Paenibacillus* (1,04%) são anaeróbios facultativos, tendo sido o primeiro relatado por Auger; Danchin; Martin-Verstraete (2002) por absorver compostos de enxofre (sulfato, sulfito e tiosulfato) e por Costa et al. (2016), que relataram a presença desses gêneros em amostra de DAM proveniente da mina de cobre de Sossego, localizada no Estado do Pará. O segundo gênero foi encontrado em amostra de um rio contaminado com DAM de uma mina na China por Zhang et al. (2019).

Figura 24- Gêneros com abundância relativa acima de 1% na amostra de biomassa aderida da Etapa 1 de operação do AnSTBR.

Os gêneros apresentados na Tabela 9 e na Figura 25 mostram os resultados obtidos do sequenciamento para a amostra de biomassa suspensa. Nesta amostra, apenas 4 gêneros tiveram abundância relativa acima de 1%, foram eles: *Thermodesulfobium* (53,8%), *Desulfovibrio* (18,9%), *Cellulomonas* (18,1%) e *Caldiisericum* (1,13%).

O gênero *Thermodesulfobium* é um microrganismo termofílico moderado, estritamente anaeróbio, responsável por reduzir compostos sulfurosos e oxidar completamente compostos

orgânicos (MORI et al., 2003). Este organismo, juntamente com o *Thermodesulfovibrio*, é colocado dentro do ramo do gênero *Desulfovibrio* na árvore genética, indicando que as enzimas envolvidas na respiração com sulfato podem evoluir de maneira independente (BARTON; HAMILTON, 2007), o que pode elucidar a aparição do gênero termofílico na amostra.

Outra bactéria abundante na amostra de biomassa suspensa foi a do gênero *Desulfovibrio* (18,9%), a qual é classificada como BRS, pois converte etanol em acetato no processo de redução de sulfato (oxidação incompleta de compostos orgânicos) (POSTGATE; CAMPBELL, 1966; JING et al., 2013) e também se mostra como potencial microrganismo para remover metais de águas residuárias, como é o caso da DAM. Ele é a fonte de geração dos ânions HS^- e/ou S^{2-} que reagem com os cátions metálicos para precipitá-los como sulfetos metálicos (KOSÍŃSKA; MIŚKIEWICZ, 2012), o que justifica a aparência das estruturas metálicas pela análise de MEV (Figura 18- item 5.1.3) das amostras dos descartes do dia 199-, Fase IV e do dia 300- Fase V, da Etapa 1 de operação do reator.

Uma hipótese sobre a bactéria do gênero *Desulfovibrio* se apresentar em maior abundância relativa na biomassa suspensa do que na biomassa aderida, é devido à transferência de massa, visto que no leito do reator as concentrações das substâncias que entram no reator são maiores e mais agressivas, assim, acabam selecionando os microrganismos mais resistentes àquelas condições, que neste caso, eram as BRS.

Bactérias do gênero *Cellulomonas* (18,1%) podem produzir ácido por muitas fontes de carbono, incluindo celobiose, glicose, sacarose e maltose e há relato de *C. gilvus* codificarem um sistema de transporte de sulfato (CHRISTOPHERSON et al., 2013). Sani et al. (2002) mostraram a possível redução dissimilatória de Fe^{3+} , Cr^{6+} e U^{6+} (receptores de elétrons) na presença do gênero *Cellulomonas* com e sem lactato como fonte orgânica (doador de elétrons) em processos anaeróbios com precipitação de metais. Este gênero estava presente no inóculo e na biomassa aderida com abundâncias relativas menores que 1% (0,20% e 0,26%) e foram favorecidas na biomassa suspensa devido as condições de operação do AnSTBR com aumento sucessivo de metais e nutrientes e tendo o etanol como doador de elétrons.

Figura 25- Gêneros com abundância relativa acima de 1% na amostra de biomassa suspensa da Etapa 1 de operação do AnSTBR.

No geral, pelo sequenciamento genético, notou-se uma grande diversidade de grupos presentes no inóculo, que podem ter sido cruciais para o estabelecimento dos microrganismos de interesse durante a operação do reator, favorecendo o aparecimento dos microrganismos redutores de sulfato. Tal diversidade e a interação dos microrganismos dos domínios bactéria e arqueia é o que previne o acúmulo de ácidos orgânicos e álcoois na etapa de fermentação e justifica a mudança da via incompleta para a completa de oxidação do etanol relatada no Item 5.1.1, visto que a conversão do etanol em ácido acético é termodinamicamente favorável e a reação de oxidação do ácido acético mediada por BRS é termodinamicamente mais favorável que a metanogênese acetoclástica (HIRASAWA et al., 2008).

5.2 Etapa experimental 2- Planejamento experimental para a avaliação da influência dos metais na concentração de sulfato

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados da Etapa 2 experimental. O objetivo desta etapa foi fazer um estudo da influência dos metais presentes no efluente sintético da Etapa 1 sobre a concentração de sulfato residual no efluente tratado biologicamente, a fim de identificar qual ou quais metais podem ter sido responsáveis pela melhora na eficiência do processo sulfetogênico identificado e discutido no Item 5.1.

A Etapa 2A definiu o metal que foi considerado significativo positivamente para a minimização da concentração de sulfato residual no efluente e a Etapa 2B identificou qual a concentração do metal mais favorável para uma otimização de tal variável resposta da Etapa 2A.

A Figura 26 mostra um esquema representativo da divisão dos resultados na Etapa 2.

Figura 26- Esquema representativo dos resultados da Etapa experimental 2.

Fonte: Próprio autor.

5.2.1 Etapa 2A

A Tabela 10 mostra quais foram os resultados obtidos no PBD com relação à concentração de sulfato residual no efluente tratado em cada ensaio avaliado.

Tabela 10- Valores das variáveis independentes e da variável resposta obtida em cada condição experimental- Etapa 2A.

Ensaio	Variáveis Independentes (mg L ⁻¹)							Variável resposta (mg L ⁻¹)
	Fe	Ni	Co	Cu	Mn	Mg	Zn	Concentração de sulfato residual
1	10,0	1,00	0,998	4,99	30,0	0,035	2,00	1.646,90
2	100,0	10,0	0,998	4,99	3,00	0,003	2,00	1.044,51
3	100,0	1,00	9,98	0,499	30,0	0,003	2,00	1.178,15
4	100,0	10,0	9,98	4,99	30,0	0,035	20,0	1.128,78
5	100,0	1,00	0,998	0,499	3,00	0,035	20,0	1.946,45
6	10,0	10,0	0,998	0,499	30,0	0,003	20,0	963,09
7	10,0	1,00	9,98	4,99	3,00	0,003	20,0	63,16
8	10,0	10,0	9,98	0,499	3,00	0,035	2,00	70,42
9*	45,0	4,50	4,49	2,24	13,5	0,016	9,00	1.088,62
10*	45,0	4,50	4,49	2,24	13,5	0,016	9,00	939,25

*Ponto central

O resultado da análise de variância (ANOVA) está apresentado na Tabela 11, sendo que p-valor menor ou igual a 0,1 foi considerado significativo.

Tabela 11- ANOVA para o planejamento experimental Plackett- Burman para a concentração de sulfato residual- Etapa 2A.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F-valor	p- valor	Observação
Fe	815564	1	815564	73,11	0,07	Significativo*
Ni	331242	1	331242	29,69	0,12	
Co	1248539	1	1248539	111,92	0,06	Significativo*
Cu	9437	1	9437	0,85	0,53	
Mn	401577	1	401577	36,00	0,11	
Mg	297851	1	297851	26,70	0,12	
Zn	3260	1	3260	0,29	0,68	
Falta de ajuste	123	1	123	0,01	0,93	
Erro puro	11155	1	11155			
Total	3118749	9				

*Nível de significância de 10%

A Figura 27 apresenta o gráfico de Pareto (valor-p = 0,1), mostrando o efeito dos 7 metais sobre a concentração de sulfato residual no efluente tratado, em ordem decrescente de efeito. Dentre os elementos químicos considerados, o Co e Fe foram os que apresentaram efeito significativo na variável resposta, em nível de significância de 10% (linha vermelha- Figura 27).

O gráfico de Pareto é um gráfico em barras, cujo comprimento de cada barra e seus sinais são proporcionais ao efeito padrão estimado (valor absoluto). Assim, neste trabalho, o cobalto apresentou efeito negativo e o ferro apresentou efeito positivo na variável resposta. Isto significa que o aumento na concentração de cobalto ocasiona redução na concentração de sulfato residual no efluente tratado, enquanto que, o aumento na concentração de ferro, leva ao aumento da variável resposta.

Figura 27- Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos metais sobre a concentração de sulfato residual, ao nível de significância de 10% - Etapa 2A.

Fonte: Próprio autor.

A concentração de sulfato residual no efluente tratado é inversamente proporcional à eficiência do tratamento biológico da DAM. Dessa forma, quanto maior a concentração de cobalto, menor será a concentração de sulfato residual no efluente tratado e, consequentemente, maior será a eficiência do tratamento. Em contrapartida, quanto maior a concentração de ferro, menor a eficiência do tratamento, resultando em acúmulo de sulfato no efluente tratado. O efeito individual e de ambas as variáveis independentes (ferro e cobalto) podem ser observados na Figura 29 e na Figura 29, respectivamente.

A partir da superfície de resposta (Figura 29), observa-se que concentrações de cobalto superiores a 10 mg L^{-1} resultariam em uma concentração de sulfato residual menor que 200 mg L^{-1} , implicando em uma maior eficiência do tratamento da DAM. Por outro lado, em concentrações de ferro máxima (100 mg L^{-1}), as concentrações de sulfato residual são próximas às iniciais (concentração inicial de sulfato teórica no AnSTBR da Etapa 1 igual a 1500 mg L^{-1}), indicando a baixa ou nula eficiência do tratamento da DAM.

A equação do modelo para a concentração de sulfato residual no efluente ($C_{S_{residual}}$), em função da concentração dos elementos Fe e Co é apresentada pela Equação 7, que é a expressão algébrica resultante do ajuste do modelo aos dados experimentais ($R^2 = 0,99231$ e $R_{ajustado} = 0,9827$).

$$C_{S_{residual}} = 854,50 + 7,06C_{Fe} - 88,31C_{Co} + 245,58$$

Equação 7

Em que:

$C_{S_{residual}}$ concentração de sulfato residual (mg L^{-1}); C_{Fe} : é a concentração de ferro (mg L^{-1}); C_{Co} : é a concentração de cobalto (mg L^{-1}).

Figura 28- Efeito principais (valor-p = 0,1) dos elementos químicos cobalto e ferro na influência da concentração de sulfato residual, dentro dos níveis avaliados – Etapa 2A.

Fonte: Próprio autor.

Figura 29- Superfície de resposta da concentração de sulfato residual (mg L^{-1}) em função dos metais ferro e cobalto – Etapa 2A.

Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados obtidos algumas considerações devem ser feitas, pois o delineamento experimental Plackett-Burman não avalia as interações entre os metais e, em um experimento onde há um conjunto deles, a interação entre eles deve ser significativa, visto que pode afetar diretamente as etapas da digestão anaeróbia (KIRAN, PAKSHIRAJAN e DAS, 2017).

Dentre as interações de metais, talvez a mais significativa para este estudo seja a do ferro com o cobalto, já que o resultado do presente trabalho contrariou a literatura em que relata o estímulo da redução de sulfato ao adicionar ferro no sistema (VIEIRA et al., 2016; GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2017; CUNHA et al., 2019). No entanto, nesses trabalhos não havia cobalto na composição da água residuária.

A justificativa na interação entre o cobalto e o ferro está nos raios atômicos muito parecidos devido sua proximidade na tabela periódica, na parte dos metais de transição, apresentando números atômico 26-ferro e 27-cobalto, o que pode levar à competição pelo mesmo sítio ativo nas enzimas (KOTHAMASI; KOTHAMASI, 2004; RANQUET et al., 2007; PAULO et al., 2017). O ferro é o elemento traço mais requerido para a digestão anaeróbia, com capacidade de aumentar a eficiência na geração de metano devido ao estímulo na produção de ácidos (CHOONG et al., 2016; WEI et al., 2018) e o cobalto é essencial aos microrganismos, mesmo em pequenas quantidades (BARTACEK et al., 2008; FERMOSO et al., 2009).

Outra consideração a ser feita, relaciona-se com a análise de biologia molecular feita nas amostras do reator da Etapa 1 (Tabela 9- item 5.1.4), a qual sugere potenciais rotas envolvendo o cobalto com os gêneros: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Desulfovibrio* na produção de vitamina B12 para o crescimento dos microrganismos (ZANDVOORT et al., 2006; LOBO et al., 2008).

A hipótese para explicar os resultados obtidos na Etapa 2A e que complementam os resultados de microscopia da Etapa 1, é que o ferro presente no sistema, estava sendo precipitado dentro do reator, conforme verificado no item 5.1.3 pela Figura 17 e pela Figura 18, tornando-o indisponível no meio líquido e deixando o sítio ativo da enzima livre para o cobalto se ligar, promovendo o crescimento dos microrganismos do gênero *Desulfovibrio*, por exemplo (abundância relativa no inóculo de 0,17% e passou para 18,91% na biomassa suspensa), que é uma BRS e primordial para o estabelecimento do processo sulfetogênico.

Segundo estudos de Kothamasi; Kothamasi (2004), o ferro também pode influenciar no crescimento de bactérias do gênero *Pseudomonas*, verificando que na ausência de ferro, tal gênero teve baixo crescimento. Dessa forma, relacionando o melhor cenário para a eficiência

no processo de redução de sulfato, apresentado pela Figura 27b, com a microbiologia feita na Etapa 1, os resultados estão de acordo com os autores, visto que, com a indisponibilidade do ferro devido sua precipitação, as *Pseudomonas* apresentaram abundância relativa menor que 1% nas três amostras analisadas (abundância relativa de 0,01% no inóculo e passando para 0,03% na biomassa aderida e 0,51% na biomassa suspensa -Tabela 9 (item 5.1.4).

5.2.2 Etapa 2B

O elemento cobalto, identificado como influenciador positivo na minimização da concentração de sulfato residual, na Etapa 2A, foi avaliado na Etapa 2B sob diferentes concentrações (10, 30, 50 e 90 mg L⁻¹) por meio do ensaio de um fator simples. Essas concentrações avaliadas foram definidas de acordo com a superfície de resposta (Figura 29), a qual indicou que concentrações maiores que 10 mg L⁻¹ trariam as menores concentrações de sulfato residual no efluente tratado biologicamente. Assim, a primeira concentração avaliada foi a de 10 mg L⁻¹ e se estendeu até quase 10 vezes mais, com intervalo entre os valores de 20 mg L⁻¹. O ensaio com concentração de 70 mg L⁻¹ foi descartado pelo fato das réplicas apresentarem grande discrepância dos resultados.

A Figura 30 mostra o ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados obtidos experimentalmente na Etapa 2B (Equação 6 – Item 4.2.3) e a Tabela 12 traz os valores dos parâmetros estimados e a qualidade do ajuste dos dados para o controle para as concentrações de cobalto avaliadas.

Figura 30- Ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados experimentais de concentração de sulfato residual (mg L^{-1}) para as diferentes concentrações de cobalto (10, 30, 50 e 90 mg L^{-1}) e também do controle (zero concentração de cobalto), em função do tempo de experimento (dia)- Etapa 2B.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 12- Valores de concentração inicial de sulfato (C_{S0}), constante cinética (k) e valores de chi quadrado (Chi^2), reduzido e ajustado, obtidos pelo ajuste cinético de primeira ordem – Etapa 2B.

	Concentrações do elemento cobalto (mg L^{-1})				
	Controle ("zero")	10	30	50	90
k (dia^{-1})	0,78	1,21	0,61	0,58	0,21
C_{S0} (mg L^{-1})	1685 ± 109	2057 ± 386	1805 ± 5	1856 ± 169	1847 ± 3
Chi^2 reduzido	0,65	30,97	0,20	8,24	0,19
Chi^2 ajustado	0,98	0,88	0,99	0,97	0,99

Analisando os valores das constantes cinéticas apresentadas na Tabela 12, a concentração que resultou em um maior valor foi a de 10 mg L^{-1} ($k = 1,21 \text{ dia}^{-1}$ e $C_{S0} = 2075 \text{ mg L}^{-1}$), o que resulta, conseqüentemente, na maior velocidade de redução de sulfato. A fim de melhor entender a relação entre os valores da constante cinética k e as concentrações de cobalto avaliadas, construiu-se a Figura 31.

Figura 31- Concentrações de cobalto versus valores da constante cinética k (dia^{-1}) apresentados na Tabela 12- Etapa 2B.

Fonte: Próprio autor

A Figura 31 mostra que, além do estímulo na minimização da concentração de sulfato residual no efluente verificado para o teor de 10 mg-Co L^{-1} , há inibição da atividade para as maiores concentrações (30 , 50 e 90 mg L^{-1}), com valores de k menores em relação ao controle, sendo a concentração mais crítica avaliada, a concentração de 90 mg-Co L^{-1} .

As concentrações avaliadas para o cobalto são consideradas altas para a degradação de substratos orgânicos em termos de eficiência do processo metanogênico (CHOONG et al., 2016), mas este pode não ser um bom parâmetro para processos sulfetogênicos, pois ainda não há informações suficientes sobre a influência do cobalto na redução de sulfato. Por outro lado, o trabalho de Groudev et al. (2008) avaliou concentrações de cobalto de $0,23$ a $6,20 \text{ mg L}^{-1}$ e de sulfato variando de 341 a 1784 mg L^{-1} para DAM gerada em uma mina de urânio, o que mostra que o teor de 10 mg-Co L^{-1} é algo coerente com a realidade na área biorremediação de água residuária de mineração.

Com relação à presente pesquisa, a Tabela 3 (Item 4.1.2) mostrou que a maior concentração de metais avaliada na Etapa 1 foi a Fase V, que correspondia portanto à concentração do cobalto no valor de 10 mg L^{-1} e conforme também mostrado na Tabela 7 do Item 5.1.1, tal fase foi a que apresentou o ápice da sulfetogênese com a menor concentração de sulfato residual no efluente de $(245 \pm 97) \text{ mg L}^{-1}$, maiores remoções de sulfato (83%) e

matéria orgânica (90%), além de apresentar a maior porcentagem da DQO utilizada pela via sulfetogênica (69%), mostrando que os resultados da Etapa 1 e 2 estão correlacionados.

Considerando que a relação estequiométrica DQO/SO₄ é de 0,67, ou seja, cada 1 g de SO₄ requer 0,67 g de DQO para assegurar a completa redução do sulfato (LENS et al., 1998), a DQO também foi monitorada para avaliar se toda fonte de carbono estava sendo utilizada na degradação do sulfato e o resultado é apresentado na Figura 32.

Pela Figura 32, nota-se que até o segundo dia, nem toda fonte de carbono estava sendo consumida, ou seja, aproximadamente (23±11)% da DQO ainda estava sendo utilizada no processo metanogênico. Por outro lado, próximo ao quinto dia de experimento, praticamente toda a DQO havia sido utilizada para a redução de sulfato, levando a concentrações de sulfato residual bem baixas, inferiores a 70 mg L⁻¹, em todas as condições estudadas.

Esses resultados denotam que não houve falta da fonte de carbono para a redução de sulfato em todas as concentrações de cobalto avaliadas. Dessa forma, o fator limitante (Figura 31) se relacionou exclusivamente com a disponibilidade do elemento químico na conversão do sulfato.

Figura 32- Perfil de degradação de sulfato e de matéria orgânica, representada pela DQO, em função do tempo para as diferentes concentrações de cobalto (10, 30, 50 e 90 mg-Co L⁻¹) e controle(0 mg-Co L⁻¹) - Etapa 2B.

Fonte: Próprio autor.

5.3 Etapa experimental 3- Estudo da precipitação dos metais (Zn, Ga e Ge) com sulfeto

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos da Etapa 3, realizada em Galway, na Irlanda. A Figura 33 mostra um esquema representativo de todos os resultados apresentados para a Etapa 3. Nesta etapa o objetivo foi verificar a possibilidade de precipitação de metais, principalmente os raros, gálio e germânio, que aparecem junto com o zinco nos resíduos de mineração e que têm alto valor agregado para a indústria.

Figura 33- Esquema representativo da divisão dos resultados da Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

5.3.1 Primeiras observações e pH

A Figura 34 traz a primeira observação feita após um dia da montagem dos testes, podendo identificar que nos tubos nos quais foi utilizado o sulfeto químico, a solução interna apresentava-se turva, esbranquiçada e sem precipitado. No segundo teste, houve uma exceção a tal fato, com a mistura dos metais (Zn+Ga+Ge), visto que essa condição tinha um precipitado branco no fundo, mas, infelizmente, não foi passível de caracterização devido à sua instabilidade na solução. Já nos tubos falcon que continham as soluções com sulfeto

biológico, estas sempre apresentaram um precipitado marrom. Dessa forma, além das análises de quantificação do sulfeto e dos metais (Zn, Ga, Ge) em solução para observar o perfil de decaimento de concentração, também procurou-se identificar e caracterizar os compostos formados.

A explicação para a diferença entre as soluções se relaciona com as fontes/origem de sulfeto, visto que a solução estoque de sulfeto químico não apresentava nenhuma partícula em suspensão visível, pois partiu-se de uma solução saturada de sulfeto de sódio e água. No entanto, a solução biológica apresentava partículas, provavelmente provenientes dos grãos de cevada utilizados como doador de elétrons na prévia operação dos reatores em batelada e dos quais foram retiradas as alíquotas para o teste nos tubos falcon. Ademais, acredita-se que tais partículas em suspensão na alíquota do sulfeto biológico facilitem a aglomeração dos particulados e, conseqüentemente, a sedimentação do precipitado.

Figura 34- Apresentação da solução turva observada no sulfeto químico, o precipitado marrom observado nas soluções com sulfeto biológico e a exceção da duplicata de tubos falcon constituintes dos três metais juntos (Zn+Ga+Ge)- solução química de sulfeto com um precipitado branco- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Conforme já informado na seção 4.3 desta tese, o pH não foi ajustado, mas este é um fator importante a ser considerado na precipitação de sulfetos metálicos e por isso, foi feita a medição no início e final de cada teste e os valores estão mostrados na Tabela 13.

Pelos valores apresentados na Tabela 13, identifica-se que, quando a solução dentro do tubo falcon apresentava maior quantidade de sulfeto químico, o valor do pH era maior, pois a solução-mãe de sulfeto tinha um pH igual a 12 a fim de garantir o sulfeto no líquido. E quando a solução dentro do tubo falcon continha sulfeto de origem biológica, as soluções apresentaram pH na faixa de 7 a 8.

O pH das soluções nos tubos falcon entre 11 e 12 pode não ter favorecido a precipitação dos metais, visto que Balintova e Petrilakova (2011) observaram a precipitação praticamente total de $7,1 \text{ mg L}^{-1}$ de zinco entre pH 7,5 e 8,5 de uma DAM proveniente da Polônia usando soda cáustica (NaOH). Chen et al. (2018) também conseguiram efetiva precipitação química de zinco (100 mg L^{-1}), acima de 95%, utilizando cal (Ca(OH)_2), carbonato de sódio (Na_2CO_3) e sulfeto de sódio (Na_2S) em variações de pH de 5,5 até 11,9. Esposito et al. (2006) também avaliaram a precipitação do zinco utilizando sulfeto químico (Na_2S) e sulfeto biológico e o pH de precipitação foi 6,3 e 7,5, respectivamente. A concentração de Zn^{2+} , neste caso, foi de 3000 mg L^{-1} , o que é muito superior ao teor de 10 mg L^{-1} utilizado no presente estudo e que também pode ter influenciado na precipitação.

Tabela 13- Valores de pH, inicial e final, dos três testes relacionando o uso do sulfeto de origem química e do sulfeto de origem biológica, para qualquer metal ou a mistura deles-
Etapa 3.

<i>Teste</i>	pH			
	Sulfeto (químico)		Sulfeto (biológico)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>Primeiro</i>	12	11	8	7
<i>Segundo</i>	6	5	7	6
<i>Terceiro</i>	8	6	7	7

Na literatura é relatado um tamanho em torno de 10 nm para as partículas de sulfeto metálico. Ajibade; Mbese (2014) verificaram partículas de ZnS do tamanho de 4 a 7 nm, o que não é visível a olho nu e por isso depende de análises para identificação para verificar se realmente houve a precipitação das partículas. Para tanto, na presente pesquisa, no final dos testes, optou-se por fazer FEEM nas amostras líquidas e microscopia (MEV/EDX) em amostras sólidas/pó para tentar identificar os sulfetos metálicos precipitados nas amostras.

5.3.2 *Análise de FEEM nas amostras líquidas*

As amostras líquidas coletadas no final de cada teste, para cada metal e a mistura deles, foram submetidas à espectroscopia de fluorescência de matriz excitação-emissão (FEEM) com o intuito de identificar compostos presentes na amostra relacionada com a intensidade da luz e concentração. Os resultados da análise de FEEM são mostrados da Figura 35 a Figura 37.

Em termos gerais, o tom azul claro apresenta maior intensidade que o azul escuro, o que sugere a presença de algo em suspensão no líquido com baixo peso molecular (RIVERO et al., 1998). As amostras de germânio no primeiro teste (Figura 35) e de zinco e gálio do segundo teste (Figura 36), todas com o sulfeto de origem química, apresentaram a coloração mais clara de azul em alguns pontos do gráfico. Isso sugere partículas em suspensão, provavelmente bem pequenas, e que, por isso, geraram a turbidez esbranquiçada, conforme mostrado na Figura 34. As amostras com sulfeto de origem biológica apresentaram coloração azul mais escura, indicando a formação de compostos/complexos com peso molecular maior, representando os precipitados de cor marrom, observados na Figura 34.

Figura 35- Resultados de FEEM para o primeiro teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 36- Resultados de FEEM para o segundo teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 37- Resultados de FEEM para o terceiro teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

5.3.3 *Análise de MEV/EDX em amostras sólidas/pó*

Da Figura 38 até a Figura 46 são apresentados os resultados da triplicata de figuras coletadas por meio das análises de MEV (amostras examinadas na ordem de 20-100 μm) e EDX. As amostras dos testes que foram submetidas a esse tipo de análise estão destacadas em cor vermelha na Figura 10 (todo o primeiro teste, amostras com sulfeto de origem biológica e uma composta do metal gálio e sulfeto de origem química do segundo teste e amostras com sulfeto de origem química e biológica do elemento gálio do terceiro teste).

Em um primeiro momento esperava-se fazer a análise para todas as amostras de cada teste, mas ao analisar os resultados do primeiro teste, observou-se que os resultados não mostrariam os precipitados metálicos esperados, como aconteceu na Figura 18 do item 5.1.3 deste trabalho. Além disso, as porcentagens dos metais eram bem pequenas, menores 5%, o que levou a escolher somente algumas amostras do teste 2 e 3 para afirmação e comprovação dos resultados obtidos do primeiro teste de MEV e EDX. As amostras escolhidas do segundo e do terceiro teste foram: apenas as amostras biológicas e as do gálio, que serviu como representante dos três metais e passível de comparação entre os testes.

Nos resultados de EDX apresentados na Figura 38 até a Figura 46, é importante ressaltar que a porcentagem de carbono foi fornecida pelo recobrimento da amostra para fazer a análise e a porcentagem de cloro foi da solução estoque de metais. O sódio é constituinte da solução química de sulfeto e o ferro e fósforo provavelmente foram provenientes da alimentação do reator biológico do qual foram retiradas amostras de sulfeto biológico utilizado na terceira etapa experimental desta tese.

Nos três testes, de maneira geral, foi possível obter uma análise quantitativa da porcentagem de elementos químicos encontrados em cada amostra analisada, mesmo que em baixas concentrações. A porcentagem dos metais de interesse (Zn, Ga e Ge), e da mistura deles nas amostras, foi inferior a 10% e a porcentagem de enxofre foi bem variável (2,13-20,34%), sendo que as amostras que apresentaram maior teor de enxofre foram a de gálio do primeiro teste, independente da origem do sulfeto (Figura 39).

De acordo com as porcentagens destacadas da análise de EDX e complementando os resultados com análise de MEV, representada pelas fotos nos espectrogramas das Figura 38 até a Figura 46, não se pode afirmar que houve formação de precipitados metálicos por não terem sido observadas estruturas metálicas como foi mostrado no item 5.1.3 desta tese, na Etapa 1. Isso pode ter acontecido em razão da instabilidade dos compostos formados, que podem ter sido desestruturados na metodologia de confecção do pó para esta análise ou ter ficado na fase líquida, validando os resultados mostrados pela análise de FEEM.

Su; Wei e Vayssieres (2017) e Che e Bredehoft (1995) relataram que os sulfetos metálicos, nitretos, oxinitretos, fosfetos e silício sofrem forte instabilidade em soluções aquosas sob iluminação, indicando fotocorrosão. No caso dos sulfetos e nitretos, a causa da instabilidade é devido aos ânions dos compostos, N^{3-} e S^{2-} , que são propensos à oxidação durante um processo fotocatalítico.

Zhang et al. (2003) ressaltam que transformações estruturais nas nanopartículas de ZnS podem ser causadas pelas alterações no estado de agregação ou adsorção de água devido ao tamanho da partícula e umidade da atmosfera, o que faz sentido para as amostras em pó analisadas. Por exemplo, à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, a fase esfalerita (estrutura cúbica) do ZnS é um pouco mais estável que a fase wurtzita (estrutura hexagonal) e elas têm seu equilíbrio em temperatura de 1020°C e pressão de 1 bar.

Uma alternativa para aumentar a estabilidade dos sulfetos metálicos seria o uso de mistura Na_2S/Na_2SO_3 , como sugerido por Che e Bredehoft (1995), além do uso de nanopartículas reduzidas de óxido de grafeno, os quais melhoraram efetivamente a estabilidade do Cu_2S . No entanto, adicionar a mistura Na_2S/Na_2SO_3 , aumentaria a gama de compostos em solução, aumentaria a probabilidade de interação dos metais com o sódio, e seriam necessárias análises mais detalhadas do precipitado, o que não era objetivo do estudo.

Figura 38- Resultados SEM/EDX amostra de zinco com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 39- Resultados MEV/EDX amostra de gálio com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 40- Resultados MEV/EDX amostra de germânio com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 41- Resultados MEV/EDX amostra da mistura de metais (Zn+Ga+Ge) com sulfeto químico e biológico, primeiro teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 42- Resultados MEV/EDX amostra de zinco com sulfeto biológico, segundo teste- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Figura 43- Resultados MEV/EDX amostra de gálio com sulfeto químico e biológico, segundo teste- Etapa 3.

Ga- SULFETO QUÍMICO

Metais	Composição na amostra (%)
Carbono	16,06
Oxigênio	21,07
Enxofre	5,41
Sódio	12,45
Cloro	5,01
Gálio	8,06

Ga- SULFETO BIOLÓGICO

Metais	Composição na amostra (%)
Carbono	50,65
Cálcio	4,62
Oxigênio	15,47
Enxofre	1,48
Sódio	3,12
Cloro	1,30
Ferro	2,89
Gálio	20,47

Fonte: Próprio autor.

Figura 44- Resultados MEV/EDX amostra de germânio com sulfeto biológico, segundo teste- Etapa 3.

Ge- SULFETO BIOLÓGICO

Metais	Composição na amostra (%)
Carbono	29,56
Oxigênio	33,43
Enxofre	3,00
Sódio	18,33
Cloro	12,01
Potássio	1,19
Germânio	1,57

Fonte: Próprio autor.

Figura 45- Resultados MEV/EDX amostra da mistura de metais (Zn+Ga+Ge) com sulfeto biológico, segundo teste- Etapa 3.

Zn+Ga+Ge- SULFETO BIOLÓGICO			
Metais	Composição amostra (%)	Metais	Composição amostra (%)
Carbono	25,23	Fósforo	4,23
Oxigênio	37,76	Zinco	0,54
Enxofre	5,73	Gálio	2,46
Potássio	1,58	Germânio	3,67
Cloro	17,75		

Fonte: Próprio autor.

Figura 46- Resultados MEV/EDX amostra de gálio com sulfeto químico e biológico, terceiro teste- Etapa 3.

Ga- SULFETO QUÍMICO

Metais	Composição na amostra (%)
Carbono	12,37
Oxigênio	43,41
Enxofre	14,07
Sódio	24,17
Cloro	3,36
Gálio	2,62

Ga- SULFETO BIOLÓGICO

Metais	Composição na amostra (%)
Carbono	40,71
Oxigênio	39,42
Enxofre	2,13
Sódio	10,00
Cloro	0,94
Nitrogênio	6,47
Gálio	0,35

Fonte: Próprio autor.

5.3.4 *Quantificação de sulfeto e metais nas amostras líquidas*

Em todos os testes foram retiradas amostras diárias para analisar a concentração dos metais no ICP e para fazer a análise química do sulfeto presente no líquido, com os resultados apresentados na Figura 47, compreendendo os três testes.

No Geral, pela Figura 47, observa-se um perfil de decaimento de concentração dos sulfetos de origem química e biológica, com as concentrações de metais praticamente constantes.

Uma possível explicação para não se observar decaimento para os metais pela análise feita no ICP pode estar no método utilizado no preparo prévio das amostras. Segundo Luther et al. (1996), os complexos de Zn e sulfeto se dissociam abaixo do pH 6,7 e, assim, as partículas solubilizam-se no líquido, de forma que os sulfetos metálicos também foram desfeitos e todo o metal ali presente na amostra, foi contabilizado.

Figura 47- Resultados das análises de sulfeto e metais no líquido: a) referente ao primeiro teste; b) referente ao segundo teste e c) referente ao terceiro teste, da terceira etapa experimental (Etapa 3).

Fonte: Próprio autor.

Para tentar elucidar melhor os resultados, os dados de sulfeto da Figura 47 foram submetidos à análise da cinética de primeira ordem de decaimento de substrato, a mesma utilizada na segunda fase experimental desta Tese (Equação 6). A Tabela 14 e a Figura 48 trazem os resultados do modelo cinético ajustado aos dados.

Tabela 14- Parâmetros (k, Chi² e R²) dos ajustes de decaimento de primeira ordem para as concentrações de sulfeto químico e biológico para todos os metais e a mistura deles, referentes à Etapa 3.

Testes		Zn (Químico)	Zn (Biológico)	Ga (Químico)	Ga (Biológico)	Ge (Químico)	Ge (Biológico)	Mist. (Químico)	Mist. (Biológico)
Primeiro	$k \text{ (dia}^{-1}\text{)}$	0,031	0,141	0,169	0,351	0,673	0,405	0,654	0,432
	Chi^2	0,710	0,543	0,931	0,186	13,8	0,183	20,3	4,26
	R^2	0,998	0,999	0,999	0,999	0,983	0,999	0,739	0,950
Segundo	$K \text{ (dia}^{-1}\text{)}$	-	-	0,401	0,939	0,011	0,307	1,08	-0,247
	Chi^2	21,6	17,3	0,056	8,93	4,49	8,14	25,4	22,3
	R^2	0,383	0,855	0,992	0,973	0,833	0,863	0,995	0,681
Terceiro	$K \text{ (dia}^{-1}\text{)}$	-	1,36	0,659	1,33	0,193	1,16	-0,269	1,18
	Chi^2	7,69	51,2	1,57	-	2,02	4,25	9,70	7,02
	R^2	0,886	0,777	0,997	0,482	0,975	0,987	0,767	0,996

Figura 48- Ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados de sulfeto químico e biológico, para cada metal isoladamente (Zn, Ga e Ge) e a misturas deles (Zn+Ga+Ge) em cada um dos testes- Etapa 3.

Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 14 nota-se que, em alguns casos, não foi possível ajustar o modelo proposto aos dados de concentração de sulfeto (químico e biológico), como foi o caso das amostras de zinco no segundo e terceiro testes, e que em alguns casos, o ajuste teve qualidade ruim, justificado pelos valores dos parâmetros Chi^2 e R^2 apresentados, que devem se aproximar de zero e de 1,0, respectivamente. Tal evidência pode estar relacionada com a perda de sulfeto para a atmosfera na coleta das amostras diárias, resultando em valores subestimados da concentração de sulfeto. Por outro lado, as soluções que podem ser destacadas por apresentarem os melhores ajustes dos dados foram: germânio com sulfeto químico ($k=0,673 \text{ dia}^{-1}$) - Primeiro teste; mistura dos metais com sulfeto químico ($k=1,08 \text{ dia}^{-1}$) – Segundo teste e mistura dos metais com sulfeto biológico ($k=1,18 \text{ dia}^{-1}$) Terceiro teste. Estes resultados podem ser potenciais pontos de partida para trabalhos futuros para que ocorra uma efetiva precipitação dos sulfetos metálicos.

Ao analisar os dados separando soluções com sulfeto químico e com sulfeto biológico, no geral, observou-se que os menores valores de k obtidos eram nas soluções com sulfeto químico. Isso pode estar em acordo com o raciocínio apresentado pelas análises de FEEM, de que as partículas aglomeradas devem ser muito pequenas e, por isso, ficavam suspensas no líquido. Para as soluções com sulfeto biológico, os valores de k são maiores possivelmente devido ao fato das partículas em suspensão, provenientes da solução-mãe, favorecerem a precipitação e sedimentação.

A fim de analisar se a quantidade de sulfeto foi suficiente para precipitar os 10 mg L^{-1} dos metais, foram feitos cálculos teóricos e estequiométricos relacionando os metais com o íon sulfeto conforme Reação 15 até Reação 17 e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15- Resultado do cálculo da quantidade máxima do metal que seria precipitado para as concentrações de sulfeto de (6,67, 20 e 50 mg-S²⁻ L⁻¹) - Etapa 3.

	mg-Zn ²⁺ L ⁻¹	mg-Ga ³⁺ L ⁻¹	mg-Ge ⁴⁺ L ⁻¹
<i>Primeiro Teste</i> (50 mg-S ²⁻ L ⁻¹)	101,9	72,5	56,6
<i>Segundo Teste</i> (6,67 mg-S ²⁻ L ⁻¹)	13,6	9,7	7,6
<i>Terceiro Teste</i> (20 mg-S ²⁻ L ⁻¹)	40,7	28,9	22,6

De acordo com os cálculos apresentados na Tabela 15, faltaria sulfeto para precipitar todo o germânio no segundo teste, sendo o fator limitante no processo de precipitação, mas no geral, todo o metal poderia ter sido precipitado com o sulfeto.

Em suma, nesta Etapa 3, acredita-se que a baixa concentração utilizada dos metais, mais a metodologia de análises como foi proposta, tenham inviabilizando resultados mais conclusivos. Lewis (2010) já havia evidenciado que os estudos de precipitação dos metais era ainda muito empírico, usando métodos falhos para avaliar a eficiência do processo de precipitação dos sulfetos metálicos, o que leva a resultados inconsistentes entre os estudos. Isso provavelmente foi o que aconteceu neste estudo e reforçou a necessidade de testes químicos básicos de precipitação para os elementos químicos gálio e germânio, já que na literatura esses dados são escassos, comparados aos do zinco.

6. CONTRIBUIÇÕES DESTA PESQUISA PARA O AVANÇO DA CIÊNCIA NO TEMA DE REDUÇÃO DE SULFATO PROVENIENTE DE DAM E PRECIPITAÇÃO DE SULFETOS METÁLICOS

A otimização do processo de redução de sulfato se dá pelo conjunto, reator anaeróbio e condições operacionais favoráveis. HAO et al. (2014) destacam fatores que podem influenciar diretamente o processo, como: TDH, tipo de inóculo (flocos, biofilme e agregado), espécies de BRS, sintrofismo dos microrganismos, concentração de sulfato e de metais, concentração de nitrato, pH, relação DQO/SO₄²⁻, temperatura, tempo de retenção celular, concentração de sulfeto e condição de mistura. Sánchez-Andrea et al. (2014) identificaram os tipos de reatores biológicos já aplicados nos processos de redução de sulfato (*Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR); *Gas-Lift Bioreactor* (GLB); *Submerged Membrane Bioreactor* (MBR); *Fluidized Bed Reactor* (FBR); *Upflow Anaerobic Granular Sludge Bed* (UASB); *Expanded Granular Sludge Bed* (EGSB), aos quais podem ser somados o *horizontal-flow anaerobic immobilized biomass* (HAIB) avaliado por Rodriguez et al. (2016), o *Down-flow fixed-structured bed* (DFSBR) avaliado por Godoi; Foresti; Damianovic (2017) e Nogueira et al. (2019), e o AnSTBR avaliado neste trabalho - Figura 49.

Cada reator apresentado na Figura 49 tem sua particularidade de configuração, condição de mistura e disposição da biomassa, seja suspensa ou aderida em algum material suporte. A Tabela 16 traz alguns dados de estudos de casos e a comparação mais fiel a ser feita é do AnSTBR utilizado na Etapa 1 deste trabalho com o UASB utilizado por Cunha et al. (2019), visto que os inóculos são do mesmo tipo (abatedouro de aves da Dacar), temperatura de 30°C, etanol como doador de elétrons, TDH de 16 h, mesma carga de sulfato e DQO de 2,25 g L⁻¹ d⁻¹ e relação DQO/SO₄²⁻ de 1,0. Em termos de resultados de remoção, os dois sistemas apresentam intervalos de valores bem parecidos (Tabela 16), destacando-os como efetivos na remediação de águas ricas em sulfato.

O UASB é amplamente avaliado em processos anaeróbios e bastante consolidado para tratamento de esgoto sanitário. Porém, esse tipo de reator sofre com entupimentos frequentes e persistentes na entrada (LIER et al., 1993), o que, em longo prazo e em escala real, também pode ser causado pelos sulfetos metálicos que se precipitam no tratamento biológico de DAM.

A configuração do leito fixo estruturado do AnSTBR é um detalhe que contorna desvantagens provenientes do UASB. Ou seja, assim, é possível descartar mais facilmente o lodo do reator que não está com função ativa, podendo causar entupimentos e toxicidade (por

sulfeto ou excesso de metais), ou até mesmo recuperar os metais presentes na DAM que precipitaram na forma de sulfetos metálicos. Aliado a isso, o leito estruturado com a adesão da biomassa nas hastes revestidas de espumas de poliuretano promove um melhor escoamento de líquido e com menos possibilidade de anomalias hidrodinâmicas.

No ensaio hidrodinâmico feito antes da inoculação das espumas no AnSTBR, ou seja, sem atividade biológica, e conforme cálculos mostrados em Godoi (2018), foi obtido um TDH real de 15 h (TDH teórico: 16h), 211 tanques de mistura completa em série e uma dispersão longitudinal de 0,0024. Isto implica em um escoamento mais próximo do pistonado, com dispersão desprezível, colaborando para a retenção celular no sistema.

Com relação às condições operacionais aplicadas no AnSTBR, estas também favoreceram o processo de remoção de sulfato e o estabelecimento da sulfetogênese. A temperatura de 30°C contribuiu para o crescimento das BRS no reator, já que é a considerada ótima dentro do intervalo de temperatura (-5 a 75°C) a qual elas podem suportar (HAO et al., 2014). O etanol (doador de elétrons/fonte de carbon), como já mencionado na metodologia, é um composto de fácil degradação e o TDH utilizado de 16 h foi suficiente para convertê-lo.

A relação DQO/SO₄²⁻ de 1,0, um pouco acima da estequiométrica de 0,67, permitiu o sintrofismo das arqueias metanogênicas e as bactérias (item 5.1.4), atingindo o ápice da remoção de matéria orgânica (DQO) de (90±11)%. Ligado a isso, a estratégia de adição gradativa de metais e nutrientes no decorrer dos 300 dias de operação do reator promoveu a seleção dos microrganismos redutores de sulfato, conforme verificado nas amostras submetidas ao sequenciamento genético (Tabela 9- item 5.1.4). Foi verificada também uma mudança preferencial da via incompleta de oxidação do etanol para a via completa e isso foi comprovado com a presença dos gêneros *Sulfurovum* e *Sulfurimonas* no inóculo e do *Thermodesulfobium* na biomassa suspensa (AKERMAN; BUTTERFIELD; HUBER, 2013; HAO et al., 2014), mudando a porcentagem de DQO utilizada pela via sulfetogênica (DQO_{BRS}) de (36±12)% nos primeiros 44 dias, para (69±10)% nos últimos 80 dias de operação do AnSTBR.

Com relação à concentração de sulfeto, apesar dos valores obtidos nesta pesquisa variarem de (199±51) a (299±40) mg L⁻¹ (Tabela 7 - Item 5.1.1) e podendo ser consideradas tóxicas por alguns autores (item 5.1.2), acredita-se que os descartes feitos no fundo cônico do reator eliminaram ou mitigaram a toxicidade no meio e até por isso não houve prejuízo do tratamento da DAM estudada em termos de eficiência.

Na Etapa 2, foi possível verificar que o elemento químico cobalto, além de contribuir positivamente na metanogênese, pode também contribuir positivamente na eficiência de

remoção de sulfato. Embora, o que ainda não se sabe, e é de extrema importância, é se a interação do cobalto com os outros metais presentes na DAM da Etapa 1 podem ter sido responsáveis por esse resultado, já que o planejamento experimental utilizado não possibilita avaliar essa interação.

Os resultados obtidos na Etapa 3 indicaram que a precipitação de metais ainda traz muitos desafios e necessita de um estudo mais detalhado das condições, mecanismos envolvidos e, principalmente, dos instrumentos necessários para a identificação e caracterização dos precipitados.

Na literatura, não há um consenso sobre os parâmetros e condições adequadas para a precipitação química dos metais, porém, a utilização do sulfeto de origem biológica se mostra uma potencial alternativa, além de reduzir gastos com a compra de reagentes químicos ou gerar outro resíduo que necessite de pós-tratamento. Além disso, a precipitação de metais raros, como é o caso do gálio e do germânio, avaliada na Etapa 3, também é algo desconhecido e a literatura não traz muitas informações sobre estes elementos químicos, o que evidencia a necessidade de prévios estudos de química básica, como a obtenção do produto de solubilidade dos metais para que se supere o empirismo.

Tabela 16- Resumo de trabalhos sobre remoção de sulfato proveniente de DAM e suas particularidades.

Tipo de reator	pH inicial	Inóculo	Fonte de carbono	TDH ou TC (h)	Relação DQO/SO ₄ ²⁻	Observações
CSTR^(a)	4,0	Abatedouro de aves	Etanol	48	1,0	[SO ₄ ²⁻] _i : = [DQO] _i = 1500 mg L ⁻¹ Remoção: SO ₄ ²⁻ : 39-73% e DQO: 68-94%
GLB^(b)	7,0-7,5	Lodo granular THIOPAC	Etanol	24	NI	[SO ₄ ²⁻] _i : 5000-10000 mg L ⁻¹ e [DQO] _i : 5% da [SO ₄ ²⁻] _i Remoção: SO ₄ ²⁻ : 88%
MBR^(c)	4,0	Lodo granular aclimatado	H ₂ /CO ₂	Dependente da [SO ₄ ²⁻]	NI	[SO ₄ ²⁻] _i : 1000-3500mg L ⁻¹ Remoções não contabilizadas
FBR^(d)	7,5 e 8,4	Esgoto doméstico	Lactato/ Glicerol	10	1,8 a 2,6	[SO ₄ ²⁻] _i : 2000mg L ⁻¹ e [DQO] _i : 5000 mg L ⁻¹ Remoção: SO ₄ ²⁻ : 90-97% e DQO: 51-64%
UASB^(e)	4,0	Abatedouro de aves	Etanol	14, 16 e 24	0,67; 0,8 e 1,0	[SO ₄ ²⁻] _i : e [DQO] _i variável: 500 a 1500 mg L ⁻¹ Remoção: SO ₄ ²⁻ : 48-92% e DQO: 78-89%
EGSB^(f)	7,5	Lodo reator sulfetogênico	Metanol	10 e 12	0,3 e 1,25	[SO ₄ ²⁻] _i : 1200- 1920 mg L ⁻¹ e [DQO] _i : 2400-3840 mg L ⁻¹ , Sistema termofílico, Tempo reciclo de 1,5h
HAIB^(g)	3,0-4,0	Abatedouro de aves	Etanol	24	0,67; 1,0 e 1,92	[SO ₄ ²⁻] _i : 1200 a 1500 mg L ⁻¹ ; DQO] _i : 804 a 2304mg L ⁻¹ Remoção: SO ₄ ²⁻ : 13,8-74,5% e DQO: 35-75,7%
DFSBR^(h)	6,0	Abatedouro de aves	Vinhaça	20	2,0	[SO ₄ ²⁻] _i : 2000 mg L ⁻¹ e [DQO] _i : 4000 mg L ⁻¹ ; fluxo descendente de líquido Remoção: SO ₄ ²⁻ : >90% e DQO: 35-37%
AnSTBR⁽ⁱ⁾	4,0	Abatedouro de aves	Etanol	16	1,0	[SO ₄ ²⁻] _i : = [DQO] _i = 1500 mg L ⁻¹ Remoção: SO ₄ ²⁻ : 42-83% e DQO: 68-90%

NI: não identificado; TC: tempo de ciclo (h); [SO₄²⁻]_i: concentração inicial de sulfato (mg L⁻¹); [DQO]_i: concentração inicial de DQO(mg L⁻¹).

Referências: ^(a)(COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017); ^(b)(VAN HOUTEN et al., 2006); ^(c)(BIJMANS et al., 2010); ^(d)(BERTOLINO et al., 2015); ^(e)(CUNHA et al., 2019); ^(f)(WEIJMA et al., 2000); ^(g)(RODRIGUEZ et al., 2016); ^(h)(GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2017); ⁽ⁱ⁾ presente trabalho.

Fonte: Adaptado de (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

7.CONCLUSÕES

Em virtude da hipótese central e todos os resultados e discussão apresentadas nesta tese, verificou-se que a configuração AnSTBR é adequada para a biorremediação de um efluente rico em sulfato e metais, simulando a DAM, visto que apresentou remoções de sulfato entre 42 a 83% e de matéria orgânica (DQO) na ordem de 68 a 90% para uma COV e CSV iguais a $2,25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e TDH de 16 h. Além disso, foi possível verificar a presença de estruturas cristalinas nas análises de MEV, indicando os precipitados metálicos nos descartes de fundo no reator (*Hipótese central aceita*).

Com base nos objetivos específicos, os resultados permitem que se chegue às seguintes conclusões:

- ✓ O AnSTBR se mostrou uma configuração de reator eficiente no tratamento de DAM, sendo até mais vantajoso que o UASB quanto à possibilidade de descarte de biomassa no fundo cônico do reator, evitando entupimentos e toxicidade que futuramente poderiam ocorrer, até de forma mais grave em uma escala real (*Hipótese aceita*).
- ✓ A estratégia de adição gradual e ascendente dos elementos químicos permitiu uma melhor adaptação das bactérias, favorecendo a biorremediação do efluente sintético, tanto que as remoções de sulfato e de matéria orgânica chegaram a atingir valores de $(83 \pm 7)\%$ e $(90 \pm 11)\%$, respectivamente, quando não havia diluição do meio líquido (*Hipótese aceita*). Ademais, no decorrer da operação do AnSTBR também foi verificado a mudança da via metabólica de conversão do etanol da incompleta para a completa, confirmada pela análise de biologia molecular.
- ✓ Houve influência dos metais no processo de redução de sulfato e os resultados indicaram o elemento cobalto como influenciador positivo e o elemento ferro como influenciador negativo, refutando trabalhos na literatura, como o de Vieira et al. (2016), Costa, Rodriguez e Sancinetti (2017) e Cunha et al. (2019), os quais verificaram melhora na remoção de sulfato com a adição de ferro no sistema. A concentração considerada “ideal” de cobalto para a otimização da processo sulfetogênico foi a de 10 mg L^{-1} , minimizando ao máximo a concentração de sulfato residual no efluente. (*Hipótese aceita*)

- ✓ Os testes de precipitação dos metais (Zn, Ga e Ge) com sulfeto indicaram que as soluções que continham a solução de sulfeto biológico apresentaram um precipitado marrom e as soluções com sulfeto químico não, mostrando-se turvas esbranquiçadas, indicando a formação de partículas muito pequenas presentes no líquido. Entretanto, mesmo nas amostras com sulfeto biológico, com a formação de um precipitado visível a olho nu, não foi possível afirmar a presença de precipitados metálicos pela análise de MEV (*Hipótese refutada*). Além disso, os resultados, no geral, mostraram que um estudo prévio da química dos elementos gálio e germânio e sobre a instabilidade dos sulfetos metálicos são imprescindíveis para se sair do empirismo.

8.RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante os experimentos realizados e com todos os resultados obtidos, foram identificadas algumas lacunas e sugestões para trabalhos futuros, são elas:

- i. O reator AnSTBR (Etapa 1) apresentou resultados satisfatórios com relação à redução de sulfato utilizando o etanol como doador de elétrons, quando submetido ao aumento gradual de metais e nutrientes durante 300 dias de operação e por isso deve-se avaliá-lo em escala piloto e utilizando DAM para verificar a aplicabilidade do estudo;
- ii. Avaliar a questão da importância dos elementos traço no processo sulfetogênico e como a interação dos metais podem contribuir com a otimização do processo de redução de sulfato. Estudar também a inibição do cobalto em processos de redução de sulfato diante dos resultados que foram obtidos na segunda etapa experimental (Etapa 2);
- iii. Diante do curto período para execução da terceira etapa experimental desta tese (Etapa 3), sugere-se estudar com maior profundidade o processo de precipitação de metais com sulfeto e como identificar corretamente os precipitados. Além disso, deve-se estudar com maior detalhe a química dos elementos, principalmente do gálio e do germânio, que possuem poucas informações na literatura e que pode facilitar no processo da precipitação.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, M.; HIRASAWA, J.; VARESCHE, M. Development and validation of two methods to quantify volatile acids. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. May, p. 406–414, 2014.
- AHMED, I. A. M. et al. Formation of green rust sulfate: A combined in situ time-resolved X-ray scattering and electrochemical study. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6593–6603, 2010.
- AJIBADE, P. A.; MBESE, J. Z. Synthesis and characterization of metal sulfides nanoparticles/poly(methyl methacrylate) nanocomposites. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, 2014.
- AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid Mine Drainage (AMD): causes , treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 1139–1145, 2006.
- AKERMAN, N. H.; BUTTERFIELD, D. A.; HUBER, J. A. Phylogenetic diversity and functional gene patterns of sulfur-oxidizing subseafloor Epsilonproteobacteria in diffuse hydrothermal vent fluids. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JUL, p. 1–14, 2013.
- ANNE CHAO. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.
- ANZOLA-ROJAS, M. del P.; ZAIAT, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, p. 1–11, 2015.
- AUGER, S.; DANCHIN, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Global expression profile of *Bacillus subtilis* grown in the presence of sulfate or methionine. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 18, p. 5179–5186, 2002.
- AYORA, C. et al. Recovery of Rare Earth Elements and Yttrium from Passive-Remediation Systems of Acid Mine Drainage. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 15, p. 8255–8262, 2016.
- AZABOU, S.; MECHICHI, T.; SAYADI, S. Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. **Minerals Engineering**, v. 20, n. 2, p. 173–178, 2007.
- AZIMI, A. et al. Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewaters: A Review. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 1, p. 37–59, 2017.
- AZIZ, H. A.; ADLAN, M. N.; ARIFFIN, K. S. Heavy metals (Cd, Pb, Zn, Ni, Cu and Cr(III)) removal from water in Malaysia: Post treatment by high quality limestone. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1578–1583, 2008.
- BAI, H. et al. Treatment of acid mine drainage by sulfate reducing bacteria with iron in bench scale runs. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 818–822, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.070>>.
- BAI, H. et al. Bioremediation of copper-containing wastewater by sulfate reducing bacteria coupled with iron. **Journal of Environmental Management**, v. 129, p. 350–356, 2013b.
- BALINTOVA, M.; PETRILAKOVA, A. Study of pH influence on selective precipitation of heavy metals from acid mine drainage. **Chemical Engineering Transactions**, v. 25, n. January 2011, p. 345–350, 2011.

BANKS, C. J. et al. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 127–135, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.068>>.

BARTACEK, J. et al. Cobalt toxicity in anaerobic granular sludge: Influence of chemical speciation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1465–1474, 2008.

BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. **Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems**. [s.l: s.n.]

BEKMEZCI, O. K. et al. Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, n. 3, p. 670–676, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.087>>.

BENNER, S. G. et al. Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 16, p. 2793–2799, 1999.

BERTOLINO, S. M. et al. Comparison of UASB and fluidized-bed reactors for sulfate reduction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 59–71, 2015.

BIGHAM, J. M.; NORDSTROM, D. K. Iron and aluminum hydroxysulfates from acid sulfate waters. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 40, n. 1, p. 351–403, 2000.

BIJMANS, M. F. M. et al. Sulfate reduction at pH 4.0 for treatment of process and wastewaters. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 1029–1037, 2010.

BINNEMANS, K. et al. Recovery of Rare Earths From Industrial Waste Residues : a Concise Review. (A. Malfliet et al., Eds.) In: 3rd International Slag Valorisation Symposium, Leuven, Belgium. **Anais...** Leuven, Belgium: 2013.

BLANCO, V. M. C.; OLIVEIRA, G. H. D.; ZAIAT, M. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. **Renewable Energy**, v. 139, p. 1310–1319, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>>.

CAMILOTI, P. R. et al. 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.

CAMILOTI, P. R. **Recuperação de enxofre elementar a partir de águas residuárias em reatores anaeróbio/microaerado**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

CAO, J. et al. Precipitation of valuable metals from bioleaching solution by biogenic sulfides. **Minerals Engineering**, v. 22, n. 3, p. 289–295, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2008.08.006>>.

CARNEIRO, R. B. et al. Feasibility of anaerobic packed and structured-bed reactors for sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal from domestic sewage. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 419–429, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.437>>.

CASTILLO, J. et al. Biologically-induced precipitation of sphalerite-wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment. **Science of the Total Environment**, v. 423, p. 176–184, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.013>>.

40

CHE, S. C.; BREDEHOFT, R. L. **Hydrogen production technologies**. [s.l.: s.n.]v.

CHEN, Q. et al. Comparison of heavy metal removals from aqueous solutions by chemical precipitation and characteristics of precipitates. **Journal of Water Process Engineering**, v. 26, n. November, p. 289–300, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.11.003>>.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 2008.

CHERNICHARO, C. A. de L. **Biological Wastewater Treatment Series**. [s.l.: s.n.]v. 4

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios de tratamento biológico de águas residuárias volume 5: Reatores anaeróbios**. [s.l.: s.n.]v. 5

CHOONG, Y. Y. et al. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 369–379, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.028>>.

CHRISTOPHERSON, M. R. et al. The Genome Sequences of *Cellulomonas fimi* and “*Cellvibrio gilvus*” Reveal the Cellulolytic Strategies of Two Facultative Anaerobes, Transfer of “*Cellvibrio gilvus*” to the Genus *Cellulomonas*, and Proposal of *Cellulomonas gilvus* sp. nov. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

COSTA, B. Z. da et al. Enzymatic potential of heterotrophic bacteria from a neutral copper mine drainage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 846–852, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.004>>.

COSTA, J. M.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. Removal sulfate and metals Fe+2, Cu+2, and Zn+2 from acid mine drainage in an anaerobic sequential batch reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1985–1989, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.011>>.

COSTA, Z. S. et al. Influence of magnetic field on barium sulfate incrustation from aqueous solutions. **Heliyon**, v. 5, p. e02032, 2019.

CUNHA, M. P. et al. Long-term performance of a UASB reactor treating acid mine drainage: effects of sulfate loading rate, hydraulic retention time, and COD/SO₄²⁻ ratio. **Biodegradation**, v. 30, p. 47–58, 2019.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of synthetic wastewaters at different levels of sulfate and COD/sulfate ratios in horizontal-flow anaerobic reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 3, p. 383–393, 2007.

DAS, N.; DAS, D. Recovery of rare earth metals through biosorption: An overview. **Journal of Rare Earths**, v. 31, n. 10, p. 933–943, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0721\(13\)60009-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0721(13)60009-5)>.

DE AQUINO, S.; FUESS, L. T.; PIRES, E. C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 219–228, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.120>>.

DE OLIVEIRA, C. M. et al. Valorization of iron pyrite from coal mining in southern Brazil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 102931, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102931>>.

DELFORNO, T. P. et al. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 103–109, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.042>>.

DELFORNO, T. P. et al. Microbial diversity of a full-scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment: integration of 16S rRNA gene amplicon and shotgun metagenomic sequencing. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 3, p. 1–12, 2017.

DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, J. Optimization of the operation of packed bed bioreactor to improve the sulfate and metal removal from acid mine drainage. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 135–144, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.102>>.

EKPENYONG, M. G. et al. Plackett-burman design and response surface optimization of medium trace nutrients for glycolipopeptide biosurfactant production. **Iranian Biomedical Journal**, v. 21, n. 4, p. 249–260, 2017.

EL BAYOUMY, M. A. et al. Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 112, n. 1–2, p. 67–84, 1999.

EQUEENUDDIN, S. M. et al. Hydrogeochemical characteristics of acid mine drainage and water pollution at Makum Coalfield, India. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 105, n. 3, p. 75–82, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2010.04.006>>.

ESPOSITO, G. et al. Use of biogenic sulfide for ZnS precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 51, n. 1, p. 31–39, 2006.

FARROW, J. A. E. et al. Phylogenetic evidence that the gram-negative nonsporulating bacterium *Tissierella* (bacteroides) *praeacuta* is a member of the *Clostridium* subphylum of the gram-positive bacteria and description of *Tissierella creatinini* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 436–440, 1995.

FERMOSO, F. G. et al. Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3652–3667, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.043>>.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>>.

FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. de C. REMEDIAÇÃO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA USANDO ZEÓLITAS SINTETIZADAS A PARTIR DE CINZAS LEVES DE CARVÃO. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 735–740, 2006.

GARCÍA, C. et al. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. **Minerals Engineering**, v. 14, n. 9, p. 997–1008, 2001.

GENCHI, G. et al. Mercury exposure and heart diseases. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017.

GHAEDI, M. et al. Comparison of the efficiency of palladium and silver nanoparticles loaded on activated carbon and zinc oxide nanorods loaded on activated carbon as new adsorbents for removal of Congo red from aqueous solution: Kinetic and isotherm study. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 4, p. 725–734, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.01.015>>.

GIL-GARCIA, C. et al. Performance improvement of a thermophilic sulfate-reducing bioreactor under acidogenic conditions: Effects of diversified operating strategies. **Journal of Environmental Management**, v. 207, p. 303–312, 2018.

GLASS, J. B.; ORPHAN, V. J. Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. FEB, p. 1–20, 2012.

GODOI, L. A. G. de et al. Evaluating and Refining Alkalinity Calculations Due to Sulfide and Bicarbonate Accessed by Titration in Anaerobic Sulfate-Reducing Bioreactors. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 228, n. 9, p. 1–12, 2017.

GODOI, L. A. G. de. **Potencial do reator anaeróbio de leito fixo-estruturado e fluxo descendente para o tratamento de drenagem ácida de minas em.** 2018. 2018.

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

GOODWIN, J. A. S.; WASE, D. A. J.; FORSTER, C. F. Effects of nutrient limitation on the anaerobic upflow sludge blanket reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 11, p. 877–884, 1990.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

GROUDEV, S. et al. Bioremediation of acid mine drainage in a uranium deposit. **Hydrometallurgy**, v. 94, n. 1–4, p. 93–99, 2008.

GUIDOTTI, T. L. Hydrogen sulphide. **Occupational Medicine**, v. 46, n. 5, p. 367–371, 2007.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.075>>.

GUO, L.; CUTRIGHT, T. J. Effect of citric acid and bacteria on metal uptake in reeds grown in asynthetic acid mine drainage solution. **Journal of Environmental Management**, v. 150, p. 235–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.022>>.

HAMILTON, W. A. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. **Annual reviews microbiology**, v. 39, p. 195–217, 1985.

HANSEN, T. A. Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. v. 3, n. Iv, p. 165–185, 1994.

HAO, T. wei et al. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, v. 65, p. 1–21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.043>>.

HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. Remediation and selective recovery of metals from acidic mine waters using novel modular bioreactors. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 20, p. 12206–12212, 2014.

HIRASAWA, J. S. et al. Application of molecular techniques to evaluate the

methanogenic archaea and anaerobic bacteria in the presence of oxygen with different COD:Sulfate ratios in a UASB reactor. **Anaerobe**, v. 14, n. 4, p. 209–218, 2008.

HOLMES, D. E.; SMITH, J. A. Biologically Produced Methane as a Renewable Energy Source. In: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l: s.n.]p. 1–61.

INAGAKI, F. et al. Sulfurovum lithotrophicum gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the E-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1477–1482, 2004.

JAIN, S.; ARNEPALLI, D. N. Biochemically Induced Carbonate Precipitation in Aerobic and Anaerobic Environments by Sporosarcina pasteurii. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 5, p. 443–451, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1569180>>.

JARVIS, Å. et al. Improvement of a grass-clover silage-fed biogas process by the addition of cobalt. **Biomass and Bioenergy**, v. 12, n. 6, p. 453–460, 1997.

JING, Z. et al. UASB performance and electron competition between methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in treating sulfate-rich wastewater containing ethanol and acetate. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 349–357, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.137>>.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: A review. **Science of the Total Environment**, v. 338, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 3–14, 2005.

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, n. 6, p. 541–564, 2007.

KAUR, G. et al. Alternative neutralisation materials for acid mine drainage treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 22, n. January, p. 46–58, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.01.004>>.

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. 475–493, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.082>>.

KIRAN, M. G.; PAKSHIRAJAN, K.; DAS, G. Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: Mechanism and cell surface characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 62–70, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.042>>.

KIYUNA, L. S. M.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 103–112, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.028>>.

KONARZEWSKI, V. H. C. **Tratamento combinado de lixiviados de aterros sanitários e drenagem ácida de minas**. 2009. 2009.

KOSIŃSKA, K.; MIŚKIEWICZ, T. Precipitation of heavy metals from industrial wastewater by Desulfovibrio desulfuricans. **Environment Protection Engineering**, v. 38, n. 2, p. 51–60, 2012.

KOTHAMASI, D.; KOTHAMASI, S. Cobalt interference in iron-uptake could

inhibit growth in *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 755–758, 2004.

LAPARA, T. M. et al. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3951–3959, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92244/pdf/am003951.pdf>>.

LEBRERO, R. et al. Biogas upgrading from vinasse digesters: a comparison between an anoxic biotrickling filter and an algal-bacterial photobioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 9, p. 2488–2495, 2015.

LENS, P. N. L. et al. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.

LEWIS, A. E. Review of metal sulphide precipitation. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 2, p. 222–234, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.06.010>>.

LIER, J. B. Van et al. Anaerobic Sewage Treatment using UASB Reactors: Engineering. In: FANG, H. H. P. (Ed.). **Environmental Anaerobic Technology**. Hong Kong: The University of Hong Kong, 1993. p. 5–31.

LIU, F. et al. Extraction of gallium and germanium from zinc refinery residues by pressure acid leaching. **Hydrometallurgy**, v. 164, p. 313–320, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.06.006>>.

LIU, F. et al. Recovery and separation of gallium(III) and germanium(IV) from zinc refinery residues: Part II: Solvent extraction. **Hydrometallurgy**, v. 171, n. October 2016, p. 149–156, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2017.05.009>>.

LIU, Y. et al. New Approach to Study Iron Sulfide Precipitation Kinetics, Solubility, and Phase Transformation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 31, p. 9016–9027, 2017b.

LOBO, S. A. L. et al. Two distinct roles for two functional cobaltochelatases (CbiK) in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Biochemistry**, v. 47, n. 21, p. 5851–5857, 2008.

LOCQUET, N.; CORDELLA, C. B. Y. **3D Fluorescence Spectroscopy and Its Applications**, 2018. . (Nota técnica).

LUTHER, G. W. et al. Determination of metal (Bi)sulfide stability constants of Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} by voltammetric methods. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 671–679, 1996.

MAĆZYŃSKA, J. et al. Production and use of biofuels for transport in Poland and Brazil – The case of bioethanol. **Fuel**, v. 241, n. December 2018, p. 989–996, 2019.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. [s.l: s.n.]v. 66

MCINERNEY, M. J. et al. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: Life at the thermodynamic limit of microbial growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7600–7605, 2007.

MOCKAITIS, G. Remoção de Cd^{2+} e Cu^{2+} de águas residuárias utilizando biorreator anaeróbio contínuo de leito fixo ordenado. 2011.

MOCKAITIS, G. et al. Toxic effects of cadmium (Cd^{2+}) on anaerobic biomass: Kinetic and metabolic implications. **Journal of Environmental Management**, v. 106, p. 75–84, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.056>>.

MOESTEDT, J. et al. Effects of trace element addition on process stability during anaerobic co-digestion of OFMSW and slaughterhouse waste. **Waste Management**, v. 47, p. 11–20, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.007>>.

MOKONE, T. P.; VAN HILLE, R. P.; LEWIS, A. E. Metal sulphides from wastewater: Assessing the impact of supersaturation control strategies. **Water Research**, v. 46, n. 7, p. 2088–2100, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.027>>.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5th ed. ed. Tempe, Arizona: John Wiley & sons, INC, 2001. v. 1

MORI, K. et al. A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., Thermodesulfobium narugense, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. **Extremophiles**, v. 7, n. 4, p. 283–290, 2003.

MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v. 98, n. 1, p. 163–167, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.009>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1892>>.

NOGUEIRA, E. W. et al. Biological treatment removal of rare earth elements and yttrium (REY) and metals from actual acid mine drainage. **Water Science and Technology**, v. 80, n. 8, p. 1485–1493, 2019.

O'FLAHERTY, V.; COLLERAN, E. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: Process disturbance and remediation. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 101–107, 1999.

OCHOA-HERRERA, V. et al. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. **Science of the Total Environment**, v. 412–413, p. 380–385, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.072>>.

PARKIN, G. F. et al. Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. **Research Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 62, n. 6, p. 780–788, 1990.

PAULO, L. M. et al. Effect of nickel and cobalt on methanogenic enrichment cultures and role of biogenic sulfide in metal toxicity attenuation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–12, 2017.

PELLETIER, E. et al. “Candidatus Cloacamonas acidaminovorans”: Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2572–2579, 2008.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. . P. . THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS. **Biometrika**, v. 33, p. 305–325, 1946.

POSTGATE, J. R.; CAMPBELL, L. L. Classification of Desulfovibrio species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 30, n. 4, p. 732–738, 1966.

PRIYODIP, P.; BALAJI, S. A Preliminary Study on Probiotic Characteristics of Sporosarcina spp. for Poultry Applications. **Current Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 448–461,

2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01647-2>>.

QUAISER, A. et al. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: Evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 563–575, 2003.

RANQUET, C. et al. Cobalt stress in *Escherichia coli*: The effect on the iron-sulfur proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30442–30451, 2007.

RAO, S. et al. Selective extraction of zinc, gallium, and germanium from zinc refinery residue using two stage acid and alkaline leaching. **Hydrometallurgy**, v. 183, n. June 2018, p. 38–44, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.11.007>>.

RILEY, T. V. **Clostridium: Gas gangrene; tetanus; food poisoning; pseudomembranous colitis**. Eighteenth ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2012.

RIMSTIDT, J. D.; VAUGHAN, D. J. Acid Mine Drainage. p. 2–5, 2014.

RIVERO, C. et al. Characteristics of humic acids of some Venezuelan soils. **Geoderma**, v. 81, n. 3–4, p. 227–239, 1998.

RODRIGUEZ, R. P. **Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas**. 2010. Universidade de São Paulo, 2010.

RODRIGUEZ, R. P. et al. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 74, p. 48–53, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.012>>.

RODRIGUEZ, R. P. et al. Application of horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor for bioremediation of acid mine drainage. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 3, p. 399–410, 2016.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>>.

SAHINKAYA, E. et al. Biotreatment of As-containing simulated acid mine drainage using laboratory scale sulfate reducing upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Minerals Engineering**, v. 75, p. 133–139, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2014.08.012>>.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, n. 3, p. 98–109, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.032>>.

SANI, R. et al. Dissimilatory reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by *Cellulomonas* isolates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1–2, p. 192–199, 2002.

SANTOS, C. E. D. et al. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). **Journal of Environmental Management**, v. 166, p. 519–524, 2016.

SCHMIDT, T. et al. Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage - Optimization of metal dosing. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 80–85, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.124>>.

SILVA, A. J. et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-

reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93–98, 2006.

SILVA, B. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Effects of intermittent aeration periods on a structured-bed reactor continuously fed on the post-treatment of sewage anaerobic effluent. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 8, p. 1115–1120, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00449-018-1940-1>>.

SILVEIRA, Z. de C. **Análise Estatística e Otimização de Parâmetros de Projeto em Componentes de Sistemas Mecânicos**. 2003. Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SIMPSON, EDWARD, H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 1943, p. 688, 1949.

SMITH, K. S.; INGRAM-SMITH, C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 150–155, 2007.

SOARES, M. G. **Efeito da suplementação de cobalto na biodigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reator termofílico de leito estruturado**. 2015. Universidade Federal de Alfenas, 2015.

SPEECE, R. E.; PARKIN, G. F.; GALLAGHER, D. Nickel stimulation of anaerobic digestion. **Water Research**, v. 17, n. 6, p. 677–683, 1983.

STAMPS, B. W. et al. Genome sequence of Thermoanaerobaculum aquaticum MP-01T, the first cultivated member of Acidobacteria subdivision 23, isolated from a hot spring. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 2006–2007, 2014.

SU, J.; WEI, Y.; VAYSSIERES, L. Stability and Performance of Sulfide-, Nitride-, and Phosphide-Based Electrodes for Photocatalytic Solar Water Splitting. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 8, n. 20, p. 5228–5238, 2017.

TAKASHIMA, M.; SHIMADA, K.; SPEECE, R. E. Minimum requirements for trace metals (iron, nickel, cobalt, and zinc) in thermophilic and mesophilic methane fermentation from glucose. **Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation**, v. 83, n. 4, p. 339–346, 2011.

TAYLOR, J.; PAPE, S.; MURPHY, N. A Summary of Passive and Active Treatment Technologies for Acid and Metalliferous Drainage (AMD). **Proceedings of the 5th Australian Workshop on Acid Drainage**, n. 29, p. 1–49, 2005.

THANH, P. M. et al. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 2, p. 122–136, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.006>>.

TRUMM, D. Selection of active and passive treatment systems for AMD - Flow charts for New Zealand conditions. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**, v. 53, n. 2–3, p. 195–210, 2010.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de anastrepha (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33–39, 2005.

UTGIKAR, V. P. et al. Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria by Metal Sulfide Formation in Bioremediation of. **Wiley Periodicals, Inc.**, p. 40–48, 2002.

VAN DEN BRAND, T. et al. Sulfate reducing bacteria applied to domestic wastewater. **Water Practice and Technology**, v. 13, n. 3, p. 542–554, 2018.

VAN HOUTEN, B. H. G. W. et al. Occurrence of methanogenesis during start-up of

a full-scale synthesis gas-fed reactor treating sulfate and metal-rich wastewater. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 553–560, 2006.

VEEKEN, A. H. M. et al. Selective precipitation of heavy metals as controlled by a sulfide-selective electrode. **Separation Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 1–19, 2003.

VIEIRA, B. F. et al. The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic process in anaerobic reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 51, n. 10, p. 793–797, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10934529.2016.1181433>>.

WANG, L. P. et al. Selective precipitation of copper and zinc over iron from acid mine drainage by neutralization and sulfidization for recovery. **International Journal of the Society of Material Engineering for Resources**, v. 20, n. 2, p. 136–140, 2014.

WEI, J. et al. Feasibility analysis of anaerobic digestion of excess sludge enhanced by iron: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 89, n. April 2017, p. 16–26, 2018.

WEIJMA, J. et al. Performance of a thermophilic sulfate and sulfite reducing high rate anaerobic reactor fed with methanol. **Biodegradation**, v. 11, n. 6, p. 429–439, 2000.

WOSIACK, P. A. et al. Removal of COD and nitrogen from animal food plant wastewater in an intermittently-aerated structured-bed reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 145–150, 2015.

YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 362–367, 2008.

ZAIAT, M. .; CABRAL, A. K. A. .; FORESTI, E. Reator anaerobio horizontal de leito fixo para tratamento de aguas residuarias: concepcao e avaliacao preliminar de desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia**, v. 11, n. 2, p. 33–42, 1994.

ZANDVOORT, M. H. et al. Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, n. 3, p. 293–301, 2006.

ZHANG, H. et al. Molecular Dynamics Simulations, Thermodynamic Analysis, and Experimental Study of Phase Stability of Zinc Sulfide Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 47, p. 13051–13060, 2003.

ZHANG, M.; WANG, H. Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage. **Minerals Engineering**, v. 69, p. 81–90, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2014.07.010>>.

ZHANG, W.; ZHANG, L.; LI, A. Enhanced anaerobic digestion of food waste by trace metal elements supplementation and reduced metals dosage by green chelating agent [S, S]-EDDS via improving metals bioavailability. **Water Research**, v. 84, p. 266–277, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.010>>.

ZHANG, X. et al. Acid mine drainage affects the diversity and metal resistance gene profile of sediment bacterial community along a river. **Chemosphere**, v. 217, p. 790–799, 2019.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.015>>.

ZIEMKIEWICZ, P.; SKOUSEN, J.; SIMMONS, J. Cost benefit analysis of passive treatment systems. **Proceedings, 22nd West Virginia Surface Mine Drainage Task Force Symposium**, p. 18, 2001.