

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

**Remoção de metais e compostos sulfurosos de drenagem ácida de mina (DAM) em  
reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR)**

**VERSÃO CORRIGIDA**  
**SÃO CARLOS**  
**2020**



ELIS WATANABE NOGUEIRA

**Remoção de metais e compostos sulfurosos de drenagem ácida de mina em reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR)**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia H. R. Z. Damianovic

**VERSÃO CORRIGIDA**

**SÃO CARLOS  
2020**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
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).

N778r Nogueira, Elis Watanabe  
Remoção de metais e compostos sulfurosos de drenagem ácida de mina (DAM) em reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR) / Elis Watanabe Nogueira; orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. 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. Bactérias redutoras de sulfato. 2. Elementos terras raras. 3. Remoção de metais. 4. Sulfetogênese. 5. Vinhaça da cana-de-açúcar. 6. Glicerol. I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ELIS WATANABE NOGUEIRA**.

Título da tese: "Remoção de metais e compostos sulfurosos de drenagem ácida de mina (DAM) em reator anaeróbico de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR)".

Data da defesa: 26/06/2020.

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**  
**(Orientadora)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

aprovada

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

aprovada

Dr. **Lucas Tadeu Fuess**  
(Pós-Doutorando/FAPESP)

aprovada

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

aprovada

Dra. **Roseanne Barata Holanda**  
(Instituto Senai de Inovação em Tecnologias Mineraiis/ISI-TM)

aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



## **DEDICATÓRIA**

Aos pesquisadores do Brasil.





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Vicente♥ e Katia♥ que sempre me incentivaram a continuar estudando e sempre deram tudo de si e precisaram abrir mão de muita coisa para que nada faltasse a mim e à minha irmã. Há palavras de incentivo, o suor do trabalho de vocês e muitas lágrimas de saudades presentes em toda a minha caminhada acadêmica. Serei eternamente grata por tudo o que vocês fizeram por nós duas♥

À Lais♥, a melhor irmã que eu poderia ter, por todo amor e carinho de sempre. A pessoa que mais esteve ao meu lado e que sempre sentiu muito orgulho da irmã caçula♥

Aos meus amores Daniel♥ e Hummocky♥, por todo carinho, amor, apoio e incentivo♥

À família Nogueira♥, mas em especial à vovó Uena, tia Julieta, Mimi, tia Marilac, tio Arnaldo, tio Pedro, tia Rosaly, Rosângela e Selma, por tudo que fizeram por mim e minha irmã na ausência de nossos pais. Todas as nossas conquistas também são graças a vocês♥

À família Watanabe♥ e, em especial, à tia Desiomar, tia Preta e Catito, por todo o cuidado♥

À querida orientadora Márcia Damianovic♥, que sempre me espera com palavras de incentivo, por toda compreensão ao meu jeito de ser e por ter entendido meus medos quando eu mais precisei. Obrigada por acreditar em mim. E muito obrigada por todos os chocolates que ganhei durante nossas reuniões e por relevar todas as besteiras que falo de forma bem humorada.

Ao professor Gunther♥, que foi meu orientador no mestrado e co-orientador no doutorado, muito obrigada pela confiança, carinho e todo empenho e dedicação para que a nossa pesquisa desse certo♥

Aos professores Marcelo Zaiat e Eugenio Foresti, às excelentes disciplinas ministradas durante o doutorado, por todo profissionalismo e também às boas conversas na cozinha do LPB (aproveito inclusive para pedir desculpas por qualquer coisa). Todo o meu respeito e admiração por vocês♥

Ao professor D. Barrie Johnson por me aceitar no lab BART e me orientar de forma tão paciente durante o intercâmbio♥

A todos os professores e profissionais de cada centro educacional por onde passei: Escola Moderno, Emília, 石浜西小学校, SPX, Kumon, UEPA, CCAA, UNIFAL, USP e Bangor University, que contribuíram de forma efetiva e serviram de inspiração a chegar até aqui♥

Aos meus amigos: Stefanie, Ualerson, Gregório, Yamara, Thamires, Camilla, Lene, Larissa, Ane, Fernando e Felipe e a todas as pessoas que não foram mencionadas, mas que me ajudaram de alguma forma ou com uma palavra de incentivo. Obrigada♥

Aos colegas de São Carlos (LPB): Leandro, Lucas, Carla, amigo Elias, Lais, Rodrigo, Francielly, Jean, Cebola, Bruno Giz, Cris, Carol, Inaê, Natália, Henrique, Fabricio, Renata, Alana, Jaque, Adriana, Raquel, Guilherme Soares, Guilherme Oliveira, Inês e todo esse povo lindo desse lab maravilhoso. Mas especialmente quero agradecer à Mirabelle, Raphaella, Luana e Pamela. São as pessoas com quem mais convivi nesses anos de doutorado e merecem agradecimento especial, primeiro por me suportarem e segundo por tornarem o doutorado uma tarefa mais amigável. Agradecimento especial também ao Leandro, por me ajudar desde a montagem do reator às análises dos resultados e confecção de artigo♥

Aos amigos de lab da Unifal: Elize, Frecia, Bruna, Lívia, Rafael, Juliana, Matheus, Eduardo Jr., Eduardo chuva, Mauro e Carla. Foi um prazer trabalhar com vocês♥

Às amigadas que conquistei em Bangor: Roseanne, Ana Laura, Sarah, Sara, Rosa, Catarina, Enrica, Carlos, Safwaan, Mudita, Lynne, Ian, Charles e à melhor professora de inglês: Jan. Ao Evgenii e Marco pelas análises de sequenciamento (Mi Seq) de 25 amostras e pelo trabalho de bioinformática gratuito♥

Às técnicas do LPB: Janja, Carol, Elô e Isabel, muito obrigada por tudo♥

Ao técnico mais humano que tive a oportunidade de conhecer, Barry Gray e sua esposa Wendy♥

Aos funcionários do SHS: Pri, Sá, Fernando e Silvana♥

Aos funcionários da INB, em especial seu Dito, Dirnei, Fábio e Cinthia♥

Aos funcionários do restaurante universitário e às ótimas refeições diárias oferecidas no Campus 1 e 2 da USP-São Carlos.

A todas as pessoas que me ajudaram, incluindo as que irão ler essa tese e que não foram mencionadas aqui ♥

À CAPES e FAPESP, pelo fomento à pesquisa e pela ajuda financeira mensal.

## RESUMO

NOGUEIRA, E.W. **Remoção de metais e compostos sulfurosos de drenagem ácida de mina (DAM) em reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR)**. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

O presente trabalho objetivou avaliar o tratamento biológico da drenagem ácida de mina (DAM), pela avaliação da influência dos doadores de elétrons vinhaça de cana-de-açúcar, glicerol, etanol e sacarose, do pH e dos metais presentes em DAMs sintéticas e real. Foram utilizadas duas configurações de reatores anaeróbios, sendo o de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR) e o biorreator anaeróbio sulfetogênico acidofílico (aSRBR) de único estágio. O capítulo 1 apresenta a problemática e os principais tópicos discutidos na tese, enquanto o capítulo 2 apresenta a metodologia geral utilizada ao longo da pesquisa. No capítulo 3, a vinhaça da cana-de-açúcar foi utilizada como fonte de carbono e energia para o tratamento da DAM sintética em que a adição de metais Zn, Mn, Cu, Co, Ni e Fe ocorreu de forma gradual. No capítulo 4, verificou-se a transição da vinhaça para o glicerol e os efeitos para o tratamento após a adição de metais simulando a DAM. No capítulo 5, a DAM da mina de urânio desativada Osamu Utsumi foi tratada biologicamente e a remoção dos metais/metaloídeos Al, Mn, Si, Fe, incluindo urânio, ítrio e elementos terras raras (ETR) foi avaliada. O capítulo 6 avaliou a possibilidade de tratamento da DAM real sem a adição de alcalinizantes, em pH em torno de 4, utilizando o glicerol como fonte de carbono. O reator aSRBR foi utilizado no capítulo 7, mantido em pH 5 ao longo de toda a operação e as fontes de carbono glicerol, etanol e sacarose testadas. Verificou-se que a adição gradual de metais não prejudicou a eficiência de remoção de sulfato ou matéria orgânica e ocasionou a diminuição de sulfeto no meio, por precipitação de sulfeto metálico. A utilização simultânea do glicerol (substrato simples) e vinhaça (substrato complexo) proporcionou melhores eficiência de redução do sulfato (99 %) e DQO (60 %). A utilização tanto da vinhaça quanto do glicerol como fonte de carbono para o tratamento da DAM real, permitiu a recuperação de metais entre 25 e 93 %, em pH da ordem de 5, e 20 a 96 % em pH 4, sem a utilização de alcalinizantes. Urânio e ETR foram removidos eficientemente. A utilização de sacarose como doador de elétrons não foi promissora para a sulfetogênese, influenciando negativamente na população microbiana. O Domínio *Bacteria* representou mais de 99% da população presente na biomassa aderida ao material suporte e biomassa suspensa, e poucos gêneros de arqueias associadas à metanogênese que contribuíram minoritariamente para a remoção da matéria orgânica foram identificados. As fontes de carbono vinhaça, glicerol e etanol demonstraram ser adequadas para a sulfetogênese, mas não a sacarose. A configuração do reator DFSBR se mostrou adequada para remoção de metais, possibilitando a recuperação dos metais precipitados.

Palavras-chave: Bactérias redutoras de sulfato (BRS). Vinhaça. Glicerol. Remoção de metais. Elementos terras raras (ETR).

## ABSTRACT

NOGUEIRA, E.W. **Metal and sulfate removal from acid mine drainage (AMD) using down-flow structured bed reactor (DFSBR)**. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

The present study aimed to evaluate the biological treatment of acid mine drainage (AMD), by evaluating the influence of electron donor sugarcane, glycerol, ethanol and sucrose, pH and metals present in synthetic and actual AMD. Two configurations of anaerobic bioreactors were used, the down-flow fixed-structured bed reactor (DFSBR) and the acidophilic sulfate-reducing bioreactor (aSRBR). Chapter 1 presents the main topics discussed in this thesis, while chapter 2 presents the general methods used throughout the research. In chapter 3, sugarcane vinasse was used as a carbon and energy source for the treatment of synthetic AMD in which the addition of metals Zn, Mn, Cu, Co, Ni and Fe occurred gradually. In chapter 4, the transition of vinasse to glycerol and the effects of it for biological treatment after the addition of metals simulating AMD were also verified. In chapter 5, AMD from the deactivated uranium mine Osamu Utsumi was treated biologically and the recovery of metals/metalloids Al, Mn, Si, Fe, including uranium, yttrium and rare earth elements (REE) analyzed. Chapter 6 evaluated the possibility of treating actual AMD without the addition of alkali agents, at a pH around 4, using glycerol as a carbon source. The aSRBR reactor was used in chapter 7, maintained at pH 5 throughout the operation period and the carbon sources glycerol, ethanol and sucrose tested. It was found that the gradual addition of metals did not impair the efficiency of sulfate reduction or organic matter oxidation but caused a decrease in sulfide in the medium, due to precipitation of metallic sulfide. The simultaneous use of glycerol (simple substrate) and vinasse (complex substrate) provided better efficiency in sulfate reduction (99 %) and COD (60 %). The use of both vinasse and glycerol as carbon source for the treatment of actual AMD allowed the recovery of metals between 25 and 93 % at pH 5, and 20 to 96 % in pH around 4, without the use of alkali agents. Uranium and REE were removed efficiently. The use of sucrose as an electron donor was not promising for sulfidogenesis, and negatively influenced the microbial population. The Bacteria Domain represented more than 99% of the population present in the biomass adhered to the support material and suspended biomass, and few genera of archaea associated with methanogenesis that contributed minority to the removal of organic matter were identified. The sources of carbon vinasse, glycerol and ethanol showed to be suitable for sulfidogenesis, but not sucrose. The configuration of the DFSBR reactor proved to be adequate for metal removal, enabling the recovery of precipitated metals.

**Keywords:** Sulfate-reducing bacteria (SRB). Vinasse. Glycerol. Metal removal. Rare earth elements (REE).

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1. 1- Mineração de cobre na Mina do Sossego, em Canaã dos Carajás, no Pará..... 32
- Figura 1. 2- Cava da mina Osamu Utsumi- INB, localizada em Caldas-MG. .... 33
- Figura 1. 3- Bacias de contenção de DAM na mina Osamu Utsumi- INB, localizada em Caldas-MG..... 34
- Figura 1. 4- Localização das principais reservas minerais brasileiras de 2017 dos elementos: alumínio, cobre, cromo, estanho, ferro, manganês, nióbio, níquel, ouro, vanádio e zinco..... 35
- Figura 1. 5- Especiação do sulfeto e a fração relativa solúvel em função do pH..... 39
- Figura 1. 6- Configurações de reatores possíveis para a redução de sulfato e precipitação de metais..... 40
- Figura 1. 7- Árvore filogenética a partir do sequenciamento quase completo do gene rRNA 16S de espécies de bactérias e arqueas redutoras de sulfato..... 43
- Figura 1. 8- Produção nacional de glicerina a partir da produção de biodiesel em m<sup>3</sup>. .... 46
- Figura 1. 9- Plantas de biodiesel autorizadas para operação em cada estado brasileiro..... 47
- Figura 1. 10- Solubilidade de sulfetos metálicos em função do pH. .... 53
- Figura 1. 11- Solubilidade de hidróxidos metálicos em função do pH. .... 53

### Capítulo 2

- Figura 2. 1- Resumo esquemático das pesquisas desenvolvidas nos capítulos 3, 4, 5 e 6 do presente trabalho..... 59
- Figura 2. 2- Configuração do reator DSFBR R1 utilizado nos capítulos 3 e 5. .... 60
- Figura 2. 3- Configuração do reator DSFBR R2 utilizado nos capítulos 4 e 6. .... 60
- Figura 2. 4- Material suporte inoculado. .... 61

### Capítulo 3

- Figura 3. 1- Cargas afluentes (■) e efluentes (o) medidas como DQO e Boxplot da eficiência de remoção de DQO nas 6 fases operacionais..... 69
- Figura 3. 2- Cargas afluentes (■), efluentes (o) de sulfato e análise boxplot correspondente à eficiência de remoção de sulfato nas 6 fases operacionais. .... 70

Figura 3. 3- (a) variação da concentração de sulfeto total determinada no efluente do reator durante as fases operacionais; (b) Concentração de sulfeto total (■), sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (○) e ânion bissulfeto como HS <sup>-</sup> (Δ). .....	75
Figura 3. 4- (a) pH afluente (■) e efluente (○); (b) alcalinidade total (Δ) alcalinidade a bicarbonato (●), alcalinidade a HS <sup>-</sup> (■) e alcalinidade a ácidos voláteis (◇). .....	77
Figura 3. 5- Concentração média de acetato e DQO residual em g L <sup>-1</sup> nas fases operacionais II, III, IV, V e VI.....	79
Figura 3. 6- Remoção dos analitos analisados no efluente (■). .....	81
Figura 3. 7- Metais precipitados analisados a partir do descarte de lodo do reator. ....	83
Figura 3. 8- Proporção de sólidos fixos e voláteis correspondente ao lodo descartado regularmente do reator. ....	84
Figura 3. 9- Abundância relativa dos gêneros Methanobacterium, Candidatus nitrosocaldus, Methanomicrobium, Methanosaeta e Methanocorpusculum do Domínio Archaea identificados na biomassa do material suporte ao final da Fase VI. ....	88
Figura 3. 10- Principais Filos do Domínio Bacteria identificados na biomassa do material suporte (R1).....	89
Figura 3. 11- Abundância relativa dos principais reinos, filos, classes, ordem, famílias e gêneros identificados na biomassa do material suporte.....	90
Figura 3. 12- Abundância relativa dos principais gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa do material suporte (a partir de 1,0 % da AR). ....	90

#### Capítulo 4

Figura 4. 1- (a) Cargas afluentes (■), efluentes (○); (b) Boxplot da eficiência de remoção de DQO nas fases operacionais.....	96
Figura 4. 2- Cargas afluentes (■), efluentes (○) e análise boxplot da eficiência de redução de sulfato nas 6 fases operacionais. ....	97
Figura 4. 3- Concentração de sulfeto na forma de H <sub>2</sub> S (■) e na forma de HS <sup>-</sup> (●).....	100
Figura 4. 4- (a) pH afluente (■) e pH efluente (○). .....	101
Figura 4. 5- Alcalinidade total (■), alcalinidade a bicarbonato (●), alcalinidade a sulfeto (◇) e alcalinidade a ácidos voláteis (▼). ....	102
Figura 4. 6- Concentração média de acetato e DQO residual em g L <sup>-1</sup> nas fases operacionais II, III, IV, V e VI.....	103
Figura 4. 7- Proporção dos sólidos fixos e voláteis correspondente à análise gravimétrica do lodo.....	105

Figura 4. 8- Principais Filos identificados na biomassa do DFSBR durante a Fase VI. ....	107
Figura 4. 9- Principais famílias identificadas na biomassa do DFSBR durante a Fase VI. ...	108
Figura 4. 10- Principais Gêneros do Domínio Bacteria identificados na Fase VI. Legenda das taxonomias: A- <i>Zymophilus</i> , B- <i>Pectinatus</i> , C- <i>Clostridium</i> , D- <i>Bacteroides</i> , E- <i>Desulfovibrio</i> , F- <i>Geotoga</i> , G- <i>Acidaminococcus</i> e H- <i>Paludibacter</i> .....	109

## Capítulo 5

Figura 5. 1- Imagens do material suporte inoculado e do reator de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR). ....	114
Figura 5. 2- Imagens de satélite destacando as principais lagoas de DAM da INB (Google). Onde: R.A- Ribeirão das Antas; BIA- Bacia Ivan Antunes (BF8); T.P- Planta de tratamento físico-químico da DAM; BF4- Bacia Nestor Figueiredo (BNF) 1-lagoa velha e 2- lagoa nova com manta impermeabilizante.....	115
Figura 5. 3- Concentração de sulfato afluente (■) e efluentes (●). ....	118
Figura 5. 4- Análise boxplot da remoção de DQO (a) e remoção de sulfato (b) nas diferentes fases. ....	119
Figura 5. 5- Concentração total de sulfeto (■), ânion bissulfeto como HS <sup>-</sup> (●) e o sulfeto de hidrogênio (▼). ....	120
Figura 5. 6- pH afluente (■) e pH efluente (●) (a); Alcalinidade total-A <sub>T</sub> (■) alcalinidade a bicarbonato-A <sub>BIC</sub> (●) alcalinidade a ácidos voláteis-A <sub>VFA</sub> (◆) e alcalinidade a sulfeto-A <sub>HS<sup>-</sup></sub> (▲) como concentração de CaCO <sub>3</sub> e (—) A <sub>i</sub> / A <sub>p</sub> (b). ....	121
Figura 5. 7- Análise boxplot de metais de transição e remoção de metaloides Si nas Fases II, III e IV. ....	123
Figura 5. 8- Remoção de ETR e U da fração dissolvida. ....	124
Figura 5. 9- Principais Filos do Domínio Bacteria e Archaea identificados na biomassa do material suporte do reator DFSBR. ....	128
Figura 5. 10- Principais Gêneros do Domínio Bacteria identificados na Fase IV. Legenda das taxonomias: A- <i>Paludibacter</i> , B- <i>Clostridium</i> , C- <i>Treponema</i> , D- <i>Bacteroides</i> , E- <i>Acetivibrio</i> , F- <i>Parabacteroides</i> e G- <i>Desulfovibrio</i> . ....	130

## Capítulo 6

Figura 6. 1- Equipamento ICP-OES, Laboratório Ambiental- INB. ....	134
--	-----

Figura 6. 2- Local de coleta da DAM para o preparo da alimentação do reator anaeróbio. A imagem apresenta as duas lagoas BF4, a lagoa nova revestida com manta impermeabilizante e a lagoa velha onde não há impermeabilização. ....	136
Figura 6. 3- Concentrações do glicerol afluente (■) e efluente (●) medidas como DQO e análise boxplot da eficiência de remoção de DQO nas fases operacionais.....	138
Figura 6. 4- Concentrações de sulfato afluente (■) e efluente (●) e análise boxplot da eficiência de redução de sulfato nas 4 fases operacionais. ....	139
Figura 6. 5- Concentração total de sulfeto (●), ânion bissulfeto como HS <sup>-</sup> (■) e o sulfeto de hidrogênio-H <sub>2</sub> S (◇) e análise boxplot correspondente à produção de H <sub>2</sub> S.....	141
Figura 6. 6- pH afluente (■) e efluente (○) do meio. ....	142
Figura 6. 7- Concentração da alcalinidade total-A <sub>T</sub> (■), alcalinidade a bicarbonato-A <sub>BIC</sub> (●) alcalinidade a ácidos voláteis-A <sub>AV</sub> (◇) e alcalinidade a sulfeto-A <sub>HS<sup>-</sup></sub> (Δ) medida como CaCO <sub>3</sub> em mg L <sup>-1</sup> e relação A <sub>i</sub> / A <sub>p</sub> (--).....	143
Figura 6. 8- Remoção dos metais de transição e remoção do metaloide Si. ....	145
Figura 6. 9- Concentrações afluentes (■) e efluentes (○) do Ca e P. ....	146
Figura 6. 10- Concentrações afluentes (■) e efluente (○) do La, Ce, Nd, Pr, Y e U. ....	148
Figura 6. 11- Principais Filos do Domínio Bacteria identificados na biomassa do material suporte do reator DFSBR ao final da Fase IV.....	151
Figura 6. 12- Principais gêneros do Domínio Archaea identificados na biomassa aderida ao material suporte ao final da Fase IV .....	152
Figura 6. 13- Principais gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa aderida ao material suporte do reator na Fase VI. Legenda das taxonomias: A- Treponema, B- Paludibacter, C- Thermodesulfobium, D- Desulfovibrio, E- Pectinatus, F- Desulfobacterium, G- Caldisericum, H- Zymophilus, I- Clostridium, J- Desulfosporosinus e H- Acidithiobacillus. ....	153

## Capítulo 7

Figura 7. 1- Configuração do biorreator sulfetogênico	159
Figura 7. 2- Representação esquemática da metodologia de análise do etanol	164
Figura 7. 3- Filtro após filtração de 20 mL da amostra do interior do biorreator para extração de DNA.	166
Figura 7. 4- Concentração de sulfato, glicerol/etanol e acetato correspondentes às Fases I e II (a, b e c). (a)- Concentração de sulfato afluente (■), efluente (○) e velocidade de redução do sulfato (--); (b)- Concentração de glicerol afluente (■), efluente (○),	



- etanol afluyente (■), efluente (○) e TDH (--); (c)- Concentração efluente de acetato (●). 169
- Figura 7. 5- Concentração de sulfato, glicerol, glicose-frutose, sacarose e etanol, e acetato correspondentes às Fases III (a, b e c) e IV. (a)- Concentração de sulfato afluyente (■), efluente (○) e velocidade de redução do sulfato (--); (b)- Concentração afluyente de glicerol (■), glicose + frutose (★), sacarose (●) e etanol (■); (c)- Concentração efluente de acetato (●). 171
- Figura 7. 6- Velocidade de produção de H<sub>2</sub>S em μMoles L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> 173
- Figura 7. 7- AR dos filios identificados na biomassa suspensa do reator. 175
- Figura 7. 8- Principais Famílias e Gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa suspensa do reator na Fase I. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 3 de operação; S2- dia 10; S3- dia 17; S4- dia 24; S5- dia 31; S6- dia 38; S7- dia 45; S8- dia 59, e; S9- dia 66. Com relação à taxonomia: A- Desulfosporosinus; B- Paludibacter; C- Família Ruminococcaceae; D- Cellulomonas; E- Ethanoligenens; F- Família Gracilibacteraceae; G- Anaerovorax; H- Acidithiobacillus. 177
- Figura 7. 9- Principais Famílias e Gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa suspensa do reator na Fase II. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 73 de operação; S3- dia 86; S4- dia 94; S5- dia 101, e; S6- dia 108. Com relação à taxonomia: A- Desulfosporosinus; B- Paludibacter; C- Família Gracilibacteraceae; D- Família Ruminococcaceae; E- Ethanoligenens; F- Anaerovorax; H- Cellulomonas; J- Acidithiobacillus; K- Acidocella. 182
- Figura 7. 10- Principais Famílias e Gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa suspensa do reator na Fase III. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 106 de operação; S2- dia 115; S3- dia 122; S4- dia 129; S5- dia 136; S6- dia 143, e; S7- dia 150. Com relação à taxonomia: A- Cellulomonas; B- Desulfosporosinus; C- Paludibacter; D- Ruminococcaceae; E- Ethanoligenens; F- Gracilibacteraceae; G- Acidithiobacillus; H- Acidocella; I- Oxobacter; J- Clostridium; K- Anaerovorax. 184
- Figura 7. 11- Principais Famílias e Gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa suspensa do reator na Fase IV. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 157 de operação; S2- dia 163; S3- dia 170, e; S4- dia 178. Com relação à taxonomia: A- Cellulomonas; B- Desulfosporosinus; C- Paludibacter; D- Ruminococcaceae; E-

Ethanoligenens; F- Gracilibacteraceae; G- Acidithiobacillus; H- Acidocella; I- Oxobacter; J- Clostridium. 186

Figura 7. 12- Abundância relativa dos gêneros e famílias identificados na biomassa suspensa do reator considerando o início e final da Fase I, II, III e IV. 188

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. 1- Composição de DAM e principais metais e metaloides reportados em $\text{mg L}^{-1}$ ...	30
Tabela 1. 2- Composição dos ETR presentes na DAM de minerações diversas em $\mu\text{g L}^{-1}$ ....	31
Tabela 1. 3- Quantidade e volume de barragens de minerações brasileiras cadastradas no SIGBM.....	31
Tabela 1.4- Produção mineral referente ao ano de 2017 .....	35
Tabela 1.5- Variação de energia livre para as principais rotas de degradação anaeróbia da matéria orgânica.....	44
Tabela 1. 6- Produção brasileira de etanol. ....	49
Tabela 1. 7- Toxicidade dos metais para BRS.....	50
Tabela 1. 8- Concentração máxima tolerável por microrganismos .....	51
Tabela 1. 9- Produto de solubilidade para sulfetos e hidróxidos.....	52
Tabela 1.10- Produto de solubilidade de compostos terras raras .....	57
Tabela 1. 11- Concentrações de ETRs precipitados no experimento em batelada, da amostra de lodo inicial utilizada como inóculo do biorreator contínuo e lodo final após o experimento do biorreator contínuo.....	58

### Capítulo 2

Tabela 2.1- Metodologias utilizadas nas determinações analíticas. ....	61
Tabela 2.2- Índices de Diversidade e Riqueza .....	64

### Capítulo 3

Tabela 3.1- Composição da vinhaça real concentrada utilizada como doador de elétrons .....	66
Tabela 3.3- Concentração dos analitos adicionados na DAM sintética em $\text{mg L}^{-1}$ do elemento. ....	67
Tabela 3.2- Parâmetros operacionais de R1, utilizando vinhaça como doador de elétrons .....	68
Tabela 3.4- Cargas removidas em cada fase.....	70
Tabela 3. 5- Remoção da matéria orgânica via sulfetogênese.....	71
Tabela 3. 6- Principais variáveis operacionais dos estudos relatados na literatura. ....	74
Tabela 3.7- Concentração dos metais encontrados no lodo acumulado no biorreator. ....	83
Tabela 3.8- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios Bacteria e Archaea da biomassa aderida ao material suporte ao final da Fase VI do reator DFSBR...	85

## Capítulo 4

Tabela 4.1- Composição da DAM sintética. ....	95
Tabela 4.2- Parâmetros operacionais do reator DFSBR .....	95
Tabela 4.3- Cargas orgânicas e de sulfato removidas em cada fase. ....	98
Tabela 4.4- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios Bacteria e Archaea da biomassa microbiana ao final da Fase VI do reator DFSBR.....	106
Tabela 4.5- Nº de reads, OTUs, filos, classes, famílias e gêneros identificados na biomassa do DFSBR na Fase VI.....	107
Tabela 4.6- Principais gêneros identificados na biomassa do DFSBR durante a Fase VI.....	108

## Capítulo 5

Tabela 5.1- Caracterização da água da mina real usada para tratamento biológico. ....	115
Tabela 5.2- Caracterização da vinhaça da cana-de-açúcar usada como a fonte de C e nutrientes. ....	116
Tabela 5.3- Valores de concentração média afluente de pH, sulfato, DQO e metais no DFSBR. ....	117
Tabela 5.4- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios Bacteria e Archaea da biomassa microbiana na Fase IV do reator DFSBR.....	126
Tabela 5.5- Nº de reads, OTUs, filos, classes, famílias e gêneros identificados na biomassa do DFSBR na Fase IV.....	127
Tabela 5.6- Gêneros do Domínio Archaea identificados na biomassa aderida ao material suporte na Fase IV do reator DFSBR. ....	129
Tabela 5.7- Principais gêneros identificados na biomassa aderido ao material suporte do reator DFSBR durante a Fase IV.....	129

## Capítulo 6

Tabela 6.1- Valores de concentração média afluente de pH, sulfato e DQO .....	135
Tabela 6.2- Concentração média dos analitos presentes no meio para alimentação em mg L <sup>-1</sup> . ....	136
Tabela 6.3- Participação das BRS na oxidação da matéria orgânica .....	140
Tabela 6.4- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios Bacteria e Archaea da biomassa microbiana na Fase IV do reator DFSBR.....	149
Tabela 6. 5- Nº de reads, OTUs, filos, classes, famílias e gêneros identificados na biomassa do DFSBR na Fase IV.....	151

Tabela 6.6- Principais gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa aderido ao material suporte do reator DFSBR ao final da Fase IV (Figura 6. 13).....	153
--	-----

## **Capítulo 7**

Tabela 7.1- Composição da solução basal 50x concentrada .....	160
Tabela 7.2- Composição da solução traço de metais 1000x concentrada em pH 2.....	160
Tabela 7. 3- Parâmetros operacionais do biorreator em mM .....	161
Tabela 7.4- Concentrações dos padrões de calibração do sulfato e acetato .....	162
Tabela 7.5- Concentrações dos padrões de calibração do sulfato e acetato .....	162
Tabela 7.6- Relação das amostras analisadas pelo sequenciamento .....	165
Tabela 7.7- Concentração de sulfato reduzido e acetato produzido (mM) em cada fase. ....	167
Tabela 7. 8- Relação das amostras S1 a S9 equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 8 e os número de reads classificados em Família e Gêneros. ....	176
Tabela 7.9- Relação das amostras S1 a S6 da Fase II equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 9 e os número de reads classificados em Família e Gêneros. ....	181
Tabela 7. 10- Relação das amostras S1 a S7 da Fase III equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 10 e os número de reads classificados em Família e Gêneros.....	183
Tabela 7. 11- Relação das amostras S1 a S4 da Fase IV equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 11 e os número de reads classificados em Família e Gêneros. ....	185
Tabela 7.12- Índices de diversidade, dominância e riqueza da biomassa microbiana. ....	187
Tabela 7.13- Relação do número de reads classificados nas amostras iniciais e finais de cada fase, em parênteses os dias de operação e taxonomia a nível de Família e Gêneros. ....	187
Tabela 8.1- Remoção de DQO média em cada Fase .....	190
Tabela 8.2- Remoção de Sulfato média em cada Fase .....	190
Tabela 8.3- Comunidade microbiana dos trabalhos apresentados com os principais gêneros identificados.....	191

## SUMÁRIO

Capítulo 1.....	27
1. Introdução .....	27
1.1 Objetivos .....	27
1.2 Drenagem ácida de mina.....	28
1.3 Tratamento anaeróbio da drenagem ácida de mina.....	37
1.4 Microrganismos redutores de sulfato .....	42
1.5 O uso do glicerol como doador de elétrons no tratamento biológico .....	45
1.6 A vinhaça da cana-de-açúcar no Brasil e seu uso como doador de elétrons na digestão anaeróbia .....	48
1.7 Toxicidade dos metais para a microbiota.....	50
1.8 Elementos terras raras .....	54
1.8.1 Reatividade dos complexos terras raras .....	55
Capítulo 2.....	59
2. Material e métodos.....	59
2.1 Configuração dos reatores.....	59
2.2 Análises físico-químicas .....	61
2.3 Identificação e caracterização da comunidade microbiana.....	62
2.3.1 <i>Extração e purificação de DNA</i> .....	62
2.3.2 <i>Amplificação do RNAr 16S pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase</i> .....	63
2.3.3 <i>Sequenciamento para análise metagenômica</i> .....	63
2.3.4 <i>Índices de diversidade e riqueza das bibliotecas gênicas</i> .....	63
Capítulo 3.....	65
Tratamento biológico anaeróbio da drenagem ácida de mina utilizando a vinhaça da cana-de-açúcar como doador de elétrons e nutrientes .....	65
3.1 Introdução .....	65

3.2 Material e métodos .....	66
3.2.1 Água residuária .....	67
3.2.2 Fases operacionais .....	67
3.2.3 Análise da diversidade microbiana .....	68
3.3 Resultados e discussão .....	68
3.3.1 Remoção de DQO, sulfato e produção de sulfeto .....	68
3.3.2 Alcalinidade, pH e ácidos voláteis totais .....	76
3.3.3 Remoção de metais. ....	80
3.3.4 Análise da diversidade microbiana .....	84
3.3.4.1 Análise taxonômica da comunidade microbiana .....	87
3.4 Conclusões.....	93
Capítulo 4 .....	94
A adição de metais e a mudança da vinhaça da para glicerol como fonte de carbono para o tratamento da drenagem ácida de mina sintética e os efeitos para a sulfetogênese.....	94
4.1 Introdução.....	94
4.2 Material e métodos .....	94
4.2.1 Análise da diversidade microbiana .....	96
4.3 Resultados e discussão .....	96
4.3.1 Remoção de DQO, sulfato e produção de sulfeto .....	96
4.3.2 Alcalinidade, pH e ácidos voláteis .....	101
4.3.4 Análise da diversidade microbiana .....	105
4.3.4.1 Análise taxonômica dos Domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> .....	106
4.4 Conclusão .....	110
Capítulo 5 .....	112
Tratamento biológico da drenagem ácida de mina real e remoção de elementos terras raras e outros metais.....	112
5.1 Introdução.....	112

5.2	Material e métodos.....	114
5.2.1	<i>Configuração do biorreator.....</i>	114
5.2.2	<i>Caracterização da DAM real.....</i>	114
5.2.3	<i>Doador de elétrons.....</i>	116
5.2.4	<i>Fases operacionais .....</i>	116
5.2.5	<i>Métodos analíticos .....</i>	117
5.2.6	<i>Análise da diversidade microbiana.....</i>	117
5.3	Resultados e discussão.....	118
5.3.1	<i>Remoção do sulfato e DQO .....</i>	118
5.3.2	<i>Sulfeto.....</i>	119
5.3.3	<i>Alcalinidade e pH.....</i>	121
5.3.4	<i>Remoção dos metais terras raras e outros metaloides .....</i>	122
5.3.5	<i>Análise da diversidade microbiana.....</i>	125
5.3.5.1	<i>Análise taxonômica dos Domínios Archaea e Bacteria .....</i>	127
5.4	Conclusão.....	131
Capítulo 6	.....	133
Neutralização biológica e remoção de metais e elementos terras raras de efluente ácido de mina de urânio desativada..... 133		
6.1	Introdução .....	134
6.2	Material e métodos.....	134
6.2.1	<i>Fases operacionais .....</i>	135
6.2.2	<i>Água residuária.....</i>	135
6.2.3	<i>Análise da diversidade microbiana.....</i>	137
6.3	Resultados e discussão.....	137
6.3.1	<i>Remoção de DQO e sulfato.....</i>	137
6.3.2	<i>Sulfeto.....</i>	141
6.3.3	<i>Alcalinidade e pH.....</i>	142



6.3.4 Remoção dos metais, terras raras e outros metaloides.....	144
6.3.5 Análise da diversidade microbiana .....	149
6.3.5.1 Análise taxonômica dos Domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> .....	150
6.4 Conclusão .....	154
Capítulo 7 .....	156
A influência do doador de elétrons para a redução de sulfato e na diversidade microbiana de reator sulfetogênico de fluxo contínuo. ....	156
7.1 Introdução.....	156
7.2 Material e métodos .....	158
7.2.1 Configurações do biorreator sulfetogênico ( <i>aSRBR</i> ).....	159
7.2.2 Caracterização do meio de cultura de alimentação do biorreator, meio basal e elementos traços .....	160
7.2.3 Fases operacionais .....	161
7.2.4 Determinação do sulfato e acetato .....	161
7.2.5 Determinação dos compostos orgânicos .....	162
7.2.6 Determinação do etanol .....	162
7.2.7 Determinação do cobre total.....	164
7.2.8 Identificação molecular.....	165
7.3 Resultados e discussão .....	167
7.3.1 Diversidade taxonômica da comunidade microbiana .....	173
7.3.1.1 Fase I .....	176
7.3.1.2 Fase II.....	180
7.3.1.3 Fase III.....	182
7.3.1.4 Fase IV.....	185
7.3.2 Análise da diversidade microbiana e síntese geral .....	186
7.4 Conclusões.....	189
8. Considerações finais .....	190

9. Recomendações para trabalhos futuros .....	192
REFERÊNCIAS .....	193

# Capítulo 1

## 1. Introdução

Este tópico abordará os principais objetivos do presente trabalho, bem como temas relevantes para melhor entendimento do que está sendo proposto com base em informações consultadas na literatura nacional e internacional.

### 1.1 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o tratamento biológico da drenagem ácida de mina (DAM) sintética e real, pela avaliação da influência do pH, dos metais presentes em solução e do doador de elétrons utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar, o glicerol, o etanol e a sacarose.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a eficiência do tratamento da DAM sintética utilizando o subproduto do etanol, a vinhaça da cana-de-açúcar, e verificar o efeito da adição dos metais Co, Cu, Mn, Fe, Ni e Zn para o tratamento e para a comunidade microbiana (Capítulo 3).

- Comparar o uso da vinhaça e glicerol como doadores de elétrons para o tratamento de água residuária rica em sulfato e os efeitos para o tratamento após a adição de metais simulando a DAM. (Capítulo 4).

- Avaliar o desempenho do reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR), no tratamento biológico de DAM real com elevada concentração dos elementos Al, Fe, Mn, Si, U e ETR, visando também o potencial da recuperação de tais elementos (Capítulo 5).

- Avaliar a possibilidade de tratamento da DAM real sem a adição de alcalinizantes, em pH 4, utilizando o glicerol como doador de elétrons (Capítulo 6).

- Verificar os efeitos da transição do glicerol para o etanol e sacarose para o tratamento e acompanhar as mudanças na comunidade microbiana ao longo da operação operando o biorreator aSRBR em pH controlado em 5, moderadamente ácido (Capítulo 7).

- Identificar a comunidade microbiana envolvida no tratamento da DAM.

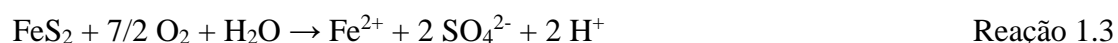
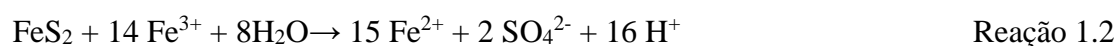
## 1.2 Drenagem ácida de mina

O impacto causado pelas áreas de mineração tem afetado o solo, mananciais, populações e ecossistemas vizinhos. Dentre os passivos gerados pelas minas de metais, a Drenagem Ácida de Mina (DAM), também encontrada na literatura como drenagem ácida de rochas, entre outros termos, destaca-se devido às suas características físico-químicas: baixo pH (2 – 4), alta concentração de íons metálicos dissolvidos com grande potencial tóxico, elevadas concentrações de sulfato, ausência de nutrientes e matéria orgânica, que desfavorecem a estabilidade ecológica natural (Das et al., 2012).

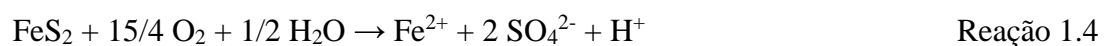
A DAM pode ter sua formação no interior da cava da mina ou em áreas de deposição de rejeito. A formação ocorre quando há exposição da pirita ( $\text{FeS}_2$ ) e outros minerais sulfetados à água e ao ar, que pode ocorrer naturalmente, resultando na formação de ácido sulfúrico e consequente solubilização de metais presentes no meio (Streten-Joyce et al., 2013a). Os diferentes processos da geração da DAM são descritos por diversos autores (Akcil; Koldas, 2006; Johnson and Hallberg, 2005; Rohwerder et al., 2003; Streten-Joyce et al., 2013).

Akcil e Koldas (2006) explicam que cada área minerada rica em minerais sulfetados tem potencial distinto na geração da DAM. Os principais fatores que influenciam na velocidade de geração de DAM são: pH, temperatura, processo de intemperismo das rochas, atividade química do  $\text{Fe}^{3+}$ , área superficial de sulfetos metálicos e atividade microbiana (Akcil; Koldas, 2006).

Utilizando a pirita ( $\text{FeS}_2$ ) como exemplo, a Reação 1.1 expressa a reação geral que ocorre no processo de oxidação da pirita (Kefeni et al., 2017) formando  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Quando o ferro é o agente oxidante (Reação 1.2), ocorre a completa oxidação da pirita de forma mais espontânea quando comparada à Reação 1.3, em que o oxigênio é o agente oxidante.



A completa oxidação da pirita também ocorre quando há pouco contato da água com o sulfeto metálico, expressa na Reação 1.4 (Chen et al., 2015).



Dentre os metais dissolvidos, geralmente, o Fe (II) é o que se encontra em maior abundância na drenagem ácida. Um levantamento realizado por Kefeni et al. (2017) apresenta a variação da concentração de Fe (II) entre 400 a 2135 mg L<sup>-1</sup>, Al (~194 mg L<sup>-1</sup>), Zn (~460 mg L<sup>-1</sup>) e sulfato (2853 ~ 3622 mg L<sup>-1</sup>) nos diversos ambientes contendo a DAM. A presença de metais dissolvidos associados à DAM depende do tipo de ganga mineral presente na rocha oxidada (Akci; Koldas, 2006). Outros estudos reportados na literatura que descrevem a composição de DAM estão apresentados na Tabela 1.1.

Em adição aos principais metais e metaloides presentes na DAM apresentados na Tabela 1.1, na Tabela 1.2 estão apresentados estudos em que elementos terras raras fazem parte da composição da DAM, entre elas estão as minas de carvão mineral (Xingyu et al., 2013) e mina de urânio desativada (Miekeley et al., 1992).

Tabela 1. 1- Composição de DAM e principais metais e metaloides reportados em mg L<sup>-1</sup>.

Mineração	pH	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	M.O*	Cu	Fe	Mn	Al	Si
Pennsylvania Coal Mine <sup>1</sup>	2,7 - 7,3	34 - 2000	–	0,4 – 190	0,046 -512	0,02 -74	0,007 - 108	2,7 - 31,3
Zijinshan Copper Mine <sup>2</sup>	2,34 - 2,56	2000 - 2500	–	100 – 120	170 - 200	–	–	–
Osamu Utsumi (GW47) <sup>3</sup>	3,57	445	–	–	0,12	–	–	13 – 15
Waterman (CMD-L) <sup>4</sup>	4,1	491	–	–	9,7	1,0	5,7	7,9
Strattanville (CMD-P) <sup>4</sup>	4,4	2136	–	–	385	90,5	9,1	6,7
Mina Esperanza <sup>5</sup>	2,35 – 2,96	3324 - 4515	–	12 – 24	755 - 1100	4 – 6	128 – 167	44 – 60
Dabaoshan Mine <sup>6</sup>	2,64	–	–	17,73	361,68	66,16	–	–
Dunkard creek <sup>7</sup>	4,2	1846	41	–	112	6	2	–
Nanshan Pyrite Mine <sup>8</sup>	2,93 – 3,20	1080 - 2190	1,72 - 4,23	–	26 - 143	264 - 536	623 - 1107	–
Teishu (TS) <sup>9</sup>	1,8	52.381	–	95,9	81524	815,9	2620	73,64
Weikang (WK) <sup>9</sup>	2,5	<1300	–	2,61	1084	8,73	9,93	4,92
Richmond Mine <sup>10</sup>	-3,6 - 1,5	14.000 - 760.000	–	209 - 4760	2670 - 141000	–	–	–

\*M.O= matéria orgânica medida como DQO ou carbono orgânico dissolvido.

Fonte: <sup>1</sup>Cravotta, 2008; <sup>2</sup>Xingyu et al. 2013; <sup>3</sup>Miekeley et al., 1992; <sup>4</sup>Stewart et al., 2017; <sup>5</sup>Caraballo et al., 2011; <sup>6</sup>Yan et al., 2015; <sup>7</sup>Deng et al., 2013; <sup>8</sup>Hao et al., 2017; <sup>9</sup>Zhou et al., 2010; <sup>10</sup>Nordstrom et al., 2000

Tabela 1. 2– Composição dos ETR presentes na DAM de minerações diversas em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

	pH	Y	Ce	Nd	La	Sm
Pennsylvania Coal Mine <sup>1</sup>	2,7 - 7,3	0,11 – 530	0,01 - 370	0,006 - 260	0,005 – 140	<0,005 - 79
Osamu Utsumi *(GW47) <sup>2</sup>	3,57	–	6270	6490	13500	764
Waterman, *(CMD-L) <sup>3</sup>	4,1	9,47	4,34	3,83	1,13	1,30
Strattanville, *(CMD-P) <sup>3</sup>	4,4	575	255	86,2	32,9	28,9
Osamu Utsumi *(BNF)	3,4	4100	24900	9550	40100	–

\*As siglas apresentadas junto aos nomes das minas são relacionadas apenas à nomenclatura de cava ou bacias de contenção.

Fonte: <sup>1</sup> Xingyu et al. 2013; <sup>2</sup> Miekeley et al., 1992; <sup>3</sup> Stewart et al., 2017.

Além da mineração de urânio e carvão, as atividades de exploração do cobre, zinco, níquel e ouro são as mais relacionadas à geração da DAM. O arquivo disponibilizado do Sistema Integrado de Gestão de Segurança de Barragens de Mineração (SIGBM) em Janeiro de 2019 traz o levantamento de 714 barragens cadastradas na Agência Nacional de Mineração-ANM (valores se referem aos mais atualizados no momento da publicação do trabalho)(ANM, 2019). A Tabela 1.3 destaca que das 714 barragens cadastradas, 333 estão ligadas a rejeitos com potencial de geração de águas ácidas. O volume da somatória dessas barragens supera os 2 bilhões de  $\text{m}^3$ .

Tabela 1. 3- Quantidade e volume de barragens de minerações brasileiras cadastradas no SIGBM

Minério	Barragens	Volume total (milhões $\text{m}^3$ )
Au	56	672,5
Cu	26	332,2
Fe	210	1.077,9
Mn	13	19,5
Ni	10	29,9
U*	1	1,9
Zn	3	13,2
Carvão	14	4,3

\* INB (2019)

Fonte: INB e ANM, 2019

A Mina do Sossego em Canaã dos Carajás-PA possui a segunda maior reserva de cobre do país e estima-se que mais de 120 Mt de rejeitos já foram gerados desde o início das atividades (Nankran et al., 2007). O volume da barragem do Sossego da mineradora Vale, uma das maiores companhias mineradoras do País é de 108 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos e o volume total de água no reservatório de 5 milhões de m<sup>3</sup> (Figura 1. 1).



Figura 1. 1- Mineração de cobre na Mina do Sossego, em Canaã dos Carajás, no Pará  
Fonte: Google

Outro grande reservatório de DAM é o presente na cidade de Caldas-MG. Originada a partir da mineração do urânio, com início das atividades em 1982, teve suas atividades encerradas em 1995. O volume da barragem de rejeitos da mina Osamu Utsumi, INB é de 1,97 milhões de m<sup>3</sup>, contendo rejeitos sólidos e efluentes líquidos, incluindo elevadas concentrações de urânio e tório (Figura 1. 2). O tratamento da DAM dessa barragem de rejeitos consiste no tratamento ativo (físico-químico), ou seja, a adição de produtos químicos alcalinizantes com o objetivo da elevação do pH e adequação à legislação ambiental de enquadramento ao



lançamento de efluentes. Somente no ano de 2018, a empresa gastou R\$ 1,78 milhões na compra de cal hidratado/hidróxido de cálcio com baixo teor de magnésio, informação disponível no site do Portal da Transparência (2019). O material precipitado durante o tratamento físico-químico é retirado da unidade de tratamento e acondicionado no interior da cava da mina Osamu Utsumi (Figura 1. 2).



Figura 1. 2- Cava da mina Osamu Utsumi- INB, localizada em Caldas-MG.  
Fonte: A autora.

Outras lagoas ácidas com características diversas estão presentes na mina Osamu Utsumi. Na Figura 1.3 estão apresentadas imagens de 3 bacias de contenção, incluindo a Bacia Ivan Antunes (A) e o canal que direciona a DAM para a Bacia Nestor Figueiredo (D), onde a geração de DAM é constante. A presença de algas nas bacias (Figura 1. 3- C e D), manchas branco amareladas indicando enxofre elementar nas rochas e a corrosão de tubulações são características presentes na INB. Essas bacias recebem a DAM gerada na mina e são enviadas para a Unidade de Tratamento de Minério (UTM).

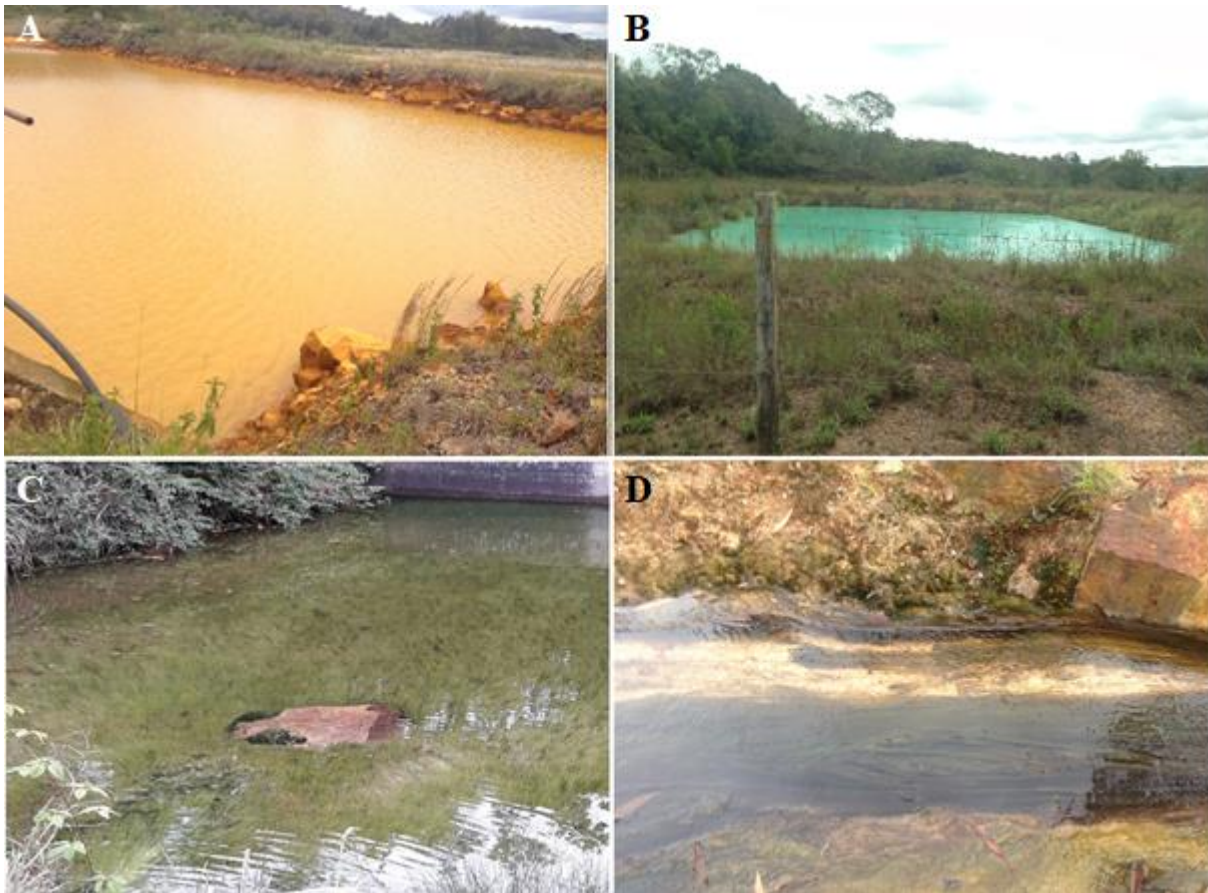


Figura 1. 3- Bacias de contenção de DAM na mina Osamu Utsumi- INB, localizada em Caldas-MG.

Fonte: A autora.

De acordo com o relatório de “Produção e vendas da Vale no 2t19”, até o segundo trimestre de 2019, a companhia havia produzido aproximadamente 100 mil toneladas de Níquel, 191 mil ton de Cobre, 5 mi ton de carvão mineral e a produção de ouro foi de 227 milhares de onças (VALE, 2019).

Com relação à produção nacional, o Anuário Mineral Brasileiro (AMB, 2019) traz o levantamento referente ao ano de 2017 e apresenta a produção das principais substâncias metálicas produzidas no Brasil (Tabela 1.4). Na Figura 1. 4 é possível visualizar a distribuição no território nacional das principais reservas minerais.

Tabela 1.4- Produção mineral referente ao ano de 2017

Substância	Produção bruta (ton)	*Contido (ton)	Teor médio (%)
Cu	111.340.233	616.934	0,55
Fe	585.337.085	318.587.105	54,43
Mn	5.805.557	1.934.237	33,32
Ni	7.253.656	111.970	1,54
Au	92.206.502	59,68	0,65
Zn	2.510.582	198.835	7,92

\*Contido: representa a quantidade de metal e/ou mineral de interesse econômico, inserido na produção bruta.

Fonte: Anuário Mineral Brasileiro (2019)

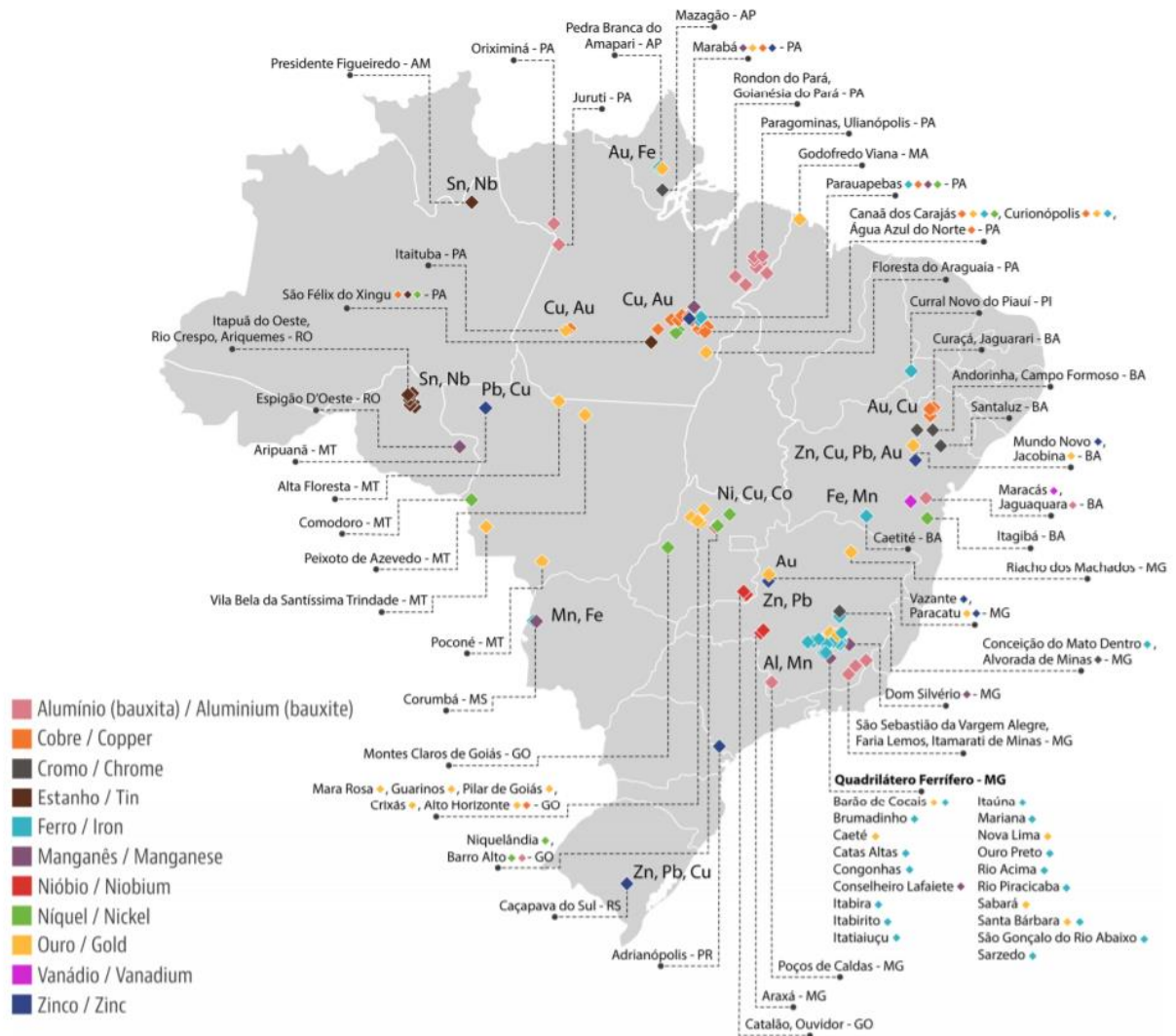


Figura 1. 4- Localização das principais reservas minerais brasileiras de 2017 dos elementos: alumínio, cobre, cromo, estanho, ferro, manganês, nióbio, níquel, ouro, vanádio e zinco.

Fonte: Anuário Mineral Brasileiro-2019

Embora não haja levantamento ou estimativa do volume da DAM gerada a partir da mineração desses metais, suas atividades estão relacionadas à geração desse passivo e os dados da produção mineral dão uma dimensão do potencial passivo ambiental.

Alguns estudos foram reportados na literatura sobre o aproveitamento desses rejeitos: Nascimento et al. (2014) apontam a possibilidade do uso de rejeitos da Mina do Sossego para a produção de adsorventes químicos e catalisadores heterogêneos. Afonso (2017) estudou a biolixiviação do rejeito gerado em uma etapa da produção do cobre a fim de recuperar o metal residual presente no rejeito da Mina do Sossego. Srichandan et al. (2019) fizeram um levantamento das aplicações e dos mecanismos de biolixiviação visando a recuperação de diversos metais.

Crane e Sapsford (2018) estudaram a recuperação seletiva do  $\text{Cu}^0$  da solução aquosa como nanopartículas a partir do efluente de uma mina localizada no Norte do País de Gales utilizando nanopartículas de ferro zerovalente (nFVZ), em que a remoção do  $\text{Cu}^{2+}$  (potencial padrão do eletrodo- $E^0$  muito mais positivo que o  $\text{Fe}^0$ ,  $\text{Fe}^0 = -0,44\text{V}$ ) geralmente ocorre de acordo com a Reação 1.5, em que o  $\text{Fe}^0$  é oxidado a Fe (II), reduzindo assim o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^0$  que predominam na superfície das nFVZ:



Já os metais que possuem  $E^0$  mais negativos que o do  $\text{Fe}^0$ , como é o caso do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  ( $-2,92$ ,  $-2,84$ ,  $-2,71$ ,  $-2,37$  e  $-1,18\text{V}$ , respectivamente), a remoção desses metais da solução aquosa como nFVZ não ocorre de maneira eficiente (Crane; Sapsford, 2018).

A precipitação seletiva de metais utilizando o sulfeto biogênico também foi descrito por Sahinkaya et al. (2009). Mohan e Chander (2001) estudaram a recuperação de íons metálicos de efluente de DAM por adsorção utilizando carbono ativado.

Além dos processos mencionados anteriormente, outros processos de recuperação de metais a partir da DAM incluem: processos físico-químicos (osmose reversa e troca iônica), processos eletroquímicos (hidrólise, eletrodialise, galvanização e eletrocínética), coagulação e sedimentação, entre outros (Crane; Sapsford, 2018).

A preocupação com respeito à mineração vai além do passivo ambiental decorrente das atividades mineradoras, destacando-se a perda de quantidades expressivas de material com potencial econômico minerável, fomentando estudos a fim de recuperar os metais dissolvidos na DAM. Atualmente, os processos físico-químicos são os mais utilizados para o tratamento da DAM, envolvendo custos elevados e gerando resíduos de difícil disposição. Devido à

problemática, pesquisadores buscam desenvolver alternativas para o tratamento eficiente e economicamente viável para o tratamento da DAM e recuperação de minérios presentes no rejeito.

Outro problema associado à DAM consiste na deficiência de matéria orgânica, micronutrientes e macronutrientes nesse efluente. A concentração de N e P na DAM é geralmente muito baixa, variando de 4,18 a 13,07 e 0,44 a 2,82 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Hao et al., 2017), e geralmente inferior aos valores encontrados em rios e oceanos (Cravotta, 2008). Nas águas do Morro do Ferro, na mina Osamu Utsumi, a concentração de carbono orgânico dissolvido variou entre 1 a 4 mg L<sup>-1</sup> devido à escassa vegetação nos arredores e à elevada precipitação pluviométrica (Miekeley et al., 1992), concentrações semelhantes foram reportadas por Hao et al. (2017), de 1,72 a 4,23 mg L<sup>-1</sup> em função das variações sazonais. A baixa concentração ou a ausência de matéria orgânica nesse tipo de efluente configura um desafio para o tratamento biológico.

Kefeni et al. (2017) ressaltam que pesquisas em áreas de exploração de minas onde ainda não houve a formação da drenagem ácida podem auxiliar em formas de prevenir sua geração. Ressaltam, ainda, que os impactos ambientais causados podem ser amenizados de algumas formas: prevenindo a geração; e uma vez formada, controlar a DAM de forma a conter esse efluente em uma área delimitada e evitar a contaminação de novos meios. Outra medida importante, que pode ser associada às demais será abordada no presente trabalho. Trata-se da coleta e tratamento desse efluente por processo biológico.

### 1.3 Tratamento anaeróbio da drenagem ácida de mina

Os impactos causados pela DAM podem ser amenizados de algumas formas: como a prevenção da geração ou com a remediação (retenção seguida de tratamento da DAM) (Johnson; Hallberg, 2005). Diversas técnicas são aplicadas para a prevenção da geração da DAM, a saber: barreiras de oxigênio; técnicas bactericidas; co-disposição e mistura de compostos que consomem acidez ou produzem alcalinidade; revestimentos orgânicos que inibem a oxidação do mineral sulfetado, e; microencapsulação (Johnson; Hallberg, 2005; Park et al., 2019).

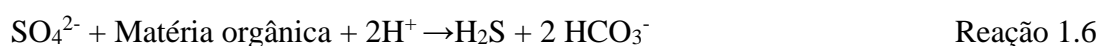
Os materiais mais comumente utilizados para o desenvolvimento das técnicas de prevenção são: argilas, solos, cobertura com vegetação e mantas geotêxteis (Naidu et al., 2019). Essas técnicas objetivam, de uma forma geral, o controle de exposição da rocha com minerais

sulfetados ao ar, água (chuva) e bactérias que atuam como catalisadores para a reação de oxidação da pirita (Naidu et al., 2019; Kefeni et al., 2017).

No entanto, uma vez que a formação da DAM não pode ser evitada, a solução é o tratamento, que pode ocorrer de forma abiótica, como o físico-químico ou de forma biológica. Os sistemas de tratamento físico-químico consiste na adição de um composto alcalino, como soda ou hidróxido de cálcio e esse tipo de tratamento geralmente tem custo elevado e geram novos resíduos de difícil disposição (Johnson; Hallberg, 2005).

A outra alternativa consiste no tratamento biológico, que é quando introduzimos um doador de elétrons para reduzir o sulfato a sulfeto e gerando assim alcalinidade no processo. A redução do sulfato biogênica em ambientes ácidos ( $\text{pH} < 3$ ) foi reportada pela primeira vez por Tuttle et al. (1969) quando verificaram a formação de depósitos de  $\text{FeS}$  no córrego de DAM proveniente da mineração de carvão e o aumento de  $\text{pH}$  do efluente após o processo (Johnson; Sánchez-Andrea, 2019).

A DAM é um efluente com baixa concentração ou ausência de matéria orgânica e macronutrientes (Cravotta, 2008; Deng; Lin, 2013; Miekeley et al., 1992), sendo necessária a adição externa do doador de elétrons. A partir disso, o tratamento biológico possibilita a remoção do sulfato, concomitantemente à geração de alcalinidade (Reação 1.6), importante para elevação e manutenção do  $\text{pH}$  em níveis adequados à atuação dos microrganismos. O sulfato, presente na DAM é removido principalmente devido ao metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS), que o utilizam como aceptor final de elétrons. O produto da sulfetogênese (sulfeto) pode ser convertido e recuperado como enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ) (Sahinkaya et al., 2009) ou possibilita a separação de metais dissolvidos no efluente (Reação 1.7). Nessa reação, 1 mol de  $\text{H}_2\text{S}$  é utilizado para a precipitação de 1 mol de sulfeto metálico. Os metais que precipitam na forma de sulfetos podem se tornar recursos valiosos quando recuperados (Kefeni et al., 2015).



Estimar a especiação da alcalinidade gerada durante a redução do sulfato é importante para a operação de reatores sulfetogênicos, em especial para reatores em que o tratamento de águas residuárias contendo metais ocorre, como é o caso da DAM. Isso porque a alcalinidade

total gerada responsável pela elevação do pH no sistema decorre tanto do sulfeto em solução ( $\text{HS}^-$ ) quanto do bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Godoi et al., 2017a).

De acordo com (Godoi et al., 2017a), a contribuição dos ânions  $\text{HS}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  ocorre de forma similar para o tamponamento do meio líquido e dessa forma, se há a precipitação do sulfeto com metais, parte da alcalinidade é perdida. O  $\text{H}_2\text{S}$ , em solução, dissocia-se em  $\text{HS}^-$  e  $\text{H}^+$  de acordo com a Reação 1.8 (Lewis, 2010).



O equilíbrio entre o  $\text{H}_2\text{S}$  na fração líquida e na forma de gás é regido pela lei de Henry. Na fração líquida, o sulfeto encontra-se presente nas formas de  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  e  $\text{S}^{2-}$  e uma pequena variação do pH na faixa de 6 a 8 provoca mudanças na especiação do sulfeto (Figura 1.5) (Lens et al., 1998).

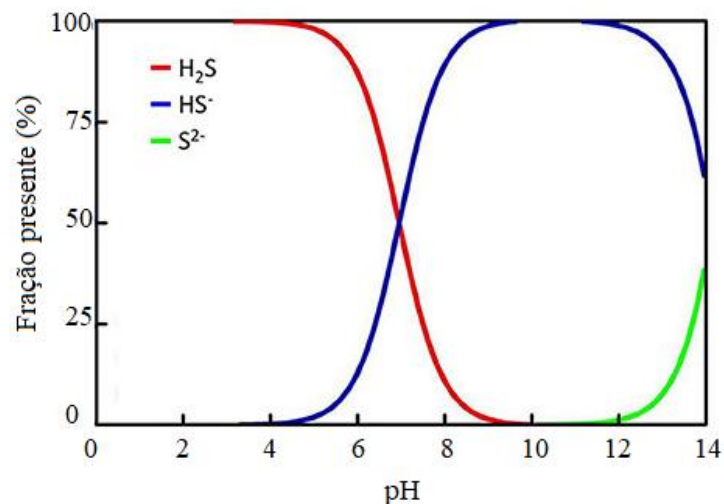


Figura 1.5- Especiação do sulfeto e a fração relativa solúvel em função do pH.  
Fonte: Holmer; Hasler-sheetal (2014)

Com relação aos metais, Kaksonen e Puhakka (2007) abordam duas formas de recuperação biótica dos metais: tratamento passivo e ativo. O tratamento passivo inclui barreiras ativas permeáveis, leitos de infiltração e lagoas; o ativo consiste na utilização de biorreatores. A Figura 1.6 apresenta algumas configurações de reatores descritas por Kaksonen e Puhakka (2007).

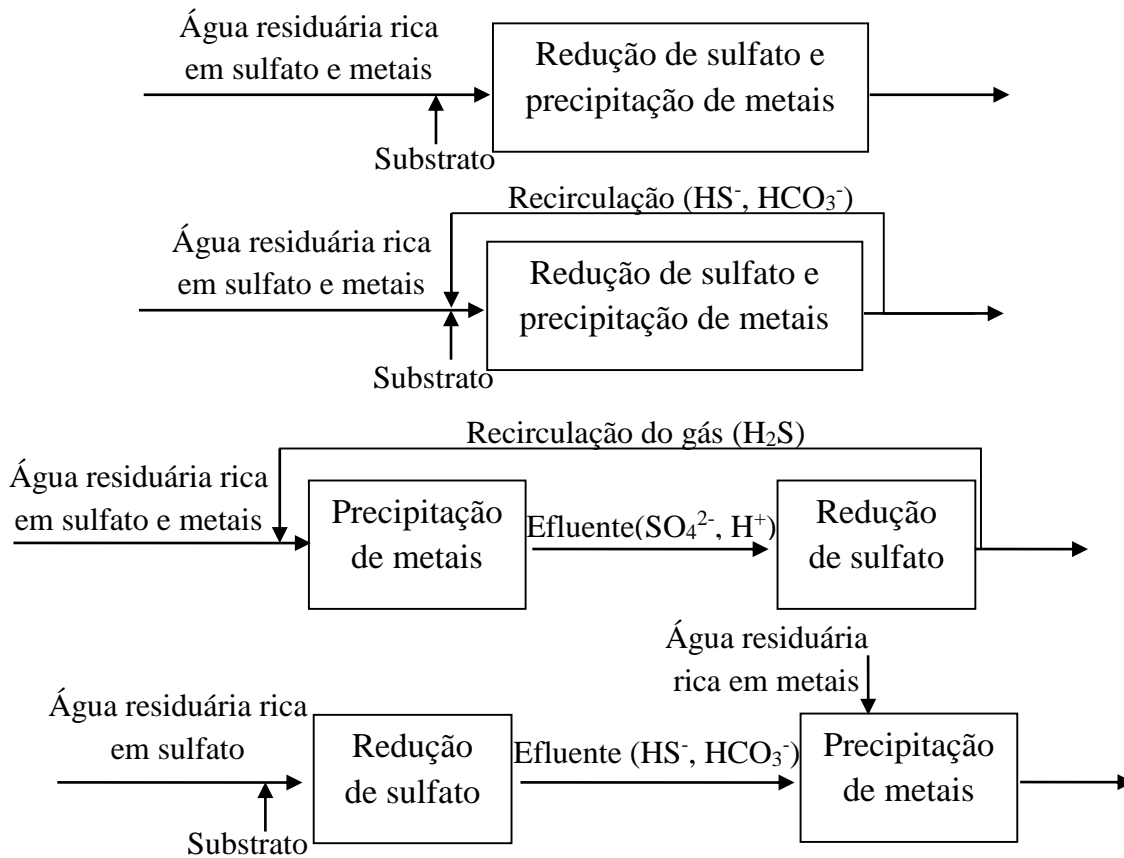


Figura 1. 6- Configurações de reatores possíveis para a redução de sulfato e precipitação de metais.

Fonte: Modificado de Kaksonen; Puhakka, 2017.

O pH da água residuária influencia na recuperação dos metais e na forma em que os metais estão disponíveis. Devido ao baixo produto de solubilidade do cobre, a precipitação do CuS ocorre em pH 2, enquanto outros metais permanecem na forma solúvel (Uçar, 2017). O alumínio em pH abaixo de 1 é dominante na forma de cátions livres (Al<sup>3+</sup>), entre pH 1,5 a 6 apresenta-se na forma de complexos sulfatados (AlSO<sub>4</sub><sup>+</sup>, Al(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub><sup>2-</sup>) e pH superior a 6 predomina na forma de hidróxidos (Al(OH)<sup>0</sup>, Al(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Al(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup>) (Espanña, 2007). O ferro encontra-se dissolvido em condições muito ácidas (pH < 2) e acima disso o Fe(III) é hidrolisado e precipita em diferentes formas dependendo do pH. O Fe (II) é mais solúvel e permanece em solução até o pH 8 (Espanña, 2007).

Embora a DAM tenha sua composição variada, em geral, os metais mais abundantes são: ferro, cobre, alumínio, níquel e zinco. A redução biológica do sulfato combinada à recuperação de metais utilizando o biossulfeto produzido foi descrita pela primeira vez na literatura por Hammack et al. (1994).



Godoi et al. (2017b) estudaram a remoção de Fe dessa água residuária e obtiveram eficiência de 95% de remoção do metal. No geral, a remoção do ferro, cobre e zinco via utilização do sulfeto biogênico tem obtido eficiências próximas ou superiores a 90% (Bai et al., 2013; Bekmezci et al., 2011; Chen et al., 2014; Sahinkaya et al., 2009; Zhang and Wang, 2016).

Falagán et al. (2017a) recuperaram 80% do alumínio adicionado na composição da DAM sintética e avaliaram que o Al não exerceu toxicidade à microbiota devido à rápida precipitação no reator. A formação de Al-hidroxi sulfatados como  $Al_4(SO_4)(OH)_{10}.4H_2O$  (pH < 4) pode facilitar a remoção de metais traços dissolvidos (Falagán et al., 2017a).

Santos e Johnson (2017) avaliaram o efeito do pH e da temperatura na cinética do tratamento da DAM e verificaram mudanças significativas na remoção de níquel e cobalto à medida que se alterava uma das variáveis, bem como mudanças na abundância das populações microbiológicas atuantes.

O tratamento biológico da drenagem ácida pela redução de sulfato tem sido estudado em diferentes configurações de reatores: batelada (Deng et al., 2016; Deng e Lin, 2013), reatores de mistura (Cui et al., 2012), reator anaeróbio compartimentado (Bekmezci et al., 2011), reatores de leito fluidizado (Bertolino et al., 2014; Sahinkaya et al., 2007), reatores UASB (Rodriguez et al., 2012), reatores anaeróbio de múltiplos leitos e fluxo ascendente (*Up-flow anaerobic multiple-bed reactor-UAMB*) (Bai et al., 2013) e reatores anaeróbio de leito fixo (Bratkova et al., 2013; Costa et al., 2009; Cunha et al., 2020; L. A.G. Godoi et al., 2017b).

Além das diversas configurações de reatores, uma grande variedade de doadores de elétrons tem sido utilizada para tratar águas residuárias ricas em sulfato e DAM, por exemplo: etanol (Rodriguez et al., 2012), butanol (Sarti and Zaiat, 2011), lactato (Bertolino et al., 2014), glicerol (Santos; Johnson, 2017), vinhaça (Godoi et al., 2017b), entre outros subprodutos e resíduos industriais.

Embora os diversos reatores estudados tenham apresentado resultados promissores no tratamento de drenagens ácidas, estudos de acompanhamento e caracterização da diversidade microbiana nas diferentes condições operacionais (relação DQO:sulfato, diferentes fontes de carbono e concentrações de metais) ainda são escassos. O conhecimento da microbiota responsável pelos processos envolvidos no tratamento da DAM pode auxiliar na definição dos parâmetros operacionais e complementações nutricionais necessárias permitindo avaliar sua aplicação em sistemas em escala plena, com aumento de eficiência e estabilidade.

#### 1.4 Microrganismos redutores de sulfato

Os microrganismos redutores de sulfato são microrganismos anaeróbios, encontrados em ambientes com características variadas. De acordo com Dev et al. (2015), as BRS já foram encontradas em ambientes hipersalinos, em sedimentos anóxicos, em fontes hidrotermais, em lamas de vulcões e em biorreatores tratando DAM. O tratamento biológico da DAM por sulfato redutoras está condicionado, também, à presença de íons metálicos (como o ferro, zinco, cobre e manganês), que em níveis tóxicos afetam suas atividades (Tang et al., 2009).

Diversas espécies de BRS foram organizadas em quatro diferentes grupos, de acordo com sequências do RNA ribossomal: BRS mesofílicas Gram-negativa; BRS em forma de esporo Gram-positiva; BRS termofílica (bactérias); e arqueias termofílicas (Castro et al., 2000). Todas as espécies são caracterizadas por utilizarem sulfato como receptor de elétrons na degradação anaeróbia (Castro et al., 2000) e em alguns casos, até na ausência de sulfato (Hansen, 1994), atestando a diversidade de rotas metabólicas das BRS.

Os grupos em que os microrganismos redutores de sulfato se encontram são: *Deltaproteobacteria*, *Clostridia*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermodesulfobiaceae* e *Nitrospirae* do Domínio *Bacteria* e *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* do Domínio *Archaea* (Figura 1. 7) (Dev et al., 2015; Muyzer e Stams, 2008).

Benedetto et al. (2005) verificaram a presença de BRS em uma mina de urânio desativada das Indústrias Nucleares Brasileiras (INB), sede de Caldas-MG. O estudo mostrou que a quantidade de BRS nas amostras apresentou pequena variação sazonal. O mês em que registrou o maior número de BRS foi o mês de fevereiro em que o pH estava um pouco mais elevado (pH 5). As BRS estavam presentes em amostras ácidas (pH 3) e com alta concentração de metais pesados, assim como em locais onde houve alta concentração de oxigênio ( $O_2 = 5,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Benedetto et al., 2005).

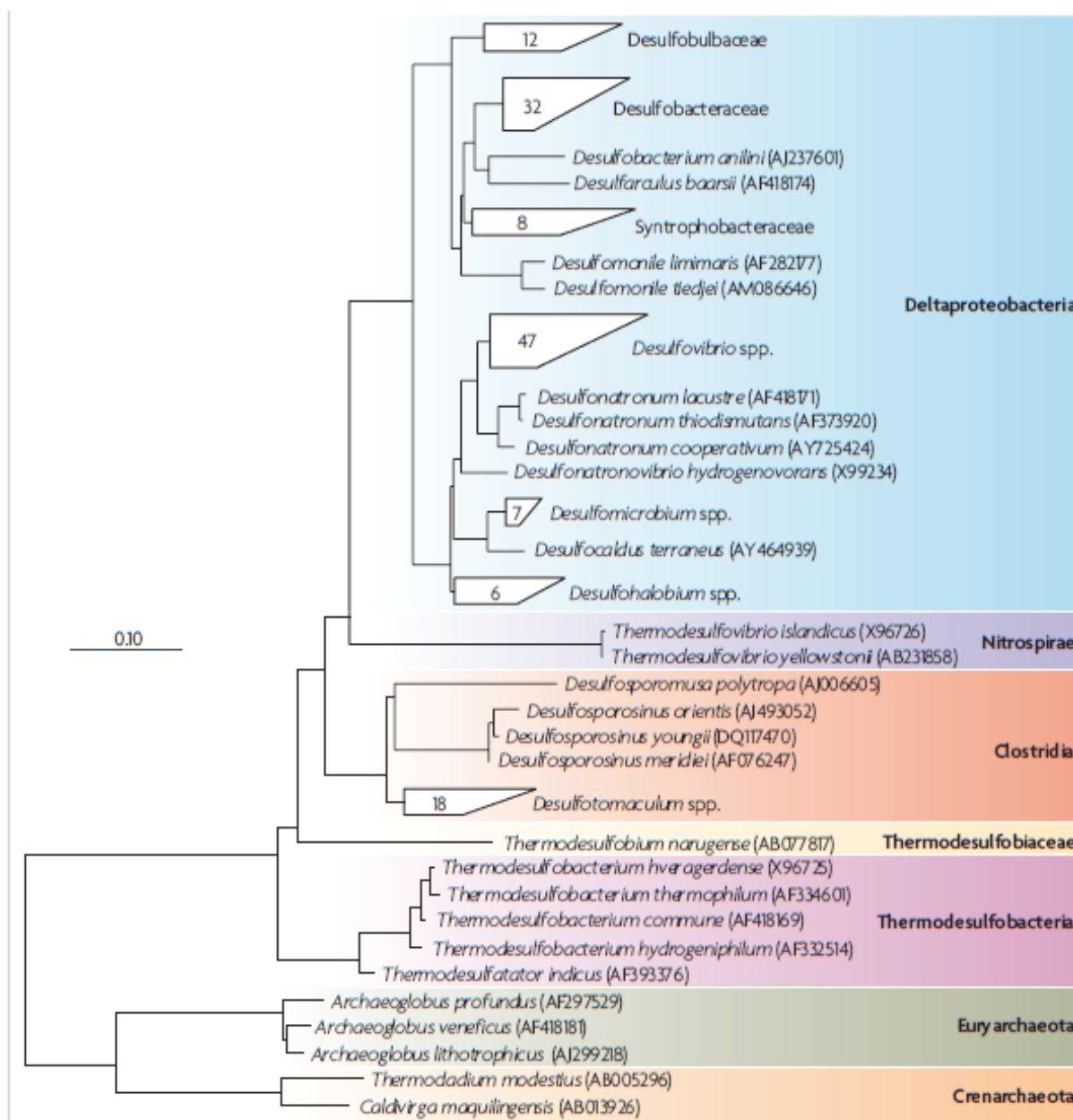


Figura 1. 7- Árvore filogenética a partir do sequenciamento quase completo do gene rRNA 16S de espécies de bactérias e arqueas redutoras de sulfato.

Fonte: Muyzer; Stams (2008)

O doador de elétrons exerce grande influência na remoção de sulfato. A utilização de compostos orgânicos de fácil degradação como butirato e etanol resultam em intermediários como o acetato (Cao et al., 2012), e o acúmulo de acetato no sistema geralmente ocasiona a competição entre as arqueas metanogênicas e as BRS, podendo assim, reduzir a eficiência da remoção do  $\text{SO}_4^{2-}$  (Cao et al., 2012) ou promover a colaboração entre ambas as populações (Damianovic e Foresti, 2007). Termodinamicamente, as BRS levam vantagem no uso de acetato e hidrogênio, com variações de energia livre ( $\Delta G_0$ ) mais eletronegativas que as metanogênicas (Muyzer; Stams, 2008). Entretanto, fatores relacionados à concentração dos microrganismos,

disponibilidade de nutrientes e presença de compostos tóxicos influenciam a cinética das reações, impedindo a utilização direta de dados da termodinâmica. A Tabela 1.5 mostra as principais reações envolvendo a redução de sulfato, a metanogênese e a acetogênese.

Tabela 1.5- Variação de energia livre para as principais rotas de degradação anaeróbia da matéria orgânica.

REAÇÃO	$\Delta G_0$ (kJ/reação)
Redutoras de sulfato	
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	- 151,9
$\text{Lactato}^- + 0,5 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 0,5 \text{HS}^-$	- 80,2
$\text{Acetato}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	- 47,6
$\text{Propionato}^- + 0,75 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 0,75 \text{HS}^- + 0,25 \text{H}^+$	- 37,7
$\text{Butirato}^- + 0,5 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{Acetato}^- + 0,5 \text{HS}^- + 0,5 \text{H}^+$	- 27,8
Acetogênicas	
$\text{Lactato}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	- 4,2
$\text{Butirato}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Acetato}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	+ 48,3
$\text{Propionato}^- + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3 \text{H}_2$	+ 76,1
Metanogênicas	
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	- 135,6
$\text{Acetato}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31,0

Fonte: Liamleam e Annachhatre, 2007; Muyzer e Stams, 2008; Cao et al., 2012.

Hiibel et al. (2011) estudaram a influência dos substratos orgânicos utilizados como doadores de elétrons para atividade microbiana tratando DAM e verificaram a predominância de aproximadamente 70% de BRS em reatores utilizando o etanol. Aproximadamente 30 clones foram sequenciados de cada reator alimentado e apresentaram baixa diversidade microbiana. Dentre os clones sequenciados, apresentaram maior similaridade com as *Desulfovibrio aerotolerans* e *Desulfovibrio sp.* JD160 (Hiibel et al., 2011). Outro representante dessa biota é o grupo pertencente ao gênero *Acidithiobacillus*, incluindo as bactérias *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. Com grande diversidade metabólica, a *A. ferrooxidans*, além de oxidar compostos reduzidos de enxofre, possui a capacidade de oxidar o hidrogênio molecular, o ácido fórmico, o íon ferroso e outros metais (Rohwerder et al., 2003).

Para o bom desempenho dos sistemas de tratamento biológico, o tipo de inóculo e substrato são fatores importantes e intrínsecos ao metabolismo microbiano (Liamleam; Annachhatre, 2007; Sánchez-Andrea et al., 2014), capazes de definir quais grupos microbianos permanecerão ao longo do tratamento (Hiibel et al., 2011). As BRS se mostraram eficientes no tratamento biológico da DAM, possibilitando a conversão do sulfato em sulfeto ou enxofre elementar, passíveis de remoção em processos subsequentes (Deng et al, 2016). Dessa forma, utilizar meios de cultura de BRS provenientes de sedimento enriquecido de minas como inóculo pode proporcionar resultados promissores devido à maior capacidade de adaptação às condições ambientais extremas.

### 1.5 O uso do glicerol como doador de elétrons no tratamento biológico

O glicerol, também conhecido como glicerina, é o subproduto do biodiesel, que pode ser produzido a partir do óleo de dendê, de milho, de soja, de girassol, macaúba, babaçu, etc. A produção do biodiesel aumentou no final do século XX e atualmente os maiores produtores mundiais dessa fonte de energia renovável são: EUA, Brasil, Alemanha, Indonésia e Argentina. Em 2016, a produção mundial de biodiesel superou os 30 Mm<sup>3</sup> sendo os 5 países citados anteriormente responsáveis por 60% de toda a produção (Monteiro et al., 2018).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2019), a produção de biodiesel nacional referente ao ano de 2018 foi de 5,3 Mm<sup>3</sup>. Até o final do terceiro trimestre de 2019, a produção já ultrapassava os 4 Mm<sup>3</sup>. Estima-se que aproximadamente 10% do volume produzido de biodiesel gera como subproduto o glicerol cru (Monteiro et al., 2018).

Somente no Brasil, a produção de glicerol no ano de 2018 foi de 400 mil m<sup>3</sup>. A Figura 1. 8 traz o levantamento histórico de produção de glicerina de 2009 a 2018, havendo um incremento de mais de 100% na última década.

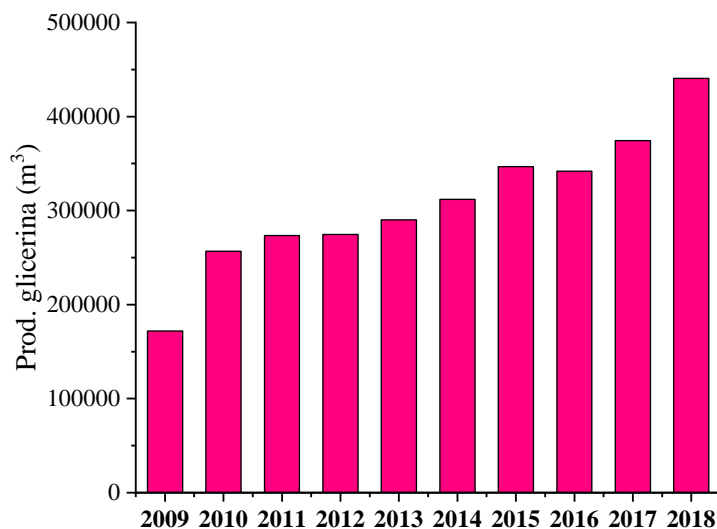


Figura 1. 8- Produção nacional de glicerina a partir da produção de biodiesel em m<sup>3</sup>.  
Fonte: ANP 2019

A Figura 1. 9 disponibilizada pela ANP (2019) apresenta as plantas de biodiesel autorizadas para operação em cada estado brasileiro referente ao ano de 2019, bem como informações quanto a capacidade de produção diária de biodiesel em m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>.

Se no passado a glicerina era vista como um resíduo, atualmente a glicerina purificada é utilizada nas indústrias farmacêuticas, químicas, alimentícias e na produção de cosméticos. No entanto, esse mercado enfrenta desafios por não conseguir absorver toda a produção e novas alternativas de uso para o glicerol precisam ser incentivadas para manter a sustentabilidade da produção do biodiesel.

O uso do glicerol como uma fonte de carbono alternativa para o tratamento biológico mostra-se viável devido à elevada concentração orgânica desse material, baixo custo e às características que o classificam como resíduo não perigoso de acordo com a NBR 10004 de 2004, facilitando assim seu manuseio e transporte.

Vários estudos reportados na literatura demonstram a capacidade de uso para o tratamento anaeróbio, incluindo seu uso para tratamento de DAM sintética (Bertolino et al., 2014; Hedrich; Johnson, 2014; Ñancucheo et al., 2012; Ñancucheo; Johnson, 2012; Santos; Johnson, 2017).

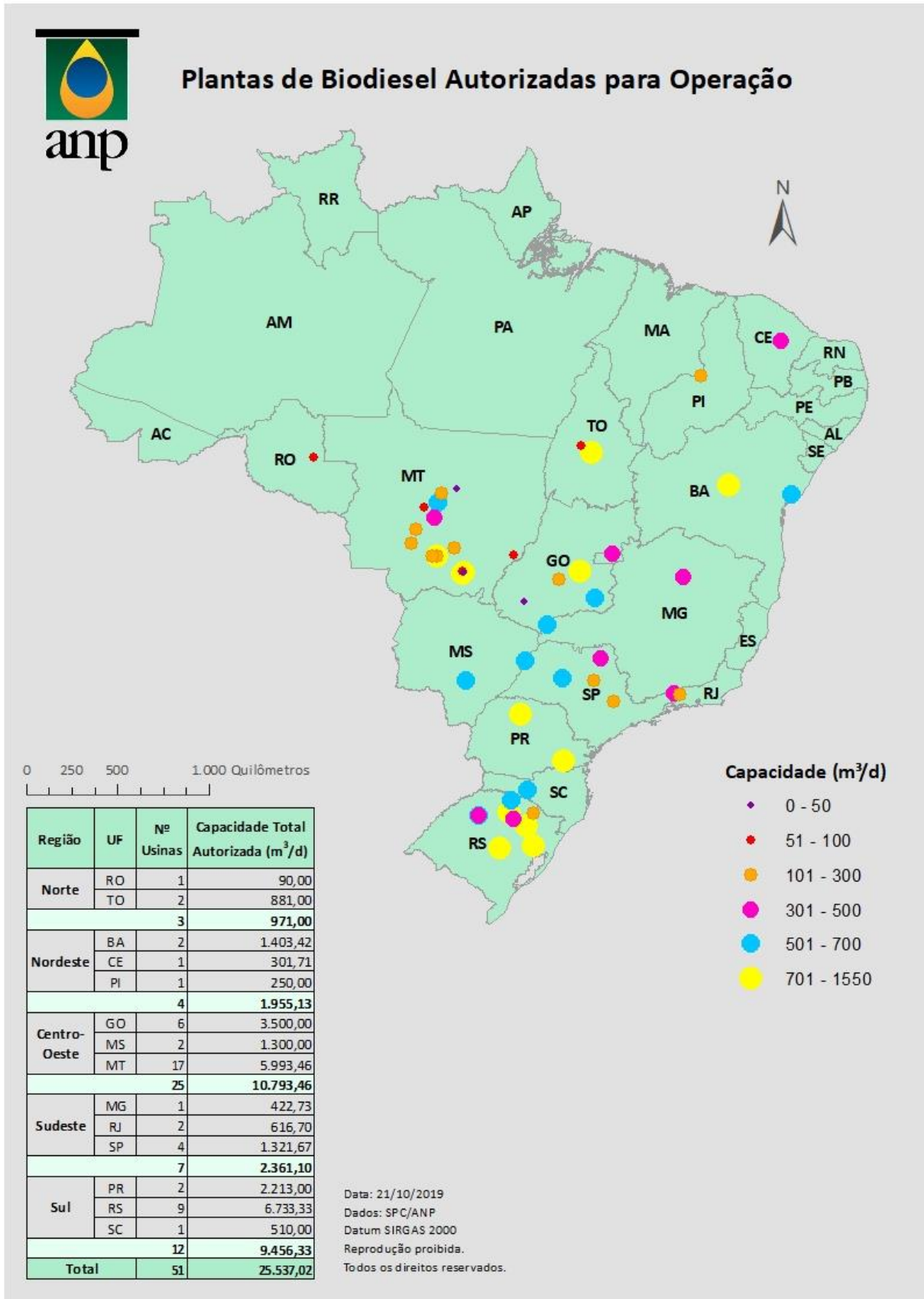


Figura 1. 9- Plantas de biodiesel autorizadas para operação em cada estado brasileiro.  
 Fonte: ANP 2019

## 1.6 A vinhaça da cana-de-açúcar no Brasil e seu uso como doador de elétrons na digestão anaeróbia

A vinhaça é uma água residuária proveniente da produção de etanol e estima-se que para cada litro de etanol produzido, aproximadamente, 12 a 15 L de vinhaça são gerados no processo, efluente esse que sai do processo com temperaturas em torno de 90 a 100 °C (Niz et al., 2019).

A produção do biocombustível álcool a partir da cana-de-açúcar no Brasil foi estimulada a partir de 1975 com o Programa Nacional de Álcool (Driessen et al., 1994). Devido ao elevado volume de vinhaça gerado pela produção do álcool, medidas de descartes, reuso e tratamento desse efluente começaram a ser pesquisadas.

Com características muito variadas, pois depende do processo de produção, a concentração de matéria orgânica medida como DQO pode variar de 19 g L<sup>-1</sup> (Nadaleti et al., 2020) a 299 g L<sup>-1</sup> (Syaichurrozi, 2016), a depender do quão concentrado encontra-se o efluente. Além disso, há na vinhaça elevadas concentrações de sacarose, nitrogênio, sulfato, fósforo, sódio, potássio, ácidos orgânicos, metais e etanol residual (Parsaee et al., 2019) (Parsaee et al., 2019).

Devido à diversidade da composição da vinhaça, Cunha et al. (1987) pesquisaram o efeito do descarte desse efluente nas áreas de cultivo da cana-de-açúcar para as características do solo. No entanto, apenas em 1984 foi que a viabilidade do tratamento anaeróbio da vinhaça começou a ser pesquisado, a partir da instalação de pequenas estações de tratamento (Driessen et al., 1994) em que os autores apresentaram resultados de eficiência do tratamento anaeróbio e a caracterização dos efluentes, tanto da vinhaça quanto do melaço da cana-de-açúcar de países como o Brasil, Índia e Venezuela.

Com grande potencial para a produção de biogás, vários estudos foram reportados na literatura para o uso da vinhaça na produção de metano e bioenergia (Nadaleti et al., 2020; Parsaee et al., 2019) e do biohidrogênio (Fuess et al., 2019; Niz et al., 2019). Primeira vez descrito na literatura, a vinhaça foi utilizada como fonte de carbono visando a precipitação de metais por Gonçalves et al. (2007) e no co-tratamento com a DAM sintética por Godoi et al. (2017b).

A Tabela 1.6 apresenta os dados anuais do volume de etanol produzidos no Brasil nas duas últimas décadas. De acordo com o ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), foram 35,6 milhões de m<sup>3</sup> (Mm<sup>3</sup>) produzidos em 2019, um aumento de mais de 200% a mais que em 2001, quando a produção nacional passou a ser contabilizada.



Tabela 1. 6- Produção brasileira de etanol.

*Ano/Safra	*Produção de etanol (milhões m <sup>3</sup> )	Estimativa de geração de vinhaça (milhões de m <sup>3</sup> )
2000/2001	10,5	126,0 – 157,0
2001/2002	11,5	138,0 – 172,5
2002/2003	12,5	150,0 – 187,5
2003/2004	14,6	175,2 – 219,0
2004/2005	15,2	182,4 – 228,0
2005/2006	15,8	189,6 – 237,0
2006/2007	17,9	214,8 – 268,5
2007/2008	22,4	268,5 – 336,0
2008/2009	27,7	332,4 – 415,5
2009/2010	25,7	308,4 – 385,5
2010/2011	27,6	331,2 – 414,0
2011/2012	22,8	273,6 – 342,0
2012/2013	23,5	282,0 – 352,5
2013/2014	28,0	336,0 – 420,0
2014/2015	28,9	346,8 – 433,5
2015/2016	30,5	366,0 – 454,5
2016/2017	27,7	332,4 – 415,5
2017/2018	27,8	333,6 – 417,0
2018/2019	33,1	397,2 – 496,5
2019/2020	35,6	427,2 – 534,0

\*Fonte: MAPA (2020)

Observando a Tabela 1. 6, mesmo com o recuo da produção dos anos 2016 e 2017 com relação à 2015, a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar apresenta-se como uma atividade consolidada, um combustível alternativo aos combustíveis fósseis e com tendência de crescimento anual.

Liamleam e Annachatre (2007) fizeram um importante levantamento da variedade de compostos já utilizados como doadores de elétrons e descrevem as características e vantagens de cada uma para a redução de sulfato. O etanol (Giordani et al., 2019; Rodriguez et al., 2012; Sahinkaya et al., 2007; Vieira et al., 2016), butanol (Sarti; Zaiat, 2011), lactato (Bertolino et al., 2014; Giordani et al., 2019), formiato (Giordani et al., 2019) entre outros são

convencionalmente utilizados na digestão anaeróbia, no entanto são fontes de carbono com altos custos.

Dessa forma, a vinhaça, que até o momento não possui valor de mercado agregado e que constitui uma água residuária rica em matéria orgânica e outros componentes, apresenta-se como um doador de elétrons alternativo aos já amplamente relatados na literatura. Possibilitando inclusive o co-tratamento com a DAM e outras águas residuárias carentes de nutrientes e carbono.

### 1.7 Toxicidade dos metais para a microbiota

A DAM tem em sua composição elevadas concentrações de metais dissolvidos, que podem desativar enzimas e inibir o metabolismo dos microrganismos. O efeito tóxico do metal à comunidade microbiana pode levar a morte celular, enquanto o efeito de inibição pelo metal reduz as taxas metabólicas da comunidade sobrevivente. A toxicidade de alguns metais para as BRS são apresentadas por Utgikar et al. (2002). Os autores reúnem uma série de valores de concentrações tóxicas de diferentes metais para culturas puras e mistas de BRS (Tabela 1.7).

Tabela 1. 7- Toxicidade dos metais para BRS

Metal	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração (mM)
Cu	2-50	0,03-0,8
Zn	13-40	0,2- 0,6
Pb	75-125	0,3-0,6
Cd	4-54	0,03-0,5
Ni	10-20	0,17-0,34
Cr	60	1,15
Hg	74	0,3

Fonte: Utgikar et al. (2002)

Alguns parâmetros podem ser ajustados e técnicas de biorremediação otimizadas a fim de tornar o tratamento de ambientes ácidos e ricos em metais mais eficiente. Para isso, conhecer a toxicidade dos metais e como bactérias acidofílicas (extremófilas) sobrevivem a ambientes extremos pode auxiliar na otimização de técnicas desenvolvidas (Dopson et al., 2003). Os

microrganismos acidófilos crescem em ambientes com pH abaixo de 3 e incluem bactérias e arqueas, e seus metabolismos podem ser quimiolitotrófico, quimioautotrófico ou quimioheterotrófico (Hallberg; Johnson, 2001; Dopson et al., 2003).

Concentrações máximas toleráveis dos metais As, Zn, Cu, Cd e Ni por acidófilas em que ainda verifica-se atividade metabólica estão apresentadas na Tabela 1.8 (Dopson et al., 2003). De acordo com as Tabelas 1.7 e 1.8, verifica-se maior vantagem das acidófilas quando comparadas ao metabolismo de algumas BRS. Essa vantagem demonstra a importância da pesquisa microbiológica e a utilização de microrganismos ácido tolerantes para o tratamento da DAM.

Tabela 1. 8- Concentração máxima tolerável por microrganismos

Microrganismos	Concentração em mM				
	As (III)	Cu (II)	Zn (II)	Cd (II)	Ni(II)
<b>Neutrófilos</b>					
<i>Escherichia coli</i>	4	1	1	0,5	1
<b>Bactérias acidófilas</b>					
<i>Acidiphilium multivorum</i>	30	10	40	20	450
<i>Acidiphilium cryptum</i>	-	15	125	700	20
<i>Acidiphilium multivorum</i>	30	10	40	20	350
<i>Acidiphilium symbioticum</i> KM2	ND	20	150	700	20
<i>Acidiphilium symbioticum</i> H8	ND	15	150	700	30
<i>Acidiphilium angustum</i>	ND	5	8	< 0,2	10
<i>Acidiphilium</i> strain GS18h	ND	15	60	10	30
<i>Acidocella aminolytica</i>	ND	30	500	200	150
<i>Acidocella facilis</i>	ND	<1	100	<1	1
<i>Acidocella</i> strain GS19h	ND	15	900	700	150
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	84	800	1071	500	1000
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	ND	6	43	ND	5
<b>Arqueas acidófilas</b>					
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	13	16	ND	9	ND
<i>Metallosphaera sedula</i>	1	16	150	1	ND
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	ND	1	10	10	1
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ND	1	10	10	0,1

ND- Não detectado

Fonte: Dopson et al. (2003)

A Tabela 1.9 apresenta o produto de solubilidade de metais presentes em abundância em DAM. O produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ) de sulfetos metálicos (Fe, Cu, Zn e Cd) é muito menor quando comparado aos hidróxidos, assim é mais eficiente a remoção de metais via redução de sulfato precipitando-os na forma de sulfetos (Sahinkaya et al., 2011). Dessa forma, elimina-se a toxicidade dos metais aos microrganismos por estarem insolúveis no meio. As Figuras 1. 10 e 1. 11 apresentam a solubilidade dos sulfetos e hidróxidos metálicos em função do pH, respectivamente (Lewis, 2010).

Tabela 1. 9- Produto de solubilidade para sulfetos e hidróxidos

Metais	Produto de solubilidade (mol L <sup>-1</sup> )	
	S <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup>
Al	$2 \times 10^{-17}$	$1,3 \times 10^{-33}$
Cd	$8 \times 10^{-27}$	$7,2 \times 10^{-15}$
Co	$4 \times 10^{-21}$ (a-CoS) $2 \times 10^{-25}$ (b-CoS)	$5,9 \times 10^{-15}$ -
Cr	-	$2 \times 10^{-16}$
Cu	$6,3 \times 10^{-36}$	$2,2 \times 10^{-20}$
Fe	$6,3 \times 10^{-18}$	$4,9 \times 10^{-17}$
Mn	$2,5 \times 10^{-10}$ (MnS amorfo) $2,5 \times 10^{-13}$ (MnS cristalino)	$1,9 \times 10^{-13}$
Ni	$3,2 \times 10^{-19}$ (a -NiS) $1 \times 10^{-24}$ (b -NiS) $2 \times 10^{-26}$ (g-NiS)	$5,5 \times 10^{-16}$
Pb	$8 \times 10^{-28}$	$1,4 \times 10^{-15}$
Zn	$1,6 \times 10^{-24}$ (a-ZnS) $2,5 \times 10^{-22}$ (b-ZnS)	$3 \times 10^{-17}$

Fonte: Sahinkaya et al. 2011

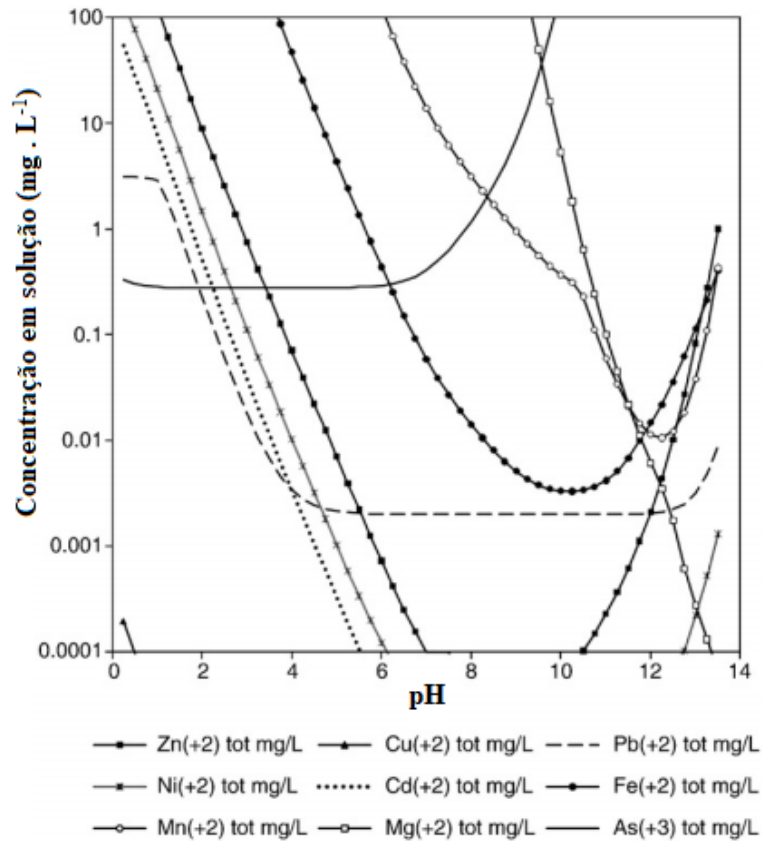


Figura 1. 10- Solubilidade de sulfetos metálicos em função do pH.  
 Fonte: Lewis, 2010.

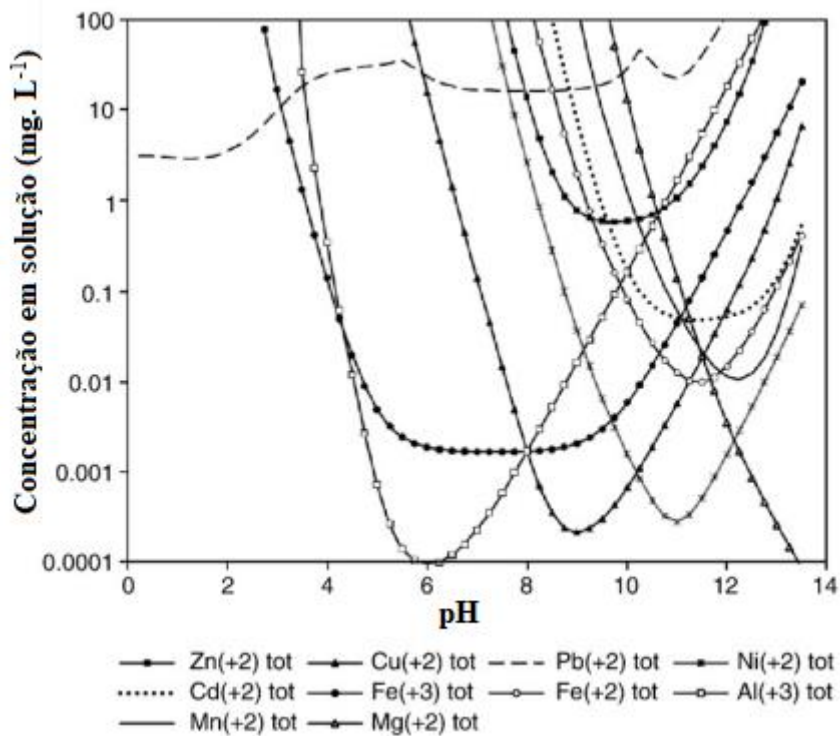


Figura 1. 11- Solubilidade de hidróxidos metálicos em função do pH.  
 Fonte: Lewis, 2010.

## 1.8 Elementos terras raras

Os elementos terras raras (ETRs) incluem os 15 elementos da família dos Lantanídeos, o escândio (Sc) e ítrio (Y). São geralmente classificados em leves (La, Ce, Pr, Nd e Sm) e pesados (Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu e Y). Esses elementos ganharam destaque devido às ótimas propriedades catalíticas, ópticas, eletrônicas e magnéticas, além de possuir elevado valor econômico (Cao et al., 2019; Lefticariu et al., 2020)

Os ETRs são utilizados principalmente nas indústrias eletrônicas, de catalisadores, na indústria cerâmica e de vidros, metalúrgicas, polimentos e outros. Nas indústrias eletrônicas e tecnológicas, a aplicação desses elementos está na produção de veículos híbridos, baterias recarregáveis, turbinas de vento, celulares, chips, lâmpadas fluorescentes, notebooks, conversores catalíticos, discos drivers, placas e telas, etc. Com aplicações também medicinais, farmacêuticas, dispositivos de energias limpas (solar e vento), zootécnicas e agricultura (Lefticariu et al., 2020; Salo et al., 2020).

Ao contrário do que sugere o nome, os elementos terras raras não são raros ou terras. São encontrados na crosta terrestre em abundância, no entanto, o termo "raro" está mais relacionado ao fato da dificuldade da exploração dos depósitos que devido às baixas concentrações dos elementos, muitas vezes torna a área economicamente não-viável para exploração. A recuperação desses metais a partir de rejeitos, como as DAM tem sido considerada, assim como a reciclagem de materiais eletrônicos descartados. No entanto, o processo de reciclagem ainda encontra uma série de dificuldades associados à coleta do material e seu processamento (Edahbi et al., 2019)

A reciclagem desses elementos ainda é bastante limitada e estima-se que menos de 1% de todo o consumo dos ETRs seja reciclado (Favot; Massarutto, 2019), o que ocorre principalmente por meio de lâmpadas fluorescentes, baterias recarregáveis e ímãs permanentes (Binnemans et al., 2013; Edahbi et al., 2019; U.S. Geological Survey, 2020). A recuperação desses metais a partir de equipamentos eletro-eletrônicos requer o uso de processos avançados e até existem projetos em atividade a níveis experimentais (Favot; Massarutto, 2019), mas que ainda não atingiram escalas industriais. Outra dificuldade enfrentada na reciclagem encontra-se no tratamento das impurezas após o processo (Edahbi et al., 2019).

A eficiência na recuperação dos ETR depende de fatores como: tipo de tecnologia utilizada para recuperar os elementos, quais elementos desejáveis na recuperação e qual a natureza do objeto, sua origem e as condições de extração (Edahbi et al., 2019), sendo os

processos mais comumente utilizados: a dissolução total, a dissolução seletiva e a lixiviação sequencial.

Há ainda a dificuldade no processo de separação dos elementos devido às suas propriedades químicas semelhantes. Todos os ETRs são física e quimicamente similares, possuem a mesma configuração eletrônica externa  $[\text{Xe}]6s^2 5d^1 4f^x$ , variando de 0 a 14. Com exceção do Ce e Eu que podem ser carregados  $2^+$  e  $4^+$  (a depender das condições redox), os outros elementos são cátions trivalentes ( $M^{3+}$ ). O que os diferenciam é o tamanho iônico, que diminui de 1,2 a 0,7 Å à medida que o número atômico aumenta de 57 a 71 (Edahbi et al., 2019).

As características dos ETRs permitem sua substituição por outros elementos metálicos que apresentam raio iônico similares, como o Ca, Na e U (Edahbi et al., 2019). Quando combinados com ânions, os ETRs se apresentam na forma solúvel (cloretos e nitratos) ou insolúvel (na forma de sulfetos, fluoretos, carbonetos, oxalatos e fosfatos). Podem ainda formar complexos estáveis com moléculas orgânicas (matéria orgânica e ácido fúlvico).

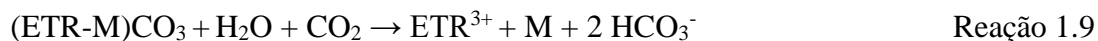
O comportamento dos ETRs no processo de lixiviação natural, ou seja, a interação das pilhas de rejeitos com a água e oxigênio aceleram a oxidação dos minerais sulfetados, que são muito reativos e promovem a dissolução de outros metais (Nordstrom, 2012). Quanto à composição dos terras raras, a reatividade dos compostos segue essa ordem: na forma de carbonatos > oxi/hidróxidos de ferro > silicatos (Linnen, 2014).

### 1.8.1 Reatividade dos complexos terras raras

Os minerais de terras raras integram-se na forma de estruturas de cristais de silicatos, carbonatos e fosfatos e podem ser substituídos por outros elementos a depender do tamanho do raio iônico e das cargas de íons dos mesmos. Os cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Th}^{2+}$  e  $\text{U}^{3+}$  podem por exemplo serem substituídos por cátions de terras raras.

#### *Reatividade dos complexos carbonatos*

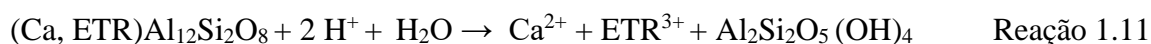
A dissolução dos complexos carbonatos em sistemas naturais ocorre de acordo com a Reação 1.9 e quando há a geração de ácido sulfúrico a partir da oxidação do sulfeto, pode promover a dissolução do carbonato como apresentado na Reação 1.10 (Edahbi et al., 2019; Sherlock et al., 1995). Sendo M: Ba, Ca, U, Th, F, Sr e íons de terras raras.



Os principais fatores que controlam a reatividade dos carbonatos são: pH, temperatura, a presença de matéria orgânica e a pressão parcial do CO<sub>2</sub> em caso de sistemas fechados. A velocidade de dissolução do carbonato é inversamente proporcional ao pH, ou seja, quanto menor o pH, maior será a solubilidade dos carbonatos.

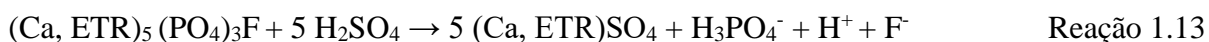
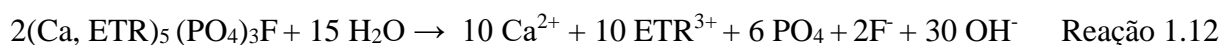
#### *Reatividade dos complexos silicatos*

A dissolução dos minerais silicatos dependem do pH, temperatura, composição mineralógica, estrutura mineral e fatores ambientais externos. Os silicatos tendem a solubilizar gerando silicatos secundários como demonstrado na Reação 1.11 (Edahbi et al., 2019; Sherlock et al., 1995).



#### *Reatividade dos complexos fosfatos*

Os minerais fosfatados comumente ricos em ETR são: apatita, monazita ((ETR, Th)PO<sub>4</sub>) e xenotima (YPO<sub>4</sub>). A reação da dissolução da apatita em água e em resposta à geração de ácido é apresentada nas Reações 1.12 e 1.13, respectivamente ((Edahbi et al., 2019):



Uma vez em solução, os ETR podem precipitar como sulfatos, fosfatos e fluoretos devido à baixa solubilidade (K<sub>ps</sub>) em condições de pH neutro (Tabela 1.10) e também como fosfatos secundários na forma de ETRPO<sub>4</sub> ou ETR-F<sub>3</sub>.



Tabela 1.10- Produto de solubilidade de compostos terras raras

<b>Compostos terras raras</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Kps (25 °C)</b>
Carbonatos	$\text{ETR}_2(\text{CO}_3)_3$	$10^{-28.25}$ a $10^{-35.77}$
Fluoreto de ítrio	$\text{YF}_3$	$8.62 \times 10^{-21}$
Hidróxido de ítrio	$\text{Y}(\text{OH})_3$	$10^{-22}$
Fosfatos	$\text{ETRPO}_4$	$10^{-24}$

Fonte: Edahbi et al., 2019

De acordo com Hurst (2010), utilizando a técnica de calcinação a altas temperaturas e utilizando ácido sulfúrico concentrado, para cada tonelada de óxidos de ETRs produzidos na China, são gerados de 9600 a 12000 m<sup>3</sup> de rejeitos minerais gasosos incluindo poeiras, ácidos sulfúrico e hidrofluorico, dióxido de enxofre, 75 m<sup>3</sup> de águas ácidas e aproximadamente 1 ton de material radioativo (Hurst, 2010, Edahbi et al., 2019).

Em Baotou, onde há as maiores plantas de mineração de lantanídeos da China, estima-se que 10 mi de toneladas de todo o tipo de água residuária são geradas todos os anos e lançadas sem nenhum tipo de tratamento efetivo, contaminando as águas de abastecimento, irrigação e do ambiente adjacente (Hurst, 2010).

A partir de 2011, a China passou a controlar o mercado dos ETRs, gerando um problema geopolítico em que o país concentra cerca de 90% da produção mundial dos ETR (Schlinkert; van den Boogaart, 2015; Skirrow et al., 2013), seguido de países como a Austrália, Estados Unidos, Rússia, Índia e Brasil. No entanto, as três maiores reservas de ETRs encontram-se na China, Brasil e Vietnam (U.S. Geological Survey, 2020). A comissão europeia incluiu os ETRs na lista de matérias-primas críticas devido ao risco de desabastecimento do mercado e à falta de alternativa de supri-los. O departamento de energia americano também avaliou a situação do Y e outros ETRs como crítica quanto ao suprimento a médio prazo (até 2025) e quanto à importância dessa matéria-prima para o desenvolvimento de energia limpa (Amato et al., 2019).

Os ETRs possuem sua forma mais estável na forma de óxidos e a fórmula comum para os óxidos trivalentes é o  $\text{Re}_2\text{O}_3$ , sendo o "Re" representante dos ETR. Esses óxidos reagem com a água rapidamente em elevadas temperaturas e mais lentamente em baixas temperaturas, produzindo óxido ou hidróxido insolúvel (Abdelnour et al., 2019).

Um número limitado de estudos foi relatado sobre a possibilidade de recuperar ETRs a partir do tratamento anaeróbio de águas residuárias. Mäkinen et al., (2017) e Salo et al., (2018)

relatarem estudos recuperando-os de lixiviado de resíduo de fosfogesso (PG) onde as bactérias redutoras de sulfato foram utilizadas para realizar o tratamento.

No estudo apresentado por Mäkinen et al. (2017), experimentos em batelada e um biorreator de fluxo contínuo foram utilizados para remoção simultânea de sulfato e recuperação de ETRs. Para o experimento em batelada, *Desulfovibrio desulfuricans* foi utilizado como inóculo e lactato e extrato de levedura como fonte de carbono e energia. O etanol foi utilizado como doador de elétrons e uma solução de nutrientes também foi adicionada para o tratamento de efluente de PG contendo 1340-1414 mg L<sup>-1</sup> SO<sub>4</sub>. O pH afluente foi mantido entre 5,9 e 6,6.

A eficiência da redução do sulfato variou de 40 a 80%, permanecendo em torno de 280 mgSO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> no efluente quando 80% de eficiência foi alcançada e uma taxa de remoção de 1080 gSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>. Em ambos os biorreatores, batelada e fluxo contínuo, os autores confirmaram a precipitação e o acúmulo de ETRs no lodo (Mäkinen et al., 2017) e concluíram a tendência de precipitar REE dissolvido em sistemas de anaeróbios sulfetogênicos (Tabela 1.11).

Tabela 1. 11- Concentrações de ETRs precipitados no experimento em batelada, da amostra de lodo inicial utilizada como inóculo do biorreator contínuo e lodo final após o experimento do biorreator contínuo.

[mg kg <sup>-1</sup> ]	La	Ce	Y	Nd	Dy	Eu	Gd	Pr	Sm
Lodo do batelada	30400	66200	8800	n.a.	2400	1730	6750	10000	6310
Lodo inicial	7.3	13	3.6	7.2	0.8	0.2	1.02	1.69	1.4
Lodo final	202	477	48.8	295	12.8	10.7	31.3	67.3	43.2

Fonte: Mäkinen et al., 2017.

Salo et al. (2018) avaliaram o tratamento biológico da água residuária de fosfogesso utilizando BRS e monitorando o comportamento dos ETR. O estudo conduzido por Salo et al. (2018) foi a primeira pesquisa a descrever como os ETRs precipitam após tratamento anaeróbio sulfetogênico. Os principais minerais encontrados nas análises de precipitado finais foram apatita, ardealita, gesso, mistura gesso-apatita, ETR-apatita e mistura gesso-silicato.

No presente trabalho, buscou-se avaliar se a toxicidade dos ETR para os microrganismos e avaliar a possibilidade de remoção desses elementos de uma DAM real com elevada concentração de ETR e outros metais em pH moderadamente ácido.

## Capítulo 2

### 2. Material e métodos

Este capítulo abordará os materiais utilizados e as metodologias de análise em comum para os capítulos seguintes, excetuando-se o Capítulo 7, que será completamente descrito no capítulo correspondente. A Figura 2. 1 sintetiza as pesquisas desenvolvidas no presente trabalho.

Informações adicionais de caráter independente a cada capítulo estão descritas individualmente nas respectivas seções.

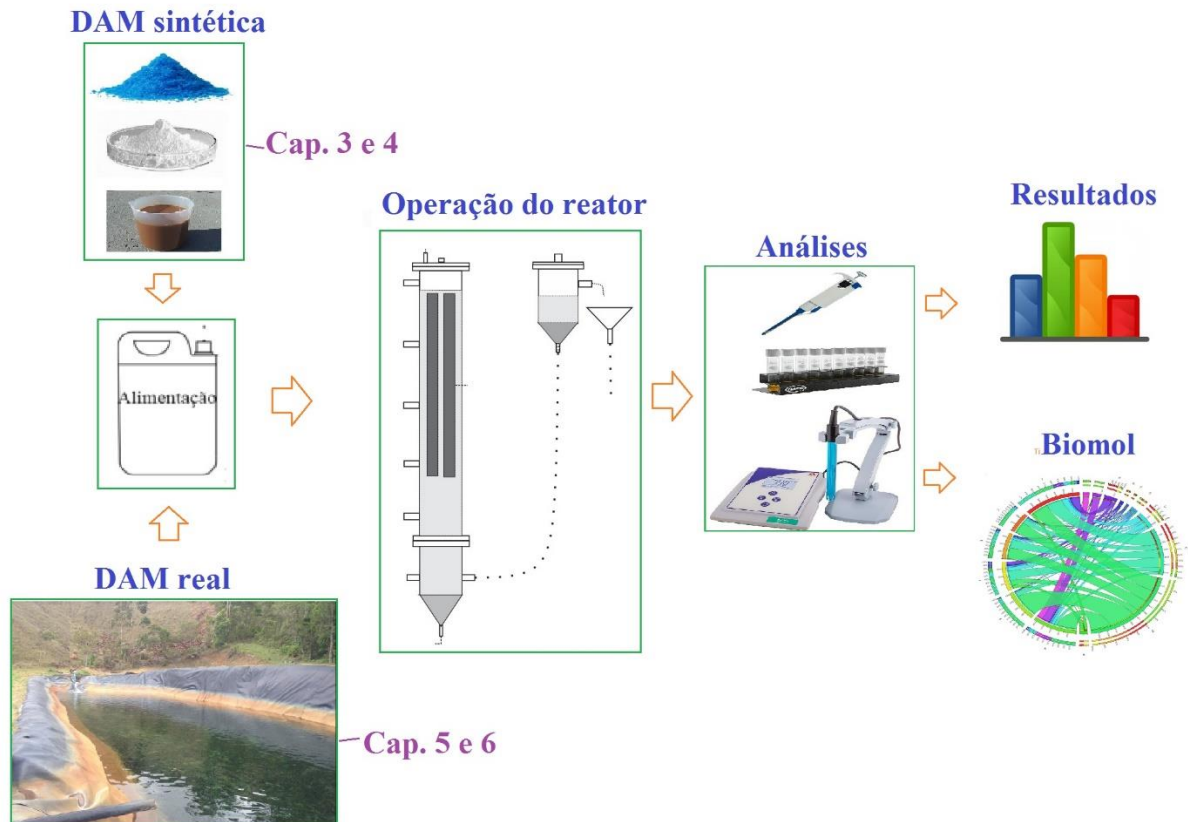


Figura 2. 1- Resumo esquemático das pesquisas desenvolvidas nos capítulo 3, 4, 5 e 6 do presente trabalho.

#### 2.1 Configuração dos reatores

Para o desenvolvimento da pesquisa descrita nos capítulos 3, 4, 5 e 6, foram utilizados dois reatores de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR), com volume útil de

aproximadamente 2 L para o reator 1 (R1) (Figura 2. 2) e aproximadamente 2,5 L para o reator 2 (R2) (Figura 2. 3), mantidos à temperatura de 30 °C e tempo de detenção hidráulica que variou ao longo das fases.

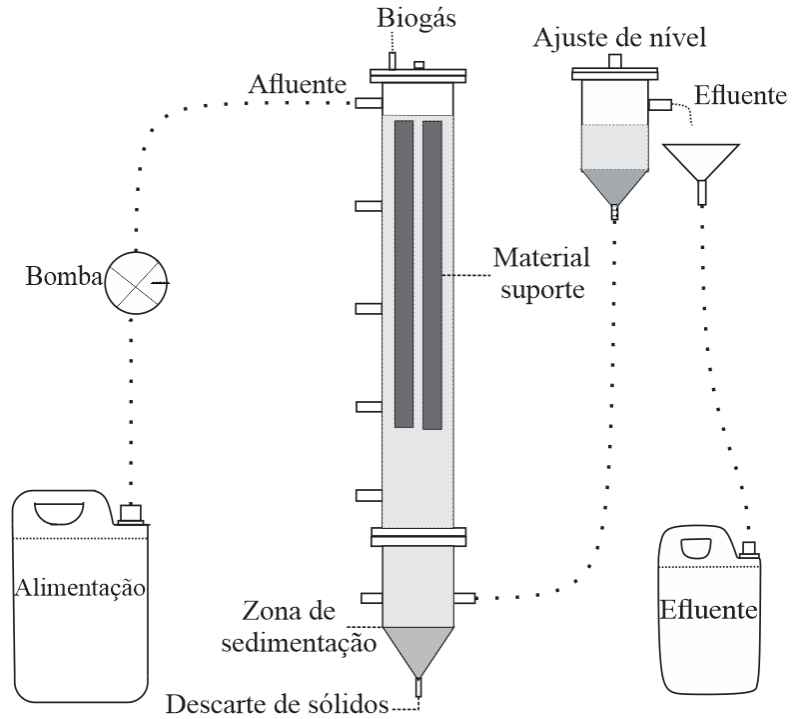


Figura 2. 2- Configuração do reator DSFBR R1 utilizado nos capítulos 3 e 5.

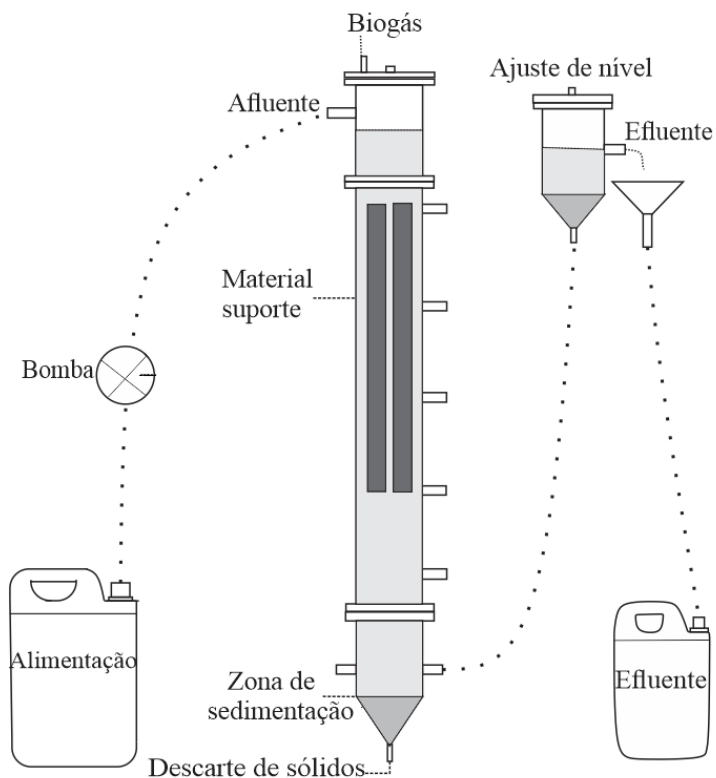


Figura 2. 3- Configuração do reator DSFBR R2 utilizado nos capítulos 4 e 6.

O material suporte utilizado em ambos os reatores consistiu de cilindros de polietileno de baixa densidade com 30 mm de comprimento e 25 mm de diâmetro cada (Figura 2. 4), dispostas em quatro hastes na coluna central, cada.



Figura 2. 4- Material suporte inoculado.

## 2.2 Análises físico-químicas

As análises de DQO, sulfeto, sulfato, pH, ácido voláteis totais e alcalinidade foram realizadas em média 2 a 3 vezes por semana. Amostras de sólidos para análises de sólidos totais (ST), suspensos (SS), fixos (SF) e voláteis (SV) foram estocadas para posterior análise. Alíquotas de 10 mL e 100 mL do efluente foram coletadas regularmente para determinação de ácidos orgânicos e metais. A Tabela 2.1 apresenta as metodologias aplicadas em cada análise.

Tabela 2.1- Metodologias utilizadas nas determinações analíticas.

Análise	Metodologia	Referência
pH	Potenciométrico (eletrodo de pH)	APHA et al. (2012)
Alcalinidade	Titulométrico	Ripley et al. (1986)
Ácidos voláteis totais-AVT	Titulométrico	Dilallo e Albertison (1961)
DQO	Colorimétrico	APHA et al. (2012)
Sulfeto	Azul de metileno	APHA et al. (2012)
Sulfato	Turbidimétrico	APHA et al. (2012)
Sólidos	Gravimétrico	APHA et al. (2012)
Ácidos orgânicos	Cromatografia gasosa	Adorno et al. (2014)
Determinação de metais	ICP-OES	Harper e Oliveira (2006)

Os balanços de massa de DQO e sulfeto foram calculados de acordo com a metodologia proposta por Poinapen et al. (1995). De forma a evitar a perda do sulfeto dissolvido, os autores verificaram que a adição de 3 gotas de NaOH 10M à amostra altera a forma do  $H_2S$  para  $HS^-$  e  $S^{2-}$  e dessa forma o sulfeto encontra-se na forma dissociada, evitando perdas por volatilização do mesmo (Poinapen et al., 2009). Após a adição de NaOH à amostra efluente, as análises de DQO e sulfeto seguiram os métodos descritos pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA et al. (2012). Para a análise de DQO foram realizadas três frações distintas do efluente: a DQO solúvel total ( $DQO_{dissolvida}$ ), a DQO devida ao sulfeto dissolvido ( $DQO_{sulfeto}$ ) e DQO devida a matéria orgânica dissolvida ( $DQO_{orgânica}$ ). Para a determinação da  $DQO_{orgânica}$  foi adicionada sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) em excesso, que precipita o sulfeto líquido na forma de sulfeto de zinco ( $ZnS$ ). A diferença entre a  $DQO_{dissolvida}$  e  $DQO_{orgânica}$  corresponde à fração de  $DQO_{sulfeto}$  (Poinapen et al., 2009).

A concentração de sulfeto total dissolvido (STD) foi calculado de acordo com Aquino (2006).

A especiação de formas de sulfeto ( $H_2S$  e  $HS^-$ ) e a alcalinidade devida a sulfeto e a bicarbonato no efluente do DFSBR foram estimadas aplicando-se os cálculos apresentados por Godoi et al. (2017a).

O fluxo de elétrons demandados para os dois principais metabolismos no biorreator (vias sulfetogênicas e metanogênicas) foi estimado pela aplicação das equações relatadas por Godoi et al. (2015).

## 2.3 Identificação e caracterização da comunidade microbiana

A identificação da comunidade microbiana foi realizada utilizando a técnica de sequenciamento *Mi seq-Illumina*.

### 2.3.1 Extração e purificação de DNA

Para a extração e purificação de DNA dos microrganismos presentes nas amostras dos capítulos 3, 4, 5 e 6 foi utilizado o kit da Wizard® Genomic, DNA Purification Kit, Promega®. A confirmação da extração de DNA foi verificada com corrida eletroforética no sistema DIGEL® em gel de agarose 1,0% e TEB 0,5 X com marcador de peso molecular 1kb (Promega).

### 2.3.2 Amplificação do RNAr 16S pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA total extraído proveniente das amostras foi utilizado para a amplificação, por meio da técnica de PCR, da região variável V4 do gene RNAr 16S do domínio Bactéria e do Domínio *Archaea*, utilizando os seguintes pares de *primers* específicos: *primers* 515F-806R, para Bactéria, e *primers* 341F-785R para *Archaea*. Foi utilizado o Kit *HotStarTaq Plus Master Mix* (Qiagen, USA) com as seguintes etapas: desnaturação (94°C por 3 minutos), seguido de 30-35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e a etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Após amplificação, a confirmação dos produtos de PCR e a intensidade relativa das bandas foram verificadas com gel de agarose 2 %. Os produtos de PCR foram purificados com AMPure XP Beads e utilizados para preparar a biblioteca Illumina DNA.

### 2.3.3 Sequenciamento para análise metagenômica

A fim de melhor caracterizar a estrutura da comunidade microbiana presente no inóculo e nos reatores, amostras das condições de maior interesse foram submetidas ao sequenciamento de última geração (*Next-generation sequencing* - NGS), utilizando a plataforma *MiSeq* da *Illumina* da empresa MR DNA. Os dados sequenciados foram processados utilizando o *pipeline* de análise utilizado por MR DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), Shallowater, TX, USA).

### 2.3.4 Índices de diversidade e riqueza das bibliotecas gênicas

Os índices de diversidade: Shannon ( $H'$ ), Simpson (1-D); e índices de riqueza Margalef ( $D_{Mg}$ ) e Chao1 dos resultados do sequenciamento foram calculados utilizando o *software* PAST (*Paleontological Statistic Software*) (Tabela 2.2). O índice de diversidade Shannon ( $H'$ ) leva em consideração a riqueza e a equitabilidade, que leva em conta tanto o número de táxons, quanto o número de indivíduos. O índice de Simpson (1-D), mede a “equitabilidade” da comunidade e está relacionado à dominância de uma espécie e não à heterogeneidade (Álvarez et al., 2006). O índice de Chao1 estima a riqueza total de espécies a partir da abundância (Dias, 2004).

Tabela 2.2- Índices de Diversidade e Riqueza

<b>Índice</b>	<b>Fórmula de Cálculo</b>	<b>Siglas</b>
Shannon ( $H'$ )	$H' = -\sum p_i \ln p_i$	$p_i$ : frequência relativa (n/total)
Simpson (1-D)	$D = \sum p_i^2$	$p_i = n_i/N$
Margalef ( $D_{Mg}$ )	$D_{Mg} = (S-1)/ \ln N$	S: n° de sequências diferentes (grupos) N: n° total de sequências



## Capítulo 3

### Tratamento biológico anaeróbico da drenagem ácida de mina utilizando a vinhaça da cana-de-açúcar como doador de elétrons e nutrientes

#### RESUMO

O reator anaeróbico de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR) foi utilizado com o objetivo de reduzir o sulfato e remover metais (Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) de uma drenagem ácida de mina sintética (DAM) utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar como fonte de carbono e elétrons para os microrganismos. O reator foi operado em modo contínuo durante 240 dias com tempo de detenção hidráulica (HRT) de  $19 \pm 2$  h. O pH afluente variou entre 4,7 e 5,4. O DFSBR alcançou eficiências médias de remoção de sulfato de 55 a 91% e DQO variando de 42 a 65%. A remoção de Co e Ni foi superior a 80%, enquanto Fe, Zn, Cu e Mn foram removidos com eficiências médias de 70, 80, 73 e 60%, respectivamente. Os gêneros *Parabacteroides*, *Sulfurovum*, *Bacteroides*, *Geobacter* e *Clostridium* foram os mais abundantes. BRS representaram 25 % da população microbiana. O sintrofismo estabelecido com grupos de bactérias fermentativas pareceu ser responsável pela eficiência do sistema. A utilização de uma água residuária orgânica de alta complexidade induziu o estabelecimento de um consórcio microbiano diverso, no qual bactérias fermentativas desempenharam um importante papel em simbiose com organismos redutores de sulfato. No entanto, o residual de acetato e de vinhaça não oxidada no efluente constitui a necessidade de pós-tratamento.

#### 3.1 Introdução

Este estudo traz informações relevantes sobre o tratamento biológico de um grave problema global, a DAM, utilizando um efluente complexo e abundante da agroindústria como doador de elétrons e fonte de nutrientes. A elevada quantidade de metais da DAM e compostos complexos da vinhaça, bem como o pH moderadamente ácido dessas águas residuárias representam um desafio na atividade microbiana. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de redução de sulfato e precipitação dos metais Co, Cu, Mn, Fe, Ni e Zn presentes na DAM utilizando vinhaça de cana-de-açúcar em pH moderadamente ácido e identificar a comunidade microbiana selecionada e adaptada após 230 dias de operação do biorreator.

### 3.2 Material e métodos

A configuração do reator utilizado está descrita na seção 2.1 (**Configuração do reator**) e refere-se ao reator R1.

A partida do reator foi realizada pela introdução da DAM sintética, excluindo-se os metais, com o estabelecimento da remoção da matéria orgânica via metanogênese e sulfetogênese. A vinhaça da cana-de-açúcar concentrada, proveniente da Usina Rio Pardo (Cerqueira César, SP) foi utilizada como doador de elétrons e suas principais características estão descritas na Tabela 3.1. O volume da vinhaça concentrada foi diluído ao meio afluente a partir do volume estimado, de acordo com a concentração de matéria orgânica especificada em cada fase.

Tabela 3.1- Composição da vinhaça real concentrada utilizada como doador de elétrons

<b>Constituintes</b>	<b>Concentrações</b>
pH	4,5 - 5,0
DQO bruta (g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	120
Ácidos voláteis totais (g CH <sub>3</sub> COOH L <sup>-1</sup> )	9,5
Sulfato (g SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> )	25,2
Nitrogênio Total (g NTK L <sup>-1</sup> )	3,1
Fósforo (g PO <sub>4</sub> <sup>3+</sup> L <sup>-1</sup> )	0,860
Potássio (g K L <sup>-1</sup> )	4,0
Cálcio (g Ca L <sup>-1</sup> )	2,2
Sódio (g Na L <sup>-1</sup> )	6,0
Magnésio (g Mg L <sup>-1</sup> )	0,920
Sólidos totais (g L <sup>-1</sup> )	103
Sólidos totais voláteis (g L <sup>-1</sup> )	71

Fonte: Godoi (2018)

O inóculo utilizado proveio do reator DFSBR (Godoi et al., 2017b), tratando previamente DAM sintética rica em ferro e vinhaça. A adição de metais ocorreu nas primeiras semanas de operação, com aumento gradativo da carga de metais durante 7 dias. Após o colapso do reator, observado no 15º dia de operação, um procedimento de repartida foi adotado, consistindo na diminuição da vazão afluente e introdução de recirculação no sistema. O reator

foi mantido em recirculação em sistema fechado por 8 dias para reativação da biomassa e a partir de então foi mantido sob alimentação contínua, quando foi dado início às fases operacionais descritas no item 3.2.2.

### 3.2.1 Água residuária

Para o estabelecimento da sulfetogênese, foi utilizada uma água residuária rica em sulfato, a partir da adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . A matéria orgânica da vinhaça concentrada foi adicionada como doador de elétrons, com diferentes concentrações ao longo das fases operacionais, conforme discriminado na Tabela 3.2. A partir da Fase IV passou-se a adicionar HCl para controlar o pH afluente mantido próximo a 4,8.

A composição da DAM sintética utilizada está apresentada na Tabela 3.3. A introdução dos metais que compõem a DAM (Fe, Cu, Co, Mn, Zn, Ni) foi realizada ao longo do período operacional. A adição dos metais ocorreu de forma gradativa, de forma a não provocar um choque de toxicidade para a população microbiana presente.

Tabela 3.2- Concentração dos analitos adicionados na DAM sintética em  $\text{mg L}^{-1}$  do elemento.

Analitos	Fases operacionais		
	IV	V	VI
<b>Mn</b>	4,3 ± 1,8	20 ± 4	25 ± 10
<b>Cu</b>	2,1 ± 0,3	4 ± 1	11 ± 2
<b>Fe</b>	16,3 ± 3	54 ± 16	218 ± 89
<b>Co</b>	3,2 ± 0,2	6 ± 1	14 ± 2
<b>Ni</b>	3,9 ± 0,3	8 ± 1	17 ± 1
<b>Zn</b>	9,4 ± 1,3	17 ± 3	30 ± 4

Amostras do material precipitado e acumulado no fundo do reator foram coletadas nos dias 138, 142, 155, 158, 163, 170, 175 e 183 de operação e submetidas à análise para determinação de metais por ICP-OES.

### 3.2.2 Fases operacionais

A partida do reator DFSBR foi realizada com o material suporte inoculado e com água residuária rica em sulfato (DQO:sulfato = 1,6, carga orgânica volumétrica (COV) de  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

<sup>1</sup> e carga de sulfato volumétrica (CSV) 3,4 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). O reator DFSBR foi operado em 6 fases, com os principais parâmetros operacionais apresentados nas Tabela 3.2. Durante a Fase I foram mantidas as concentrações de DQO e sulfato semelhantes às condições operacionais estudadas por Godoi et al. (2017b) com o objetivo de reativar a biomassa microbiana adaptada às cargas descritas. Nas Fases II e III objetivou-se aumentar a pressão de seleção da população sulfetogênica pela redução da carga de matéria orgânica. Por fim, da Fase IV a Fase VI avaliou-se a influência dos metais simulando a DAM para o tratamento biológico.

Tabela 3.3- Parâmetros operacionais de R1, utilizando vinhaça como doador de elétrons

Parâmetros	Fases operacionais					
	I	II	III	IV	V	VI
DQO filtrada (g L <sup>-1</sup> )	4,2±0,7	3,1±0,2	1,3±0,08	1,5±0,2	1,9±0,2	1,5±0,1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (g L <sup>-1</sup> )	2,7±0,5	2,7±0,3	1,2±0,3	1,3±0,2	1,6±0,2	1,7±0,2
COV (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	5,2±1	4,1±0,5	1,8±0,2	2,2±0,6	2,6±0,2	1,8±0,2
CSV (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	3,4±0,7	3,4±0,7	1,5±0,4	1,8±0,5	2,1±0,3	2,2±0,3
DQO:sulfato	1,6±0,3	1,2±0,2	1,2±0,3	1,2±0,2	1,3±0,3	0,9±0,1
pH afluente	4,7±0,1	4,9±0,2	5,4±0,1	5,0±0,3	4,6±0,5	4,8±0,1
Período operacional	1-51	52-91	92-115	116-155	156-175	176-237

### 3.2.3 Análise da diversidade microbiana

A análise da diversidade microbiana foi determinada a partir da amostra de biomassa retirada do material suporte do reator DFSBR, correspondente ao dia 231 de operação (Fase VI), submetida à extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene RNAr 16S, de acordo com a metodologia descrita na seção 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3, respectivamente.

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Remoção de DQO, sulfato e produção de sulfeto

A Figura 3. 1 apresenta o comportamento do reator durante as fases operacionais. A remoção do conteúdo orgânico da vinhaça, medido em DQO, foi de 42 ± 10 % nas Fases I e II, superior a 60 % nas Fases III, IV e V e 56 ± 9 % na Fase VI. Nas Fases I e II houve maior

instabilidade do reator, indicada pela maior dispersão dos dados (Figura 3.1). Após diminuição do aporte de matéria orgânica nas fases seguintes o reator apresentou melhora em performance, alcançando remoção de DQO superior a 70% nos dias 105, 110 e 154.

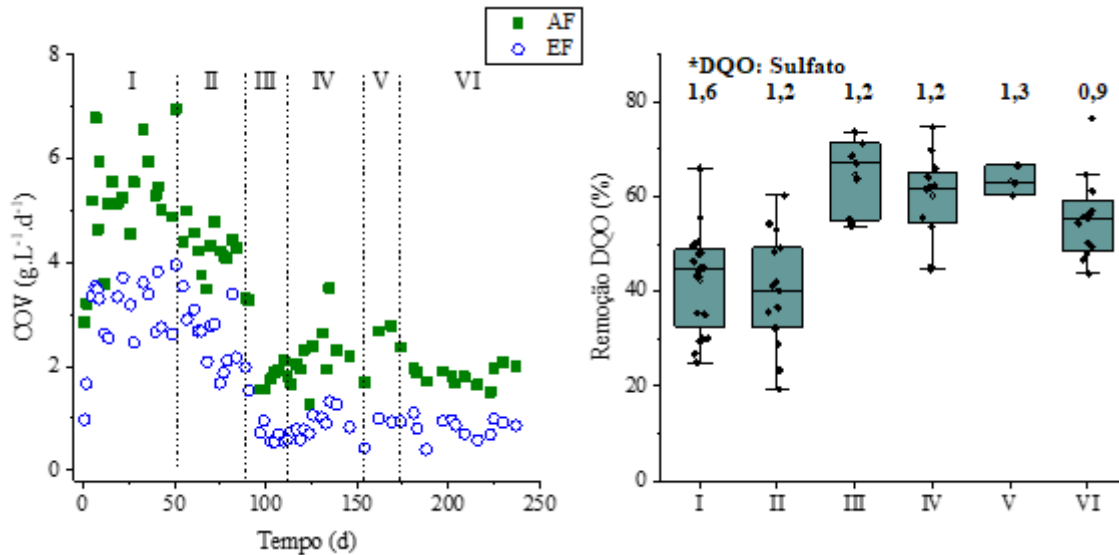


Figura 3. 1- Cargas afluentes (■) e efluentes (○) medidas como DQO e Boxplot da eficiência de remoção de DQO nas 6 fases operacionais.

Os dados observados permitem inferir que a diminuição no aporte de sulfato e vinhaça no sistema possibilitou melhor desempenho do mesmo com relação à remoção de DQO ao longo das Fases III e IV. A introdução de metais a partir da Fase IV por sua vez, não causou alteração na remoção de matéria orgânica.

A redução do sulfato foi de 75 % ( $2,4 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e 76 % ( $2,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) nas Fases I e II, respectivamente. Na Fase III houve a diminuição da carga de sulfato e a adição de metais da Fase IV em diante. A variação na carga aplicada de sulfato não influenciou a eficiência do reator na Fase III ( $91 \pm 6 \%$ ) com relação ao  $\text{SO}_4^{2-}$ , indicando o estabelecimento adequado das BRS. No entanto, a sulfetogênese decaiu após 15 dias da adição de metais na Fase IV, de forma que a remoção de  $\text{SO}_4^{2-}$  foi de  $83 \pm 15 \%$ , chegando a 57 % no último dia dessa fase (Figura 3. 2). Nas Fases V e VI, observou-se que a redução do sulfato variou de  $55 \pm 9$  para  $63 \pm 11\%$ .

Ao longo do procedimento operacional, após a adição dos metais na Fase IV, o reator atingiu estabilidade nas Fases V e VI, com menor dispersão dos valores de remoção de DQO,

demonstrando a adaptação dos microrganismos. A Tabela 3.4 sintetiza a carga de DQO e sulfato médio removida em cada fase.

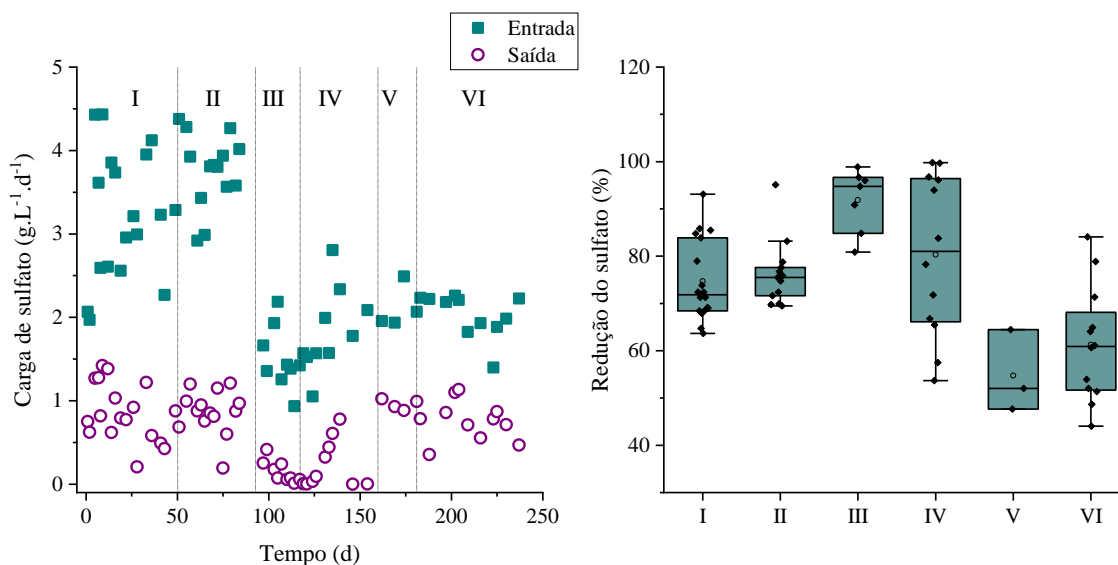


Figura 3. 2- Cargas afluentes (■), efluentes (○) de sulfato e análise boxplot correspondente à eficiência de remoção de sulfato nas 6 fases operacionais.

Tabela 3.4- Cargas removidas em cada fase

Fases	I	II	III	IV	V	VI
Carga removida (g DQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$2,6 \pm 1$	$1,7 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
Carga removida (g $\text{SO}_4 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$2,4 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,3$

O residual de matéria orgânica (DQO), observado no efluente do reator, pode estar relacionado à ausência do sintrofismo entre as bactérias redutoras de sulfato oxidadoras incompletas e completas, bem como o estabelecimento parcial da metanogênese acetoclástica devido às concentrações de ácido acético e sulfeto no sistema não serem ideais para as arqueas. De fato, acima da relação DQO:sulfato estequiométrica teórica (0,67), decresce a viabilidade do sulfato como aceptor de elétrons para a remoção de DQO, resultando em oxidação incompleta na ausência de organismos metanogênicos (Lens et al., 1998). Em relações maiores, por outro lado, a participação da metanogênese pode ser estabelecida, desde que condições adequadas à metanogênese sejam mantidas, por exemplo, com concentrações de sulfeto abaixo do limite de toxicidade.

Assim, a redução na relação DQO:sulfato, como efetuada na mudança da Fase V para a Fase VI de  $1,3 \pm 0,3$  para  $0,9 \pm 0,1$  deve ter sido responsável pela queda na eficiência de

remoção de DQO, pela restrição da atividade metanogênica no sistema (Tabela 3.5). Considerando que as BRS oxidadoras completas ou oxidadoras de acetato são de difícil obtenção (Cao et al., 2012; Nancuqueo; Johnson, 2014), a DQO remanescente no efluente pode estar relacionada com o acúmulo desse intermediário.

Tabela 3. 5- Remoção da matéria orgânica via sulfetogênese.

Fase	Remoção DQO via sulfetogênese (%)
I	58 ± 19
II	85 ± 15
III	84 ± 21
IV	72 ± 15
V	50 ± 22
VI	81 ± 14

Não foi verificada, no presente trabalho, influência nas eficiências de remoção de DQO e na redução do sulfato com a diminuição da relação DQO:sulfato de 1,6 da Fase I para 1,2 na Fase II. No entanto, Lu et al. (2016) observaram resultados diferentes com relação à redução de sulfato, embora não tenham verificado nenhuma influência na remoção da matéria orgânica.

Lu et al. (2016) verificaram que a mudança da relação DQO:sulfato de 2 para 1 resultou na queda da eficiência de remoção de sulfato de  $82,6 \pm 6,4\%$  para  $21,2\%$  e posteriormente com a relação de 0,5 a redução do sulfato caiu ainda mais para  $15,0 \pm 7,6\%$ . A queda na eficiência foi associada ao tempo de exposição ao sulfeto que em concentrações da ordem de  $68,2 \pm 21,6 \text{ mg L}^{-1}$  interferiram negativamente no metabolismo tanto das arqueas metanogênicas quanto das BRS, e também à precipitação e acúmulo de sulfetos metálicos nos grânulos (Lu et al., 2016).

Hu et al. (2015) pesquisaram a influência da relação DQO:sulfato para as atividades metanogênicas e sulfetogênicas variando a relação de 20 para 10, 5, 3, 1 e 0,5. As concentrações de sulfato variaram de 150 a 6000  $\text{mg L}^{-1}$  e constataram que o aumento do sulfato teve pouca influência na remoção de DQO, que se manteve superior a 79%. Já a redução do sulfato foi afetada pela diminuição da relação de 5 para 3, 1 e 0,5 de ~ 90% (DQO:sulfato=5), para em torno de 60, 30 e 20%, respectivamente, à medida que a disponibilidade de matéria orgânica foi

suprimida. Nesse caso, a metanogênese se mostrou a via predominante em todas as relações DQO:sulfato aplicadas.

A variação da relação DQO:sulfato de 1,3 (Fase V) para 0,9 (Fase IV) provocou uma melhora na redução de sulfato de 55 para 63 %, mas a conversão de DQO diminuiu de 63 para 56%. Jeong et al. (2009) também verificaram menor remoção de DQO com a diminuição da relação DQO:sulfato. O que também foi verificado por Bertolino et al. (2014) operando um reator de leito fluidificado, constatando menor eficiência de remoção de DQO e sulfato ao diminuir a relação DQO:sulfato de 2,52 para 1,78 devido à população de BRS oxidadoras incompletas e ao acúmulo de acetato no reator.

Devido ao tempo de adaptação da biomassa à relação DQO:sulfato próxima da estequiométrica, no trabalho de Cunha et al. (2019) a diminuição da relação de 1 para 0,8 e 0,67, constataram resultados diferentes ao do presente trabalho em que, a variação da eficiência de redução do sulfato diminuiu de  $79 \pm 11$  para  $73 \pm 5$  e  $71 \pm 5\%$ , respectivamente e houve incremento na eficiência de remoção de DQO de  $81 \pm 5$  para  $89 \pm 3\%$ . Essa diferença pode ser explicada devido às diferenças entre as comunidades microbianas estabelecidas durante o período operacional e devido à diferença quanto a complexidade do doador de elétrons utilizado no presente estudo.

Na Tabela 3.6 são apresentadas as principais variáveis operacionais dos estudos mencionados.

A queda na eficiência da remoção de DQO constatada na última fase do presente estudo pode estar relacionada à diminuição do pH efluente do reator, prejudicando o metabolismo das arqueas metanogênicas que são mais sensíveis às mudanças de pH (Jeong et al., 2009), bem como a maior pressão de seleção favorável às BRS, cuja participação incrementa a produção de sulfeto.

Embora a redução do sulfato tenha diminuído nas Fases V e VI quando comparadas à Fase IV, as cargas de sulfato reduzida foram semelhantes nessas mesmas fases (Tabela 3.4). A queda na concentração de sulfeto efluente da Fase III para as fases subsequentes está relacionada à adição gradual de metais, devido à precipitação de metais presentes (Deng; Lin, 2017; Falagán et al., 2017b; Hao et al., 2014; Jiménez-Rodríguez et al., 2009; Santos; Johnson, 2017). A diferença do sulfeto calculado teoricamente à partir do sulfato reduzido, para o sulfeto total determinado analiticamente na Fase VI, corrobora os resultados relacionado à precipitação dos sulfetos metálicos.

No entanto, houve de fato a diminuição da sulfetogênese (Tabela 3.5), que pode estar relacionada à inibição das BRS devida à introdução de metais em solução (Utgikar et al., 2003).



Como a configuração do reator é de fluxo descendente, pode ter ocorrido a deposição dos metais precipitados como sulfetos metálicos (FeS, CuS, ZnS e NiS) na comunidade microbiana e influenciado no metabolismo das BRS.

Tabela 3. 6- Principais variáveis operacionais dos estudos relatados na literatura.

Referência	Configuração do reator	Fonte de carbono	pH afluente	DQO: sulfato	COV (g COD L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	COD (mg L <sup>-1</sup> )	Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	Remoção de DQO (%)	Redução de sulfato (%)
Cunha et al., 2019	UASB	Etanol	4,0	1		1500	1500	81 ± 5	79,0 ± 11,0
				0,80	-	1200	1500	87 ± 4	73,0 ± 5,0
				0,67		1000	1500	89 ± 3	71,0 ± 5,0
Lu et al., 2016	UASB	Amido	~ 7,0	10	1,0 - 4,0	830 ± 88		70,9 - 94,8	58,8 - 89,7
				5	4,0	929 ± 97		77,5 ± 10,2	82,6 ± 6,4
				3	4,0	1052 ± 97		83,3 ± 8,9	
				2	4,0	976 ± 109	-	84,0 ± 11,6	47,1- 95,3
				1	4,0	920 ± 112		83,0 ± 12,5	21,2
				0,5	4,0	992 ± 129		86,6 ± 12,4	15,0 ± 7,6
Hu et al., 2015	UASB	Acetato e etanol	~ 7,0	20			150	89,1	95,6
				10			300	87,0	97,8
				5	12,0	3000	600	86,1	92,3
				3			1000	85,4	64,5
				1			3000	82,7	25,1
				0,5			6000	79,2	14,7
Zeng et al., 2019	Bateladas sequenciais	Etanol	~ 7,0	2			1000	33,0	99,0
				1	-	2000	2000	51,0	60,0
				0,67			3000	50,0	49,0

Quanto ao sulfeto total determinado analiticamente, houve grande variação ao longo da operação, variando de 150 a 800 mg L<sup>-1</sup>. A concentração média de sulfeto total no efluente foi de 471 mg L<sup>-1</sup> na Fase I; 422 mg L<sup>-1</sup> na Fase II; 334mg L<sup>-1</sup> na Fase III; 320 mg L<sup>-1</sup> na Fase IV; 194 mg L<sup>-1</sup> na Fase V, e; 132 mg L<sup>-1</sup> na Fase VI (Figura 3. 3). A diferença entre o sulfeto calculado teoricamente e o obtido analiticamente deve-se à perda do H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> para a fase gasosa, à produção de compostos de enxofre em estados intermediários de oxidação e à precipitação de sulfetos metálicos, o que foi mais acentuado durante as fases operadas com adição de metais (IV, V e VI).

Ainda não há um consenso quanto à inibição ao crescimento tanto das BRS quanto das arqueas metanogênicas pelo sulfeto em suas diferentes formas na literatura. Os valores variam bastante e são dependentes do tipo de imobilização da biomassa, se biomassa granular ou biomassa aderida (Celis-García et al., 2004), e do pH, uma vez que a especiação do sulfeto está relacionada a esse parâmetro. Em pH 8, grande parte do sulfeto total encontra-se na forma de HS<sup>-</sup>, em pH 6,85, metade do sulfeto dissolvido encontra-se na forma não ionizada (H<sub>2</sub>S), já em pH 6 grande parte está na forma de H<sub>2</sub>S (Okabe et al., 1995; Speece, 1983).

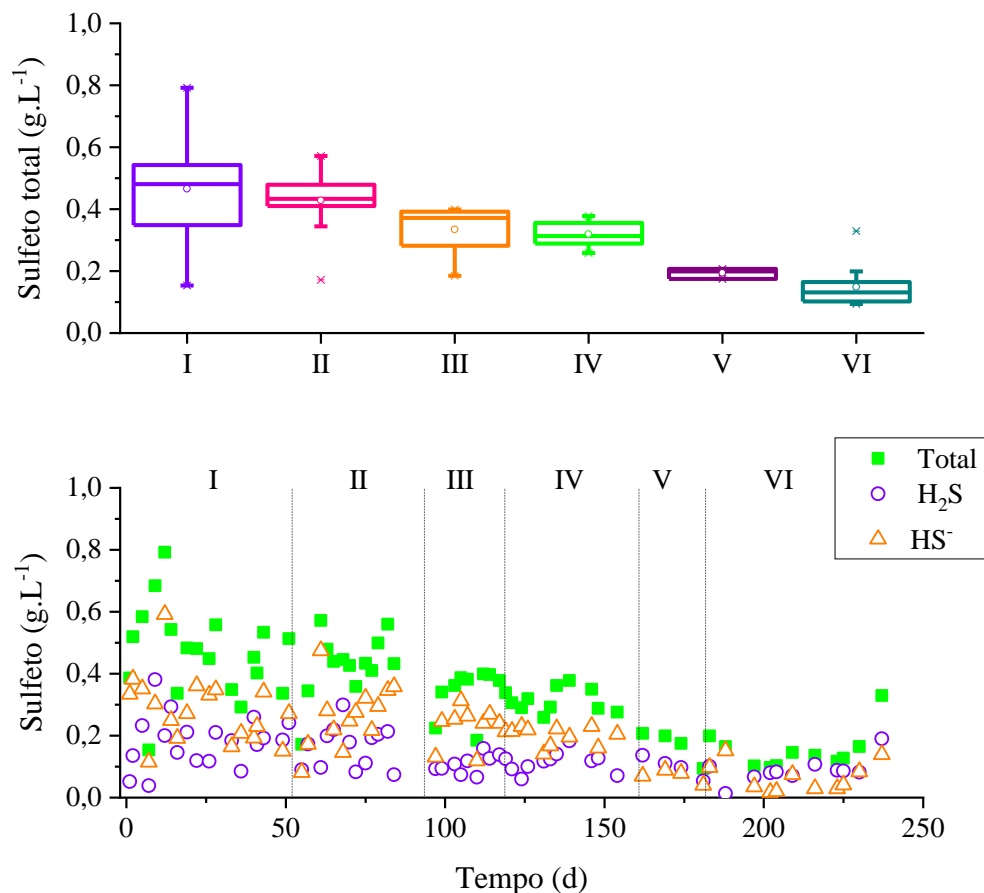


Figura 3. 3- (a) variação da concentração de sulfeto total determinada no efluente do reator durante as fases operacionais; (b) Concentração de sulfeto total (■), sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (○) e ânion bissulfeto como HS<sup>-</sup> (△).

Em pH 5, Lopes et al. (2010), verificaram a toxicidade do sulfeto dissolvido no meio em concentrações superiores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . O'Flaherty e Colleran (1999) só verificaram inibição para as BRS a partir de  $1000 \text{ mg ST-S L}^{-1}$ , quando a concentração do  $\text{H}_2\text{S}$  era aproximada de  $70 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 8.

Em condições neutras, a maior causa de toxicidade e total ou parcial inibição dos microrganismos deve-se principalmente ao sulfeto na forma não ionizada, uma vez que a molécula de  $\text{H}_2\text{S}$  pode penetrar na parede celular, reagindo com pontes de dissulfeto (Gonzalez-Silva et al., 2009; Okabe et al., 1995; Speece, 1983).

Jeong et al. (2009) verificaram a inibição de  $24,57 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$  para as BRS e  $87,99 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$  para as arqueas metanogênicas. Speece (1983) avalia que acima de 100 e  $150 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$  ocorre a inibição, mas destaca que as arqueas metanogênicas necessitam de enxofre para o seu metabolismo em proporções semelhantes ao fósforo. As arqueas metanogênicas toleram concentrações que podem variar de 50 a  $250 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$  (Hu et al., 2015).

Zeng et al. (2019), utilizando reator em bateladas sequenciais (ASBRs), verificaram que a população de arqueas metanogênicas foi suprimida quando a concentração de sulfeto total dissolvido no efluente de três reatores foi de 149, 172 e  $298 \text{ mg L}^{-1}$  cada e pH 7,3 – 7,4.

Dessa forma, a elevada concentração do sulfeto total detectado no efluente, nas Fases I e II não causou total inibição das BRS e metanogênicas, devido à forma do sulfeto que encontrava-se em grande parte na forma de  $\text{HS}^-$ , uma vez que o pH se manteve em  $7,2 \pm 0,3$ . A diminuição das cargas orgânicas e de sulfato na Fase III, com manutenção da relação DQO:sulfato e associada à menor concentração do sulfeto produzido levou à maior estabilidade na sulfetogênese, aumento na eficiência da redução do sulfato.

### 3.3.2 Alcalinidade, pH e ácidos voláteis totais

O uso da vinhaça como o doador de elétrons se mostrou eficiente e a alcalinidade gerada no processo sulfetogênico provocou a elevação do pH efluente.

Quando houve a diminuição do aporte de vinhaça (DQO) na água residuária, o pH afluente se elevou de  $4,7 \pm 0,1$  na Fase I para  $5,3 \pm 0,1$  na Fase III, mantendo-se a operação sem acidificantes ou alcalinizantes, assim como nas fases anteriores (Figura 3. 4).

Ao longo de toda a operação, houve produção de alcalinidade total e alcalinidade a bicarbonato próximo a  $700 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , em média, nas Fases I e II. Mesmo com a diminuição das cargas nas fases seguintes, a alcalinidade a bicarbonato real média do sistema, isto é, desconsiderando-se a parcela de alcalinidade devida ao  $\text{HS}^-$ , foi  $510 \pm 189 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  na

Fase III. Nas Fases IV, V e VI a alcalinidade a bicarbonato foi de  $462 \pm 181$ ,  $415 \pm 32$  e  $388 \pm 174$  mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente.

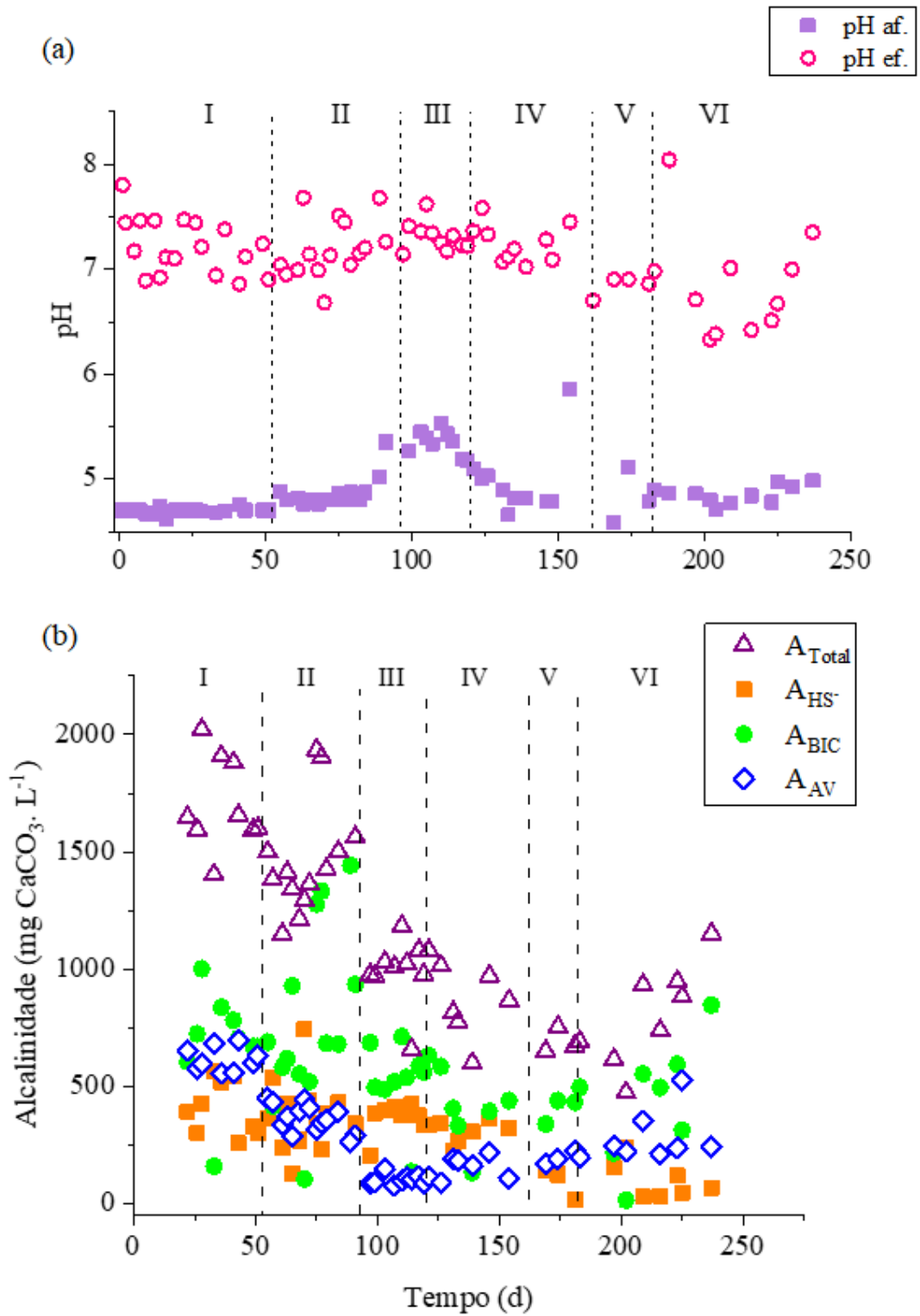


Figura 3. 4- (a) pH afluente (■) e efluente (○); (b) alcalinidade total (Δ) alcalinidade a bicarbonato (●), alcalinidade a HS<sup>-</sup>(■) e alcalinidade a ácidos voláteis (◇).

A alcalinidade resultante do processo biológico elevou o pH afluente de 4,8 para a faixa entre 6,5 a 8,0 no efluente, indicando o potencial do sistema para a neutralização da DAM (Figura 3. 4). A alcalinidade gerada está diretamente relacionada à remoção de sulfato (Reação 1.6). E essa contribuição é representada pela geração do íon bicarbonato devido à geração do sulfeto na forma  $\text{HS}^-$ . De fato a alcalinidade devida ao sulfeto nas Fases I e II correspondeu a 25% da alcalinidade total, aumentando para 35 a 37 % nas Fases III, IV e V, e 15% na Fase VI. O aumento da adição dos metais seguida da sua precipitação na forma de sulfetos metálicos provoca a remoção da parcela de alcalinidade devida a sulfeto, o que foi evidenciado pela menor contribuição da alcalinidade  $\text{A}_{\text{HS}^-}$  na Fase VI.

O pH é um parâmetro importante para o tratamento biológico anaeróbio pois o mesmo influencia de forma significativa no estabelecimento da comunidade microbiana (Lu et al., 2015). A melhor eficiência, observada durante a Fase III, pode estar relacionada tanto à diminuição da carga orgânica e de sulfato quanto ao aumento do pH afluente (devido à diminuição no aporte de vinhaça). Cunha et al. (2019) verificaram que o estabelecimento da sulfetogênese em um reator UASB utilizando etanol como doador de elétrons (Tabela 3.6) e pH afluente em 4, levou cerca de 161 dias para completa adaptação (Cunha et al., 2019). Os autores creditaram o período de tempo demandado para a aclimatação da biomassa à sulfetogênese ao inóculo utilizado caracterizado como biomassa metanogênica.

A concentração efluente de ácidos voláteis totais (AVT) correspondeu a  $1413 \pm 225$  mg  $\text{L}^{-1}$  na Fase I, representando 60% da DQO remanescente no efluente. Na Fase III houve diminuição na concentração efluente de AVT de  $876 \pm 182$  mg AVT  $\text{L}^{-1}$  (Fase II) para  $302 \pm 135$  mg AVT  $\text{L}^{-1}$ , devido à diminuição no aporte de matéria orgânica e, conseqüentemente, menor acúmulo de ácidos no reator.

Nas Fases IV, V e VI a concentração efluente de AVT representou 60, 83, 75 e 76% da concentração efluente de DQO residual, correspondendo a  $526 \pm 141$ ,  $403 \pm 86$ ,  $529 \pm 105$  mg AVT  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. A oxidação incompleta resultante da sulfetogênese no sistema tem como consequência a produção de ácidos voláteis, levando ao acúmulo de acetato nos reatores, uma vez que a comunidade de arqueas metanogênicas acetoclásticas não foi suficiente para metabolizar os ácidos produzidos.

Os resultados dos ácidos orgânicos detectados a partir de análises cromatográficas estão apresentados na Figura 3. 5. A concentração de acetato média em cada fase correspondeu de 30 a 70% da DQO residual média. De fato, o acetato foi o ácido orgânico em maior concentração no efluente, e em algumas fases o metanol também foi detectado em baixas concentrações ( $\sim 40$  mg  $\text{L}^{-1}$ ). Os ácidos butírico e propiônico não foram detectados no efluente,

potencialmente devido a maior afinidade de BRS que metabolizam mais facilmente esses substratos (Lu et al., 2016).

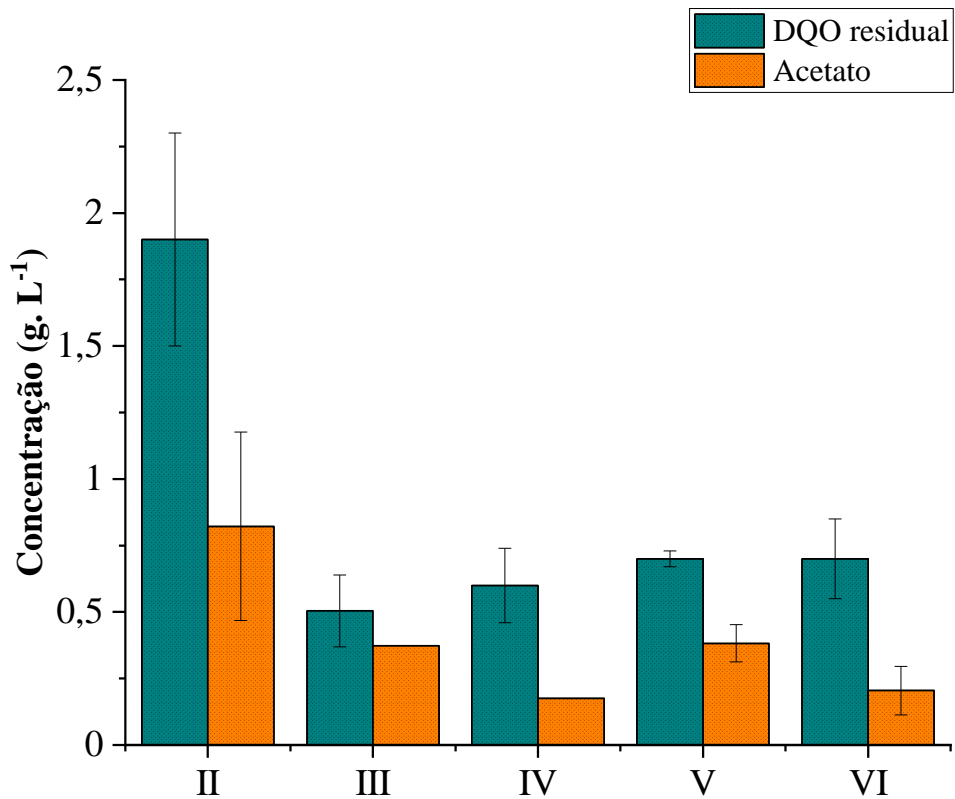


Figura 3. 5- Concentração média de acetato e DQO residual em g L<sup>-1</sup> nas fases operacionais II, III, IV, V e VI.

Godoi et al. (2017b) operando o reator de leito fixo-estruturado e fluxo descendente, sob condições semelhantes de carga orgânica (Fases I e II), porém relação DQO:sulfato de 2,0, verificaram a presença de aproximadamente 200 mg L<sup>-1</sup> de acetato no efluente, correspondendo a quase totalidade da DQO remanescente, devido à presença de BRS oxidadoras incompletas. Ñancuqueo e Johnson (2014) operando reator de biofilme de fluxo ascendente com relação DQO:sulfato de 0,68, concentração de 2 g SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> e glicerol 1,38 g L<sup>-1</sup>, ao final do experimento observaram que aproximadamente 150 mg L<sup>-1</sup> de ácido acético foram acumulados como resultado da oxidação incompleta pelas BRS, uma vez que não foi observada presença das arqueas metanogênicas no reator.

Embora a faixa de pH possibilite a presença das arqueas metanogênicas, verifica-se a predominância da sulfetogênese no reator e possível inibição da metanogênese devido às baixas relações DQO:sulfato aplicadas e à alta concentração de sulfeto produzido. A partir da Tabela 3.5 é possível verificar que o consumo de substrato ocorreu entre 50 a 85 % via sulfetogênese, a depender da fase. Os resultados de biologia molecular corroboram esses resultados e estão

apresentados e discutidos na seção 3.3.4.

Enquanto na Fase I, a participação da sulfetogênese na remoção da matéria orgânica foi cerca de  $58 \pm 19\%$ , durante as Fases II e III essa participação aumentou para  $85 \pm 15\%$ , confirmando o estabelecimento de um consórcio microbiano predominantemente sulfetogênico no sistema, com diminuição da contribuição da metanogênese para a remoção do acetato residual. Na Fase V a participação das BRS foi menor e isso pode estar relacionado ao aumento da carga orgânica com relação à fase anterior.

### *3.3.3 Remoção de metais.*

Foram realizadas análises das amostras afluente, efluentes e amostras de descarte de fundo com relação aos metais envolvidos conforme metodologia apresentada na seção 2.2. A concentração dos analitos afluentes e efluentes está demonstrada na Figura 3. 6. A remoção do cobre ficou em  $86 \pm 6$ ,  $73 \pm 2$  e  $85 \pm 21\%$  nas Fases IV, V e VI, respectivamente. O cobalto teve remoção média de 90% ao longo de todo o período analisado. A maior eficiência de remoção do Fe foi na Fase IV e correspondeu a  $82 \pm 9\%$ , nas fases seguintes houve uma queda na remoção para  $70 \pm 11\%$  na Fase V e  $59 \pm 23\%$  na Fase VI. A maior eficiência para o Mn foi na Fase V com  $79 \pm 8\%$ . Nas Fases IV e VI a remoção média do Mn foi inferior a 60%. O Ni foi removido em  $93 \pm 3$ ,  $87 \pm 2$  e  $93 \pm 4\%$  nas Fases IV, V e VI, respectivamente. A remoção do Zn foi superior aos 80%.



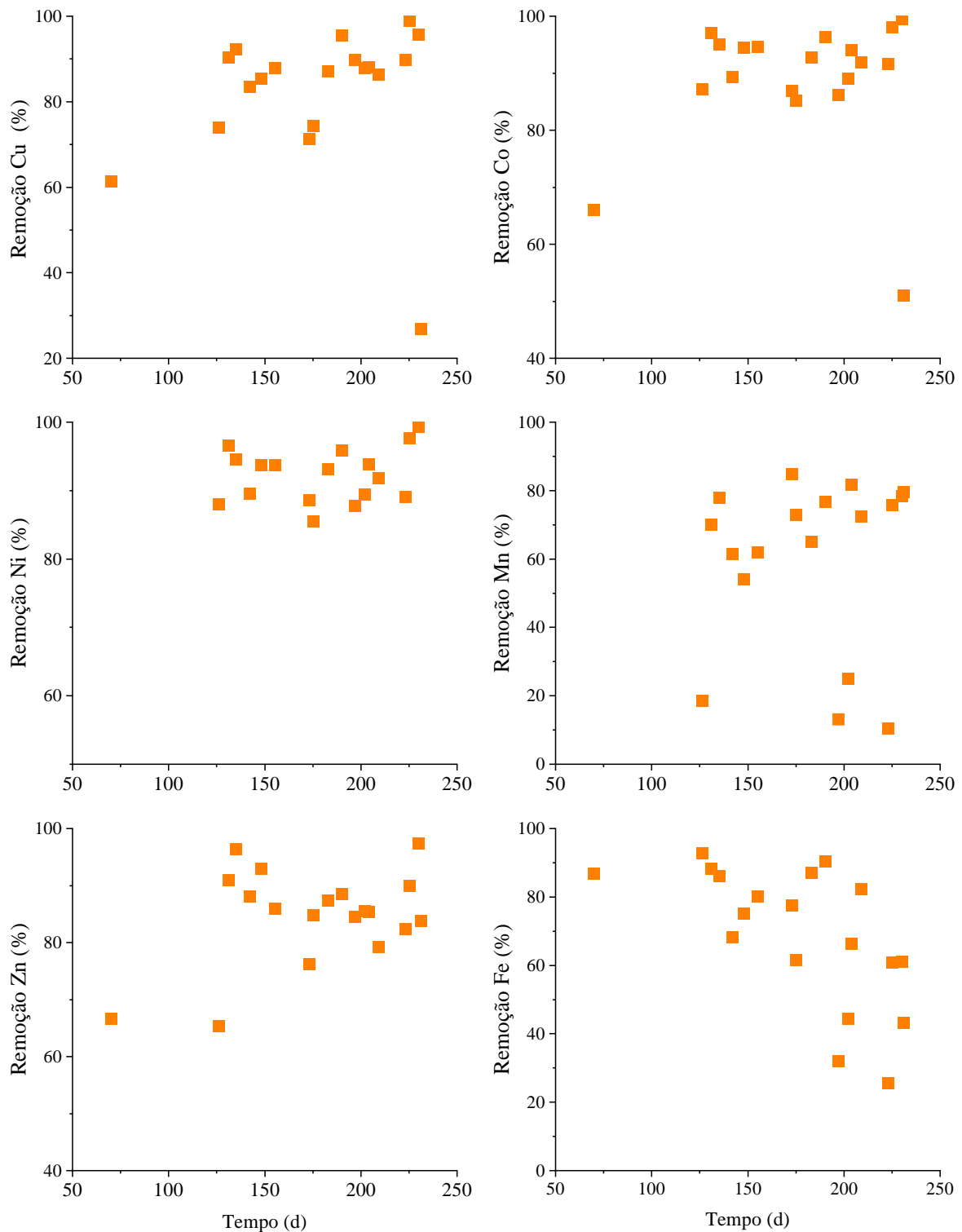


Figura 3. 6- Remoção dos analitos analisados no efluente (■).

As concentrações dos metais adicionados embora elevadas, não resultaram em inibição total da atividade biológica no reator. Isso pode ser em função da sensibilidade variável dos gêneros de BRS e arqueas metanogênicas aos diversos metais testados (Dopson et al., 2003).

A baixa eficiência de remoção do Mn ocorre devido ao produto de solubilidade ( $K_{ps}$ ) do  $MnS$  ser maior que dos outros analitos (Sahinkaya et al., 2011). O Mn é um dos metais mais difíceis de remover devido à complexidade de interação do Mn (Bekmezci et al., 2011). De acordo com Yilmaz et al. (2019) enquanto apenas  $0,001 \text{ mg H}_2\text{S L}^{-1}$  é necessário para começar a precipitação dos analitos Ni, Cu, Fe, Zn e Co em pH 6,5, nessas mesmas condições, para precipitar o Mn seriam necessários  $130,78 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfeto (Considerando  $K_{ps \text{ Mn}} = 1 \cdot 10^{-11}$ ). Os cálculos foram baseados nas equações reportadas por Uçar (2017) e levam em consideração os valores de  $K_{ps}$  de cada analito.

Os resultados obtidos para Fe estão em acordo com o trabalho apresentado no Capítulo 5 em que remoções superiores a 70% foram alcançadas, trabalhando com baixas concentrações ( $\sim 5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Godoi et al. (2017b) estudaram a remoção do Fe em concentrações variando de 50 a  $400 \text{ mg L}^{-1}$  e em todas as fases, a remoção do Fe foi superior a 80%, atingindo  $90 \pm 13 \%$  quando a concentração inicial máxima do analito foi atingida.

Resultados semelhantes foram apresentados por Bekmezci et al. (2011) que obtiveram remoção entre 25 e 77% de Mn ( $5\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e superior a 99% dos metais Cu, Co, Fe, Ni, Zn com concentrações iniciais de 50, 10, 400, 5 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Barbosa et al. (2014) também obtiveram baixa remoção de Mn, em experimento batelada, de apenas 27% quando a concentração inicial era de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Deng e Lin (2013) obtiveram remoção de Fe e Al superior a 99% e Mn entre 75 – 100% utilizando reatores em série e tratamento de dois estágios.

Seo et al. (2017) estudaram a precipitação seletiva do Mn com controle de pH por meio do tratamento físico-químico. A remoção do Mn variou entre 37,8 e 87,5 % em pH 8,5 após adição do peróxido de hidrogênio para oxidação. Os autores verificaram forte dependência da eficiência de remoção de metais em função da variação do pH e da presença ou não de agente oxidante. Na presença do  $\text{H}_2\text{S}$ , a precipitação dos metais Zn, Cu e Pb ocorreu mesmo em pH 3 (Alvarez et al., 2007; Fu; Wang, 2011).

As amostras analisadas a partir do descarte de fundo do reator correspondem aos metais precipitados e presentes no lodo do dia 138, 142, 155, 158, 163, 170, 175 e 183 de operação, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.7 e Figura 3.7. As concentrações de metais detectados nas amostras de lodo acumulados no fundo do reator indicam resultados promissores dessa configuração de reator para a precipitação e recuperação dos metais presentes no afluente.

Tabela 3.7- Concentração dos metais encontrados no lodo acumulado no biorreator.

Analitos (g L <sup>-1</sup> )	Dias de operação							
	138	142	155	158	163	170	175	183
Co	7 ± 1	2,5 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,8 ± 0,5
Cu	5,8 ± 0,9	2,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,3	2,1 ± 0,6
Fe	80 ± 11	32 ± 4	19 ± 5	32 ± 9	41 ± 23	46 ± 8	44 ± 14	38 ± 9
Mn	1,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Ni	8,6 ± 1,4	3,3 ± 0,3	1,4 ± 0,6	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,6	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,5	2,3 ± 0,6
Zn	4,1 ± 0,6	3,0 ± 0,2	3,5 ± 1,0	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,6	3,6 ± 0,5	3,2 ± 0,5	5,9 ± 1,4

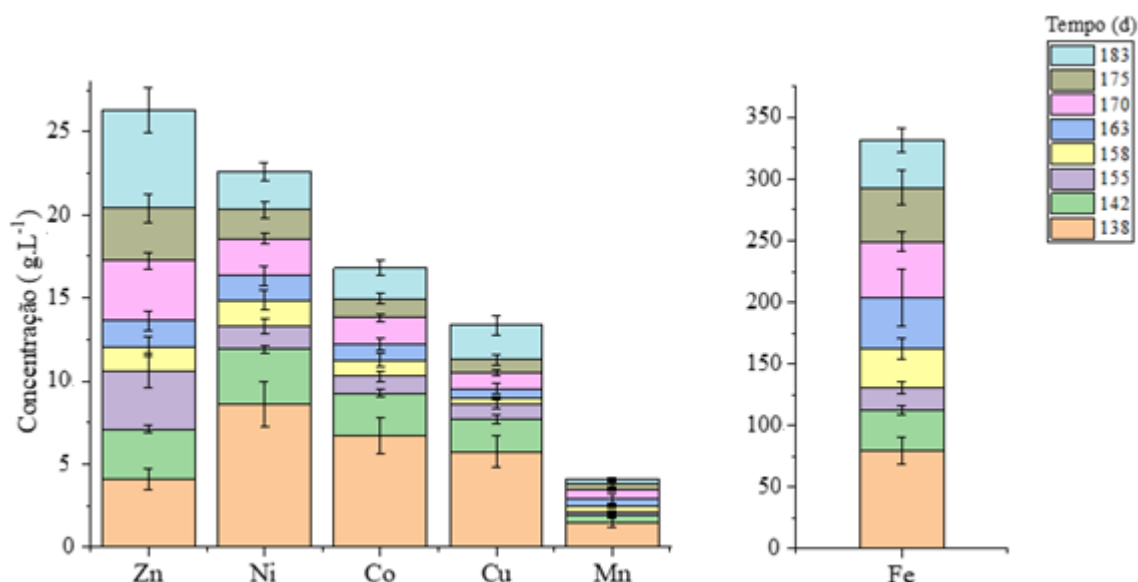


Figura 3. 7- Metais precipitados analisados a partir do descarte de lodo do reator.

Análises gravimétricas de sólidos foram realizadas a partir do lodo precipitado na parte cônica inferior do reator. Na Fase I (dia 19) a concentração de sólidos totais foi  $36,5 \pm 1,8 \text{ g L}^{-1}$  e no dia 48 a concentração foi de apenas  $9,4 \text{ g L}^{-1}$ . Na Fase III o acumulado de sólidos totais correspondeu a apenas  $6,3 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ . Em média  $22 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$  de sólidos totais foram encontrados nas amostras dos dias 118, 127, 135 e 142 (Fase IV). Enquanto a fração de sólidos totais das amostras das Fases V e VI ficaram abaixo de  $20 \text{ g L}^{-1}$ .

A Figura 3. 8 relaciona a concentração de sólidos totais quanto à fração fixa e a volátil. A maior proporção de sólidos totais fixos (SF) ao final da Fase I, 64 % referente ao dia 48, deve-se à elevada concentração de material inorgânico presente na vinhaça (Tabela 3.1) e que

foi acumulando ao longo de 30 dias de operação do reator. A diminuição da COV na Fase III refletiu na proporção de SF acumulados. A maior frequência de retirada de sólidos do fundo do reator na Fase IV demonstram menor acúmulo de SF, representando  $32,5 \pm 4\%$  das amostras. O aumento da fração fixa dos sólidos totais apresentado nas Fases V e VI, correspondendo a 70% e  $56 \pm 11\%$ , respectivamente, foi creditada a maior concentração de metais adicionados no período. Demonstrando a maior proporção de metais precipitados no lodo e diminuição da fração orgânica representado pelos sólidos totais voláteis (SV).

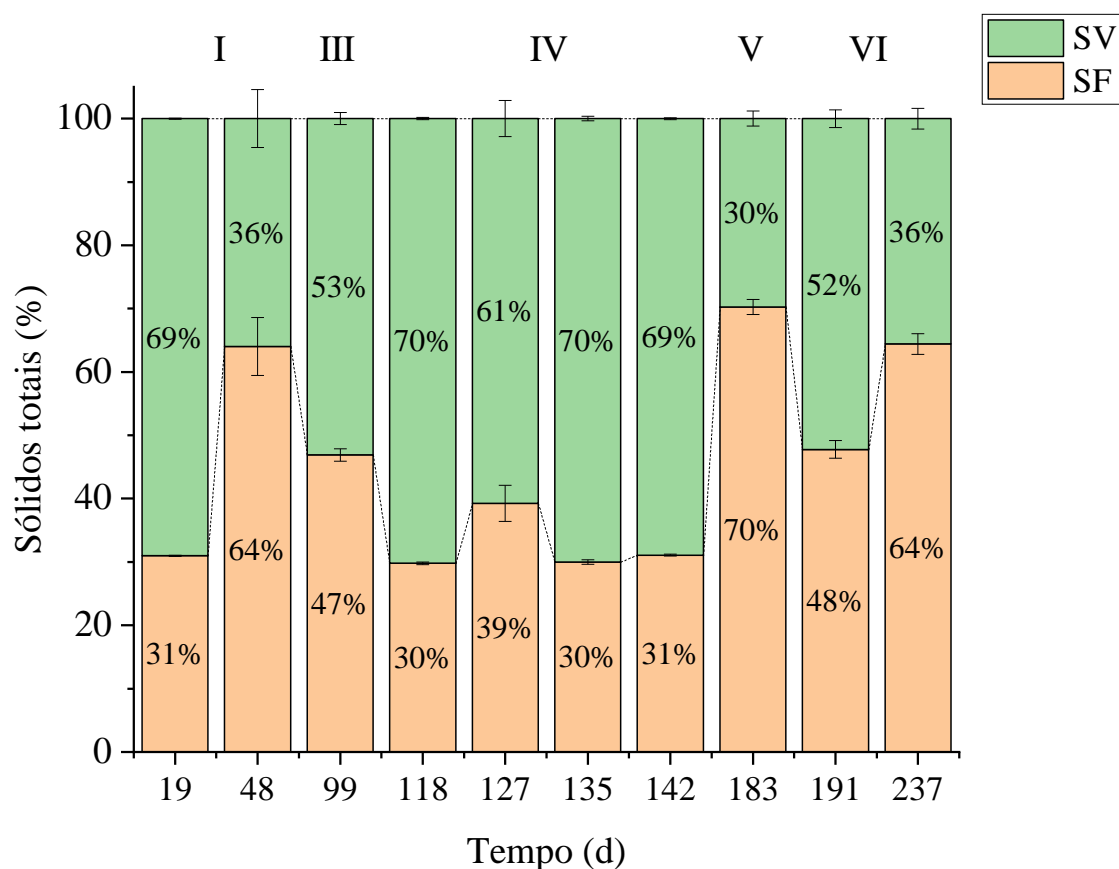


Figura 3. 8- Proporção de sólidos fixos e voláteis correspondente ao lodo descartado regularmente do reator.

### 3.3.4 Análise da diversidade microbiana

A análise de sequenciamento da biomassa aderida ao meio suporte ao final da Fase VI identificou 111.925 *reads*, sendo 111.830 *reads* classificadas em 889 OTUs do Domínio *Bacteria* e 74 *reads* classificadas em 9 OTUs do Domínio *Archaea*. Os índices de diversidade, riqueza, dominância e equitabilidade para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* estão apresentados na Tabela 3.8. Arqueas representam 0,07 % da abundância relativa (AR) da comunidade

microbiana presente aderida ao meio suporte do reator e os índices demonstram a baixa riqueza e diversidade desse Domínio quando comparado ao *Bacteria* (Tabela 3.8).

Tabela 3.8- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* da biomassa aderida ao material suporte ao final da Fase VI do reator DFSBR.

	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
Nº de <i>reads</i> classificadas em OTUs	111830	74
OTUs	889	9
Número de filós	21	2
Número de classes	36	3
Número de famílias	132	5
Número de gêneros	242	5
Índice de diversidade Shannon (H')	3,732	1,231
Índice de Simpson (1-D)	0,927	0,523
Dominância (D)	0,072	0,476
Índice de Margalef	76,39	1,859
Índice de riqueza Chao1	1110	9,25

Os índices de diversidade de Shannon (H') corresponderam a 3,732 e 1,231 para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente. O índice de diversidade Simpson (1-D) foi 0,927 e índice de riqueza Chao1 1110 para *Bacteria*. A utilização de um substrato complexo como a vinhaça da cana-de-açúcar como doador de elétrons pode ter contribuído para a alta diversidade microbiana. De fato, Hiibel et al. (2011) reportaram a influência de substratos simples e complexos utilizados como doadores de elétrons no tratamento de DAM. Notou-se influência na diversidade microbiana, com índice de Shannon oscilando de H'= 1,03 com etanol, para H' = 2,03 utilizando aparas de feno e madeira de pinho, e H'= 2,97 utilizando substratos de aparas de milho e madeira.

Deng e Lin (2013) analisaram amostras retiradas do reator biológico batelada de dois estágios com tratamento combinado de DAM e esgoto sanitário municipal, contendo Fe ( $112 \pm 118 \text{ mg L}^{-1}$ ), Al ( $2,0 \pm 2,2$ ) e Mn ( $6,0 \pm 2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) em solução. A concentração de sulfato presente na DAM foi de  $1846 \pm 594 \text{ mg L}^{-1}$  e o esgoto sanitário foi a única fonte de carbono e nutrientes para o tratamento (DQO= 234 – 333  $\text{mg L}^{-1}$ ). A relação DQO:sulfato variou de 0,6 a 5,4, à medida que a proporção de esgoto municipal e DAM se alterava. O reator foi inoculado com lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade. A mistura dos dois efluentes

(DAM e esgoto sanitário) manteve o pH entre 6,2 a 7,9. A remoção de sulfato e DQO superiores a 80% e de metais acima de 75% indicaram adequada performance do sistema. A amostra do reator com relação DQO:sulfato de 2,0 e pH 7,9 apresentou os maiores índices de diversidade microbiana, entre os reatores estudados, com o índice de Shannon  $H' = 1,68$  e Simpson (1-D) de 0,79 (Deng et al., 2016). Os autores atribuem a maior diversidade devido ao elevado pH do meio (7,9), ao menor potencial redox e à relação DQO:sulfato de 2,0.

Os índices de diversidade  $H' = 1,97$  e Simpson = 0,64 foram reportados por Korzhenkov et al. (2019) ao analisarem o sedimento de DAM de uma mina de cobre desativada de pH 1,9. Esses valores são semelhantes ao reportado por Deng et al. (2016) e indicam elevada diversidade microbiológica para um ambiente extremo em que a temperatura média anual varia de 8 a 18 °C, elevadas concentrações de metais e pH abaixo de 2.

O índice de diversidade de um reator bioquímico, com adição de calcário e pH 8, tratando DAM no início da operação foi  $H' = 7,9 \pm 0,2$ , após 17 semanas de operação foi de  $H' = 8,2 \pm 0,3$  e manteve-se constante ao final da semana 36 (Vasquez et al., 2018).

Godoi (2018) verificou a influência do pH afluente para a diversidade microbiana utilizando reator de mesma configuração (DFSBR), a vinhaça como doador de elétrons, relação DQO:sulfato 2,0 (sendo  $COV = 4,6 - 5,3 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e carga volumétrica de Fe  $0,30 \pm 0,05 \text{ gFe}^{2+} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Os índices oscilaram de  $H'$  4,78 para 4,63 e Chao1 de 1.311 para 1.374 com a diminuição gradativa do pH afluente de 6,3 para 3,5, não verificando mudanças significativas na diversidade e riqueza microbiana.

Por outro lado, Vasquez et al. (2018) verificaram forte influência do pH e do aumento da concentração de sulfato e sulfetos metálicos ao longo do tempo para a diversidade alpha da comunidade microbiana.

Zhang et al. (2019) verificaram que a diversidade microbiana ao longo dos rios Hengshi e Reference e da mina Dabaoshan (cidade de Shaoguan, Província Guangdong, China) aumentou à medida que a poluição e a concentração de metais dissolvidos diminuía. A contribuição de efluente ácido para o rio Hengshi é de 0,01 a  $0,12 \text{ m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$  anualmente. O pH das duas áreas mais contaminadas e mais próximas à área de mineração Dabaoshan foi de 2,68 e 3,19. O índice de diversidade Chao1 ficou abaixo de 1000 na Mina de Dabaoshan e à medida que distanciava-se da zona mais contaminada esse índice aumentava, alcançando  $Chao1 > 2500$ .

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com a literatura, embora com menor índice  $H'$  e Chao1 que os verificados por Vasquez et al. (2018) e Godoi (2018), ainda assim indicam alta diversidade e riqueza da comunidade microbiana, considerando o pH

afluente em torno de 5 ao longo de toda a operação e o tempo de exposição, tanto aos metais solúveis Cu, Co, Ni, Mn, Fe e Zn quanto na forma de sulfetos metálicos.

#### 3.3.4.1 Análise taxonômica da comunidade microbiana

O Domínio *Bacteria* representou 99,91% da abundância relativa total, enquanto *Archaea* representou 0,07 %. Apenas dois filos do Domínio *Archaea* foram identificados, *Euryarchaeota* representando 0,06 % da abundância relativa total e *Crenarchaeota* (0,005 %). O filo *Euryarchaeota* representou 91,9 % da AR do Domínio *Archaea*.

A presença de microrganismos do Domínio *Archaea* em ambientes extremos, de baixo pH como a DAM, foram relatados na literatura, mas sempre em menor proporção que o Domínio *Bacteria* (Korzhenkov et al., 2019). Assim como no presente trabalho, em outros estudos a presença de arqueas foram incipientes. A abundância relativa de arqueas do filo *Euryarchaeota* representou  $0,02 \pm 0,01$  % e *Crenarchaeota*  $0,01 \pm 0,01$  % da AR em reator tratando DAM de pH 3,0 – 3,7 (Vasquez et al., 2018). No entanto, Korzhenkov et al. (2019) verificaram que arqueas do filo *Euryarchaeota* representaram 67 % da comunidade microbiana encontrada no sedimento de DAM de uma mina desativada de cobre e pH 1,9 no norte do País de Gales (*Parys Mountain*).

No presente trabalho, arqueas metanogênicas representaram menos de 0,07 % da abundância relativa total e apenas 5 gêneros foram identificados no Domínio *Archaea*. O gênero com maior abundância foi *Methanobacterium* (87 %), seguido por *Candidatus nitrosocaldus* (8 %), *Methanomicrobium* (3 %) e *Methanosaeta* e *Methanocorpusculum* com 1 % cada (Figura 3. 9).

*Methanobacterium* são arqueas metanogênicas hidrogenotróficas que utilizam o H<sub>2</sub> para produzir metano (Hu et al., 2015). Nos estudos de Hu et al. (2015), *Methanobacterium* sp. foi a segunda espécie mais abundante encontrada nos grânulos do reator UASB trabalhando com relação DQO:sulfato de 0,5. Enquanto o gênero *Methanosaeta* esteve relacionado a maiores relações de DQO:sulfato, correspondendo a 78,3 % do número total de sequências identificadas (Hu et al., 2015).

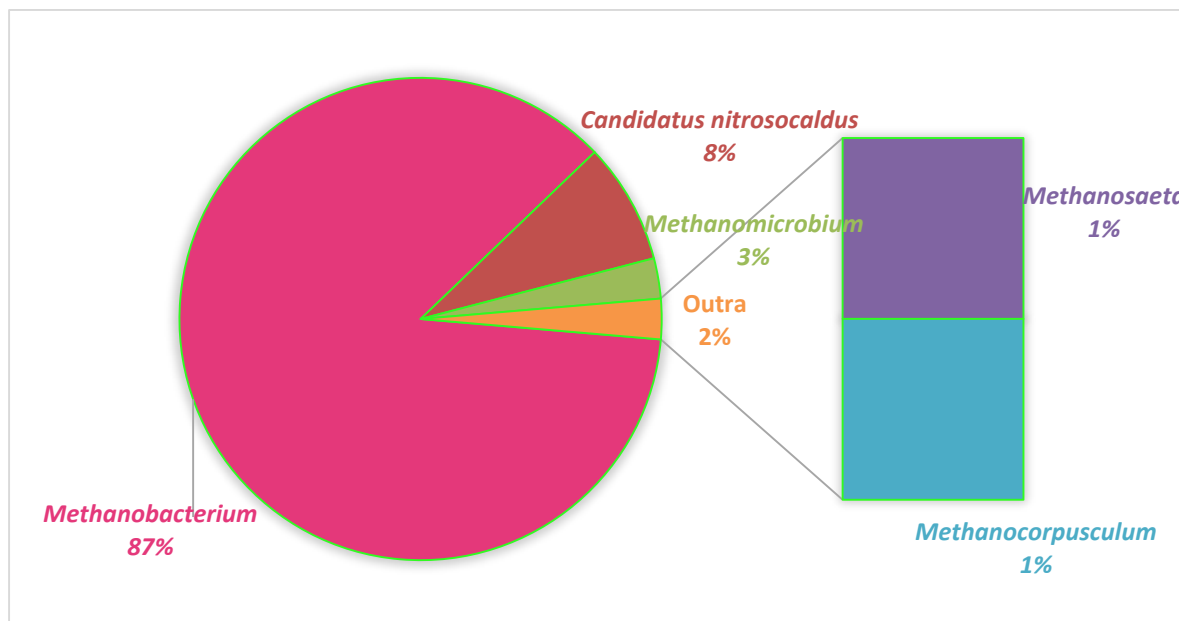


Figura 3. 9- Abundância relativa dos gêneros *Methanobacterium*, *Candidatus nitrosocaldus*, *Methanomicrobium*, *Methanosaeta* e *Methanocorpusculum* do Domínio *Archaea* identificados na biomassa do material suporte ao final da Fase VI.

Zeng et al. (2019) verificaram que concentrações baixas de sulfeto total dissolvido ( $149$  a  $298 \text{ mg L}^{-1}$ ) provocaram a supressão das arqueas metanogênicas. No presente estudo, a concentração dos metais dissolvidos, relação DQO:sulfato  $< 2,0$  e a concentração efluente de sulfeto na forma de  $\text{H}_2\text{S}$  (aproximadamente  $100 \text{ mg H}_2\text{S L}^{-1}$ ) contribuíram para que arqueas metanogênicas representassem apenas  $0,07 \%$  da comunidade microbiana. Esses resultados corroboram com os encontrados por Zeng et al. (2019) e Vasquez et al. (2018).

O predomínio do gênero *Methanobacterium* indicou a ocorrência da metanogênese quase que exclusivamente pela via hidrogenotrófica, o que justifica a elevada concentração de acetato no efluente, superior a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  em todas as fases (Figura 3. 5). Dessa forma, a competição por substrato entre BRS e arqueas foi desconsiderada, uma vez que, o gênero *Methanosaeta* que utiliza o acetato como fonte exclusiva de carbono e energia (Ozuolmez et al., 2015) teve AR inferior  $0,001 \%$ , devendo a baixa abundância de arqueas na biomassa microbiana ser creditada a outros fatores como, elevada concentração de sulfeto dissolvido e à concentração de metais presente na DAM sintética.

Com relação ao Domínio *Bacteria*, o filo com maior representação foi o *Bacteroidetes* representando  $37,4 \%$ , seguido por *Proteobacteria* ( $35,5 \%$ ), *Firmicutes* ( $19,6 \%$ ), *Synergistetes* ( $4,0 \%$ ) e *Tenericutes* ( $1,1 \%$ ). Os outros 16 filós representaram juntos apenas  $2,3 \%$  da AR total (Figura 3. 10).



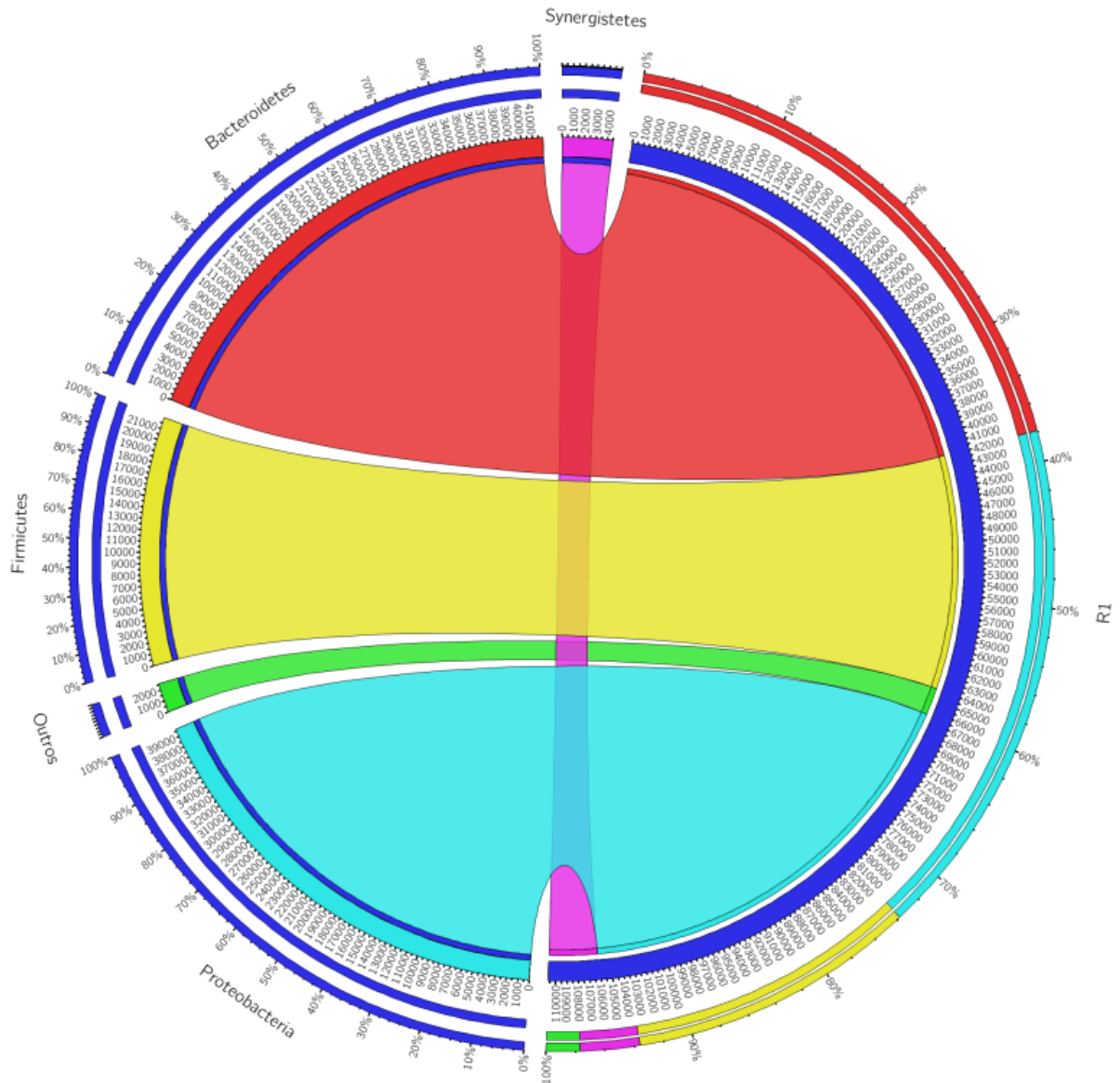


Figura 3. 10- Principais Filos do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa do material suporte (R1).

A nível de família do Domínio *Bacteria*, *Porphyromonadaceae* foi a mais abundante (24,2 %), seguida por *Helicobacteraceae* (17,5 %), *Bacteroidaceae* (12,5 %), *Geobacteraceae* (7,4 %) e *Clostridiaceae* (6,6 %), representando juntas 68,2 %. Outras 116 famílias identificadas, com abundância relativa menor que 1% cada, somadas, representaram 9,3 %.

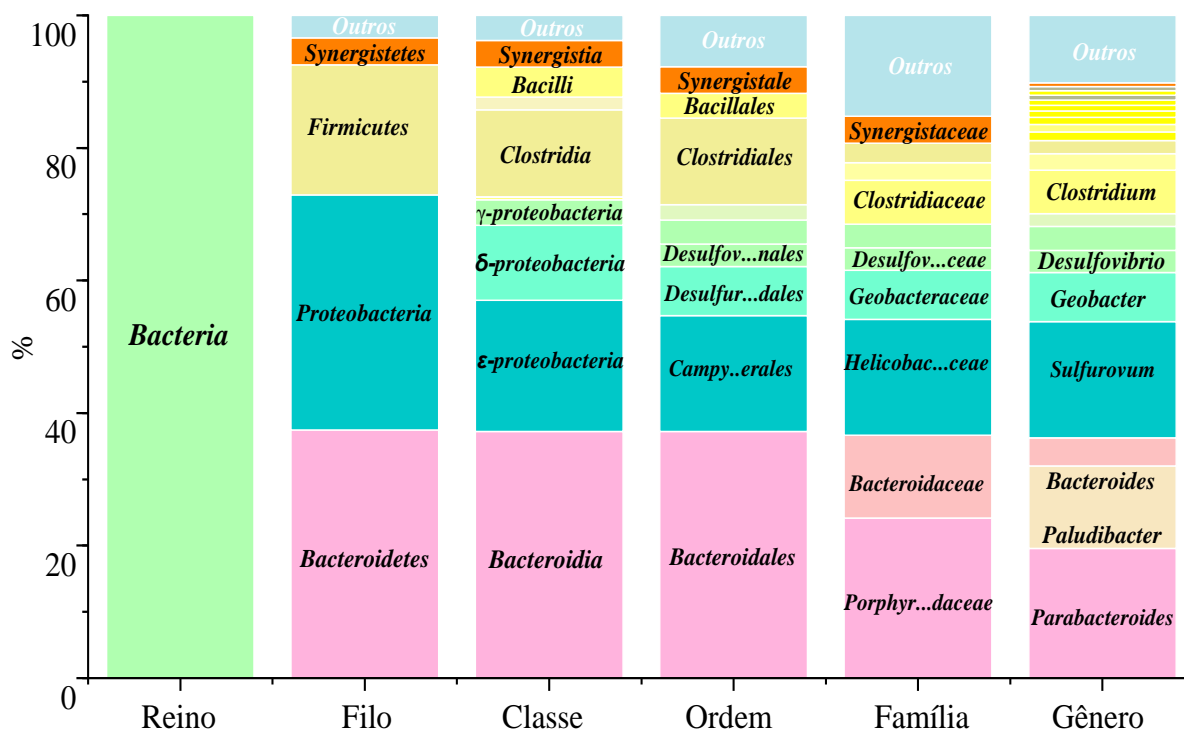


Figura 3. 11- Abundância relativa dos principais reinos, filios, classes, ordem, famílias e gêneros identificados na biomassa do material suporte.

Os gêneros mais abundantes foram *Parabacteroides*, *Sulfurovum*, *Bacteroides*, *Geobacter* e *Clostridium*, que juntas representaram 63,5 % (Figura 3. 12). Representando as BRS, *Geobacter* e *Desulfovibrio* foram os gêneros com maior AR, 7,4 e 3,4 %, respectivamente, embora outras espécies redutoras de sulfato estejam presentes em outros gêneros. Outros 226 gêneros identificados representaram juntos 13,4 % da diversidade microbiana.

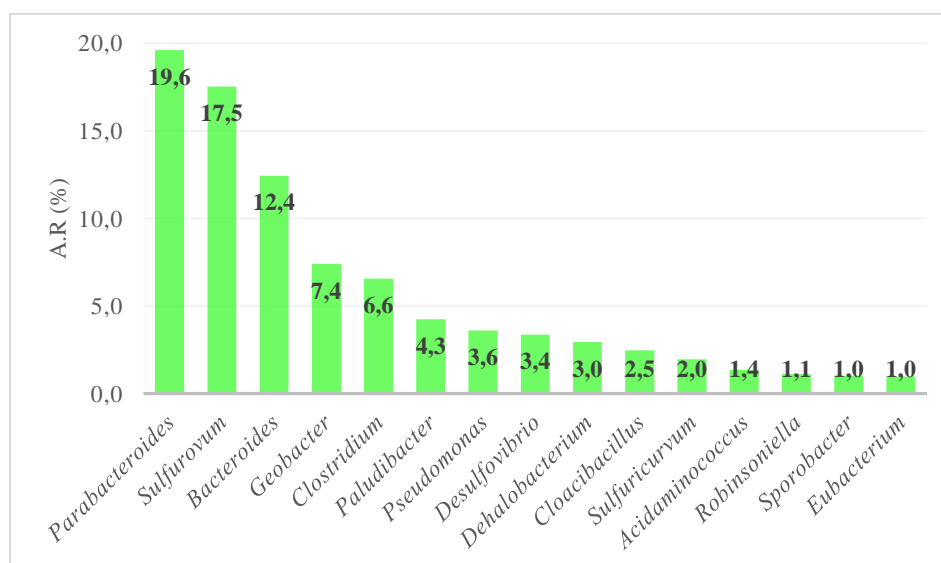


Figura 3. 12- Abundância relativa dos principais gêneros do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa do material suporte (a partir de 1,0 % da AR).

*Parabacteroides* pertence à família *Porphyromonadaceae* e filo *Bacteroidetes*, são bactérias estritamente anaeróbias e sacarolíticas, isto é, utilizam açúcares como fonte de energia (Sakamoto; Benno, 2006). O acetato e o succinato são os principais produtos resultantes da degradação da glicose por bactérias do gênero *Parabacteroides* (Qiu et al., 2014) e em menor concentração outros ácidos orgânicos, como o propiônico (Sakamoto; Benno, 2006; Soares et al., 2018). A presença do gênero em abundância relativa de 3 % foi reportada por Hu et al. (2015) em reator UASB tratando efluente contendo sulfato em relações DQO:sulfato variando de 0,5 a 20 e concentrações de 150 a 6000 mg L<sup>-1</sup>. O gênero se mostrou tolerante a concentrações de 10, 20, 30 e 50 µM de urânio (2,36 – 11,8 mg L<sup>-1</sup>) em meio contendo sulfato acima de 1000 mg L<sup>-1</sup>, representando aproximadamente 5% da AR total presente na biomassa (Zeng et al., 2018).

Espécies do gênero *Sulfurovum*, filo *Proteobacteria*, são oxidadoras de enxofre, quimiolitotróficas, que utilizam o enxofre molecular ou tiosulfato como doador de elétrons e o oxigênio ou nitrato como acceptor de elétrons utilizando o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono (Inagaki et al., 2004). Duas espécies do gênero foram identificadas no presente estudo: *Sulfurovum lithotrophicum* com 14,8 % da abundância relativa e *Sulfurovum* spp. (2,8 %). Fernández-Cadena et al. (2020) verificaram a relação da espécie *Sulfurovum lithotrophicum* com o aumento da concentração de metais pesados em área poluída por efluentes industriais. Verificaram ainda que o aumento da concentração de metais não inibiu o crescimento da espécie, que tem a habilidade de se adaptar a condições extremas (Fernández-Cadena et al., 2020).

*Clostridium* são bactérias fermentativas, com espécies capazes de reduzir sulfato (Rodrigues et al., 2020), como a *C. tunisiense* (Thabet et al., 2004) e são formadoras de esporos capazes de resistir sob condições extremas de baixo pH (3,8) (Oliveira et al., 2020). Em sintrofismo com arqueas metanogênicas hidrogenotróficas são capazes de oxidar o acetato completamente a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. O gênero já foi amplamente relatado no sistema de tratamento de DAM e tem uma associação estrita com BRS sob condições críticas (Rodrigues et al., 2020; Sánchez-Andrea et al., 2011; Sato et al., 2019).

*Bacteroides* são anaeróbias obrigatórias e têm como produto metabólico ácido acético, propiônico, isovalérico e succínico (Cato et al., 1982). *Bacteroides* e *Sulfurovum* foram os gêneros mais abundantes presentes no sedimento de DAM coletado na mina de cobre e zinco de Qibaoshan em Liuyang, província de Hunan, China (Hou et al., 2019). O pH do sedimento variou de 4,7 a 5,5 e a presença dos metais Cu, Mn, Fe, Zn, As, Cd e Pb foram detectados. Os autores concluíram que a presença de metais e metalóides foi o fator com maior influência para

a diversidade microbiana de áreas de mineração e que devido à resistência e tolerância à elevadas concentrações de metais/metaloídes, os gêneros *Phyllobacterium*, *Bacteroides* e *Sulfurovum* se mostraram promissores para aplicação de técnicas de biorremediação de áreas contaminadas por metais (Hou et al., 2019).

O gênero *Geobacter*, representando 7,4 % da abundância relativa da comunidade microbiana, são bactérias anaeróbias estritas, quimiorganotróficas, oxidadoras completas do acetato, etanol, propionato, butirato, entre outros compostos orgânicos, convertendo-os a CO<sub>2</sub> utilizando o Fe (III) como acceptor final de elétrons (Lovley et al., 1993). São bactérias redutoras de metais e a oxidação completa do acetato pode ocorrer utilizando Mn (IV), U (VI) e Co (III) como aceptores de elétrons (Caccavo et al., 1994; Lovley et al., 1993). Algumas espécies participam do ciclo do enxofre que utilizam o enxofre elementar (S<sup>0</sup>) como acceptor de elétrons (Caccavo et al., 1994).

Zhang et al. (2019) ao avaliarem a diversidade microbiana ao longo de dois rios contaminados por DAM em 4 zonas, sendo a Zona 1 a área mais próxima de DAM e mais contaminada e a Zona 4 a mais distante da DAM e menos contaminada, verificaram que a abundância relativa do filo *Proteobacteria* diminuiu à medida que distanciava-se da área mais contaminada (Zona 1). O filo *Firmicutes*, por outro lado, mostrou comportamento contrário e o filo *Proteobacteria* mostrou-se mais resistente a áreas contaminadas com metais pesados (Cu, Zn, Cd, Pb e As) e baixo pH (2,64 – 3,46).

Os principais gêneros responsáveis pela redução do sulfato foram: *Geobacter* (7,4 %) e *Desulfovibrio* (3,4 %). Além desses apontados com abundância relativa acima de 2 %, outros gêneros de BRS como *Thermodesulfobium*, *Sulfurospirillum*, *Desulfatirhabdium*, *Desulfobulbus*, *Desulfurella*, *Desulfosporosinus* e *Desulfobacterium* também foram identificados e somados representaram 0,84 %. As bactérias responsáveis pela redução do sulfato corresponderam a aproximadamente 25% da abundância relativa microbiana aderida ao material suporte do reator DFSBR.

A manutenção do sintrofismo entre bactérias fermentativas e BRS foi importante para a conversão da vinhaça, que é um substrato complexo, em compostos mais simples, como ácidos orgânicos, tornando possível a redução do sulfato por BRS que são mais tolerantes a concentrações elevadas de metais, assim como bactérias fermentativas dos gêneros *Clostridium* e *Bacteroides* e que são resistentes à presença de metais.

### 3.4 Conclusões

O reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR) apresentou remoção de sulfato (> 50%) e a vinhaça, que é um substrato complexo, foi convertida em ácidos simples, permanecendo no efluente e remoção de 42 a 65%. A variação de DQO:sulfato de 1,6 para 1,2 possibilitou aumento na participação das BRS na degradação de matéria orgânica no sistema, resultado do estabelecimento da sulfetogênese, como via predominante de remoção de matéria orgânica. No entanto, o residual de acetato e de vinhaça não oxidada no efluente constitui a necessidade de pós-tratamento.

A produção de sulfeto dissolvido no sistema pode ter afetado a população metanogênica, resultando no acúmulo de ácidos voláteis totais devido à oxidação incompleta da matéria orgânica.

A presença de metais, adicionados gradativamente, não prejudicou na eficiência de remoção de sulfato ou matéria orgânica e ocasionou a diminuição de sulfeto no meio.

A remoção eficiente de metais da fase líquida, com aumento do teor de metais na fração sólida precipitada no fundo do reator DFSBR, demonstra promissora recuperação de metais no sistema.

*Parabacteroides*, *Sulfurovum*, *Bacteroides*, *Geobacter* e *Clostridium* foram os gêneros em maior abundância relativa presente na biomassa aderida ao material suporte. Bactérias oxidadoras incompletas como *Parabacteroides*, *Bacteroides* e *Clostridium* foram importantes para a conversão da vinhaça em compostos simples e, em sintrofismo com as BRS, desempenharam função importante para a eficiência do sistema.

As bactérias responsáveis pela redução do sulfato corresponderam a aproximadamente 25% da abundância relativa microbiana aderida ao material suporte do reator DFSBR. Arqueas metanogênicas representaram menos de 0,07 % da abundância relativa total da comunidade microbiana, o que explica a concentração residual de acetato no efluente.

## Capítulo 4

### A adição de metais e a mudança da vinhaça da para glicerol como fonte de carbono para o tratamento da drenagem ácida de mina sintética e os efeitos para a sulfetogênese

#### RESUMO

A influência dos substratos vinhaça da cana-de-açúcar e glicerol para a sulfetogênese foi verificada utilizando reator anaeróbio de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR) em pH 4,0 – 5,4. Os metais Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn foram adicionados para simular a DAM sintética e os efeitos desse material recalcitrante para o tratamento biológico foram avaliados. A utilização simultânea da vinhaça da cana-de-açúcar e glicerol representou a melhor combinação para a redução de sulfato (99 %). O sulfeto predominou na forma de HS<sup>-</sup> até a metade da Fase V e a concentração de H<sub>2</sub>S ficou abaixo do limiar crítico para as bactérias, inferior a 200 mg L<sup>-1</sup>. A perda da eficiência de redução do sulfato e remoção de DQO esteve relacionada à adição dos metais sem adequada adaptação da biomassa, à mudança de pH afluente de 5 para 4 e ao acúmulo do acetato na forma de ácido acético, decorrentes do pH e da oxidação incompleta de BRS. A presença de arqueas metanogênicas acetoclásticas representou menos de 0,1 % da abundância relativa total. *Desulfovibrio* foi o gênero de BRS mais abundante e *Geotoga* e *Pectinatus* associada às fermentativas *Zymophilus*, *Clostridium* e *Paludibacter* tiveram papel fundamental para a sulfetogênese em pH moderadamente ácido.

#### 4.1 Introdução

A presente pesquisa teve como objetivo comparar a utilização das fontes de carbono vinhaça e glicerol para o tratamento de água residuária rica em sulfato quanto à remoção de DQO, redução do sulfato, produção de alcalinidade e ácidos no processo. Além disso, pretendeu-se verificar o potencial inibidor dos metais para a biomassa microbiana.

#### 4.2 Material e métodos

A configuração do reator utilizado está descrita no item 2.1 (Figura 2.3). A inoculação do reator foi realizada com lodo proveniente de um reator UASB tratando vinhaça de cana-de-açúcar visando à produção de metano. O inóculo utilizado foi proveniente de um reator UASB

mesofílico em escala piloto adaptado ao tratamento de vinhaça da cana-de-açúcar (Alves, 2018). O processo de inoculação do reator foi o mesmo utilizado por Godoi et al., 2017b, por meio da técnica de recirculação do lodo na zona de sedimentação até a verificação da adesão da biomassa ao material suporte.

O reator foi mantido em fluxo contínuo por 236 dias e dividido em 6 fases operacionais. A Fase I teve como objetivo manter a COV semelhante às condições impostas por Godoi et al. (2017b) de  $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e CSV de  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Na Fase II, o objetivo foi aumentar a participação das sulfetogêneses diminuindo a COV e a relação DQO:sulfato de  $1,6 \pm 0,3$  para  $1,2 \pm 0,2$ . Na Fase III, manteve-se a relação DQO:sulfato e o objetivo foi diminuir tanto a COV quanto a CV do sulfato a fim de analisar o comportamento do reator. A Fase IV foi marcada pela transição da vinhaça para o glicerol, inicialmente com 20% glicerol e 80% vinhaça (v/v) e depois 50-50% (v/v) até a completa transição que ocorreu a partir da Fase V em que o glicerol foi a única fonte de elétrons. Na Fase VI houve a introdução dos metais que compõem a DAM descrita na Tabela 4.1, baseada na composição descrita por Cunha et al. (2020).

Tabela 4.1- Composição da DAM sintética.

Analitos	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Al	9,4
Co	$3,3 \pm 0,03$
Cu	$2,2 \pm 0,07$
Fe	$53,0 \pm 1,7$
Mn	$1,4 \pm 0,01$
Ni	$4,2 \pm 0,2$
Zn	$8,2 \pm 0,3$

Os principais parâmetros operacionais aplicados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Parâmetros operacionais do reator DFSBR

Parâmetros	Fases					
	I	II	III	IV	V	VI
DQO filtrada ( $\text{g L}^{-1}$ )	$4,3 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$
$\text{SO}_4^{2-}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$2,7 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$
COV ( $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	$4,8 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,4$
CV Sulfato ( $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	$3,0 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,4$
DQO:sulfato	$1,6 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
pH afluente	$4,7 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,3$
Fonte de carbono*	V	V	V	V + G	G	G
Período operacional	1-50	51-90	91-114	115-140	141-183	184-236

\*V- Vinhaça da cana-de-açúcar; G- Glicerol

Amostras do descarte de fundo do reator DFSBR foram coletadas nos dias 20 e 50 (Fase I), 70 (Fase II), 98 (Fase III), 117 (Fase IV), 183 (Fase V), 190, 201 e 236 (Fase VI) e analisadas quanto à concentração de ST, SS, SF e SV (APHA et al., 2012).

#### 4.2.1 Análise da diversidade microbiana

A análise da diversidade microbiana foi determinada a partir da amostra de biomassa do reator DFSBR, correspondente ao dia 201 de operação (Fase VI), submetida à extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene RNAr 16S, de acordo com a metodologia descrita na seção 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3, respectivamente.

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Remoção de DQO, sulfato e produção de sulfeto

Com a diminuição da relação DQO:sulfato da Fase I para a Fase II pela redução no aporte de DQO afluyente relativa à fonte orgânica, a eficiência média de remoção de matéria orgânica foi de 58% para 51%, no entanto houve menor dispersão dos resultados (Figura 4.1). Na Fase III, quando houve nova redução do aporte da carga orgânica, a remoção de DQO média foi de  $63,5 \pm 10\%$ , mantendo-se em  $61 \pm 15\%$  na Fase IV, quando o glicerol foi adicionado ao meio.

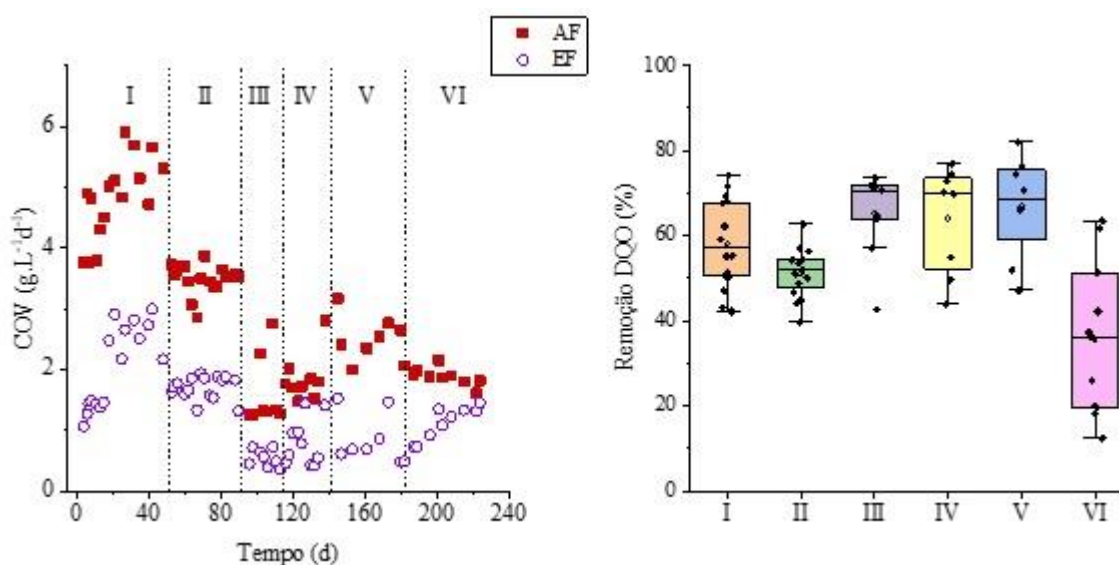


Figura 4. 1- (a) Cargas afluentes (■), efluentes (○); (b) Boxplot da eficiência de remoção de DQO nas fases operacionais.



Na Fase V, quando o glicerol passou a ser o único doador de elétrons, a remoção média foi de  $67 \pm 12\%$  e após a adição de metais na Fase VI, houve redução significativa, removendo apenas  $35 \pm 18\%$  de DQO.

Com relação à redução do sulfato, a eficiência média diminuiu de 80% na Fase I para 75% na Fase II, quando houve a diminuição no aporte de matéria orgânica. Nas Fases III e IV estabilizou acima dos 90% (Figura 4. 2). A transição da vinhaça para o glicerol (Fase IV) não alterou a estabilidade ou a eficiência do reator.

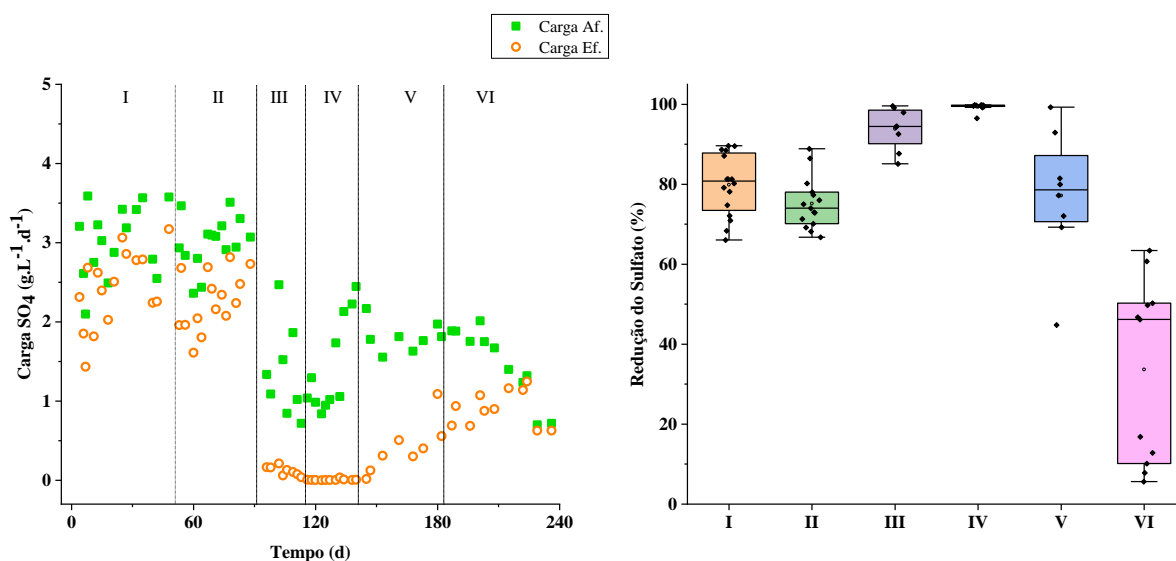


Figura 4. 2- Cargas afluentes (■), efluentes (○) e análise boxplot da eficiência de redução de sulfato nas 6 fases operacionais.

Ao longo da Fase V (100% glicerol), houve a queda sistemática da eficiência de remoção do sulfato, diminuindo de 99% no primeiro dia e chegando a 69% no último dia correspondente à Fase V. Com a adição dos metais, a sulfetogênese ficou comprometida, a remoção média foi de apenas 33% e a partir do 215º dia de operação as eficiências de remoção ficaram abaixo dos 20%.

Enquanto a utilização da vinhaça e glicerol em simultâneo (Fase IV) mostrou-se a melhor combinação para a redução de sulfato (99%), o glicerol como fonte exclusiva de carbono apresentou instabilidade. Como o glicerol é um dos componentes da vinhaça, o uso da vinhaça in natura como doador de elétrons apresenta vantagens devido à elevada carga orgânica e concentração dos nutrientes P, N e K (Godoi et al., 2019; Parsaee et al., 2019), ausentes no glicerol puro.

A adição dos metais sem adaptação da biomassa (Fase VI) pode ter afetado severamente a biomassa microbiana levando a remoções incipientes de DQO e sulfato. De fato,

metais em solução podem inibir severamente a atividade das BRS agindo como barreiras e impedindo a troca de solutos na membrana celular dos microrganismos (Koschorreck, 2008; Utgikar et al., 2002). E o acúmulo de aproximadamente 5 mg L<sup>-1</sup> de cobre e 10 mg L<sup>-1</sup> de zinco pode prejudicar a redução de sulfato no tratamento da DAM (Qian et al., 2019; Utgikar et al., 2002). No entanto, Cunha et al. (2020) verificaram que o aumento gradual da concentração dos metais melhorou as eficiências de remoção de DQO e da redução de sulfato.

O mesmo foi observado por Gallegos-Garcia et al. (2009), a adição gradativa dos metais Fe, Zn e Cd não provocou efeitos negativos à redução de sulfato e remoção de DQO, mas teve efeito negativo para o pH efluente que diminuiu de 6 para 5,2 e para a alcalinidade de bicarbonato, que diminuiu de 1314 ± 19 mg L<sup>-1</sup> para 0 mg L<sup>-1</sup> após adição dos metais.

(Villa-Gomez et al., 2015) verificaram que o pH afluente do meio exerceu grande influência para as eficiências de tratamento de água residuária contendo metais e a queda do pH afluente de 7 para 4 provocou efeito negativo nas eficiências de remoção de DQO e sulfato, que não ultrapassaram 30%.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de remoção de DQO e sulfato de cada fase. A remoção de matéria orgânica teve variações pontuais ao longo de toda a operação, mas poucas variações médias de uma fase para outra, exceto quando houve a adição de metais, na Fase VI.

Tabela 4.3- Cargas orgânicas e de sulfato removidas em cada fase.

<b>Fases</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>
Carga removida (g DQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	2,8 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,6 ± 0,3	0,7 ± 0,4
Remoção DQO (%)	58 ± 10	51 ± 6	63 ± 10	61 ± 15	67 ± 12	35 ± 18
Carga removida (g SO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,4	0,6 ± 0,5
Remoção SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	80 ± 8	75 ± 6	90 ± 4	99 ± 1	82 ± 11	34 ± 23

A utilização do glicerol no tratamento de águas residuárias ricas em sulfato, seja para redução de sulfato ou para remoção de metais, tem se mostrado eficiente (Santos; Johnson, 2017; Ñancuqueo; Johnson, 2014), no entanto, nos trabalhos mencionados, o metal cobre adicionado foi removido devido à precipitação seletiva, isto é, o efluente contendo o metal ocorria em outro compartimento e não havia contato entre o metal e a biomassa microbiana.

No trabalho reportado por Falagán et al. (2017a), o aumento da concentração de 2 mM (~27 mg) para 4,5 mM de Al esteve associado à queda no consumo do glicerol, redução do

sulfato e consequente aumento do tempo de detenção hidráulica (TDH) que só melhorou após adaptação e estabilização do reator.

Com relação ao bioossulfeto produzido, a concentração efluente de sulfeto total dissolvido foi em média de  $462 \text{ mg L}^{-1}$  nas Fases I e II. A média das Fases III, IV, V e VI foi de  $342 \pm 99$ ,  $410 \pm 83$ ,  $313 \pm 150$  e  $72 \pm 52 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 4. 3). O sulfeto predominou na forma de  $\text{HS}^-$ , representando 82% do total na Fase I e 75% na Fase II. Nas Fases III, IV e V o  $\text{HS}^-$  representou 69, 75 e 63% do sulfeto total. Na Fase VI apenas 8,6% do sulfeto total estava na forma de  $\text{HS}^-$ , devido à queda do pH efluente. Na forma de  $\text{H}_2\text{S}$ , a forma que apresenta maior toxicidade aos microrganismos, apenas nas Fases II e V as concentrações foram superiores aos  $110 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$ , valor considerado inibitório para arqueas e bactérias (Jing et al., 2013).

Cunha et al. (2019), utilizando um reator UASB, relacionaram a queda na eficiência do tratamento biológico ao aumento da concentração de sulfeto total quando ultrapassada os  $270 \text{ mg L}^{-1}$ , em que, aproximadamente,  $90 \text{ mg L}^{-1}$  estava na forma de  $\text{H}_2\text{S}$ .

O limiar crítico para bactérias redutoras de sulfato (BRS), por sua vez, era geralmente esperado em concentrações acima de  $125 \text{ mgH}_2\text{S L}^{-1}$  (Maillacheruvu et al., 1993), enquanto a inibição total do metabolismo das BRS só foi verificada em concentrações de  $\text{H}_2\text{S}$  superiores a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (Reis et al., 1992), utilizando reatores em batelada. Portanto, no presente trabalho, o sulfeto de hidrogênio foi mantido abaixo desse valor durante todo o tempo operacional. Assim, os efeitos tóxicos sobre a biomassa sulfetogênica, que podem causar a perda de desempenho observada, devem ser atribuídos a outros agentes que não o sulfeto.

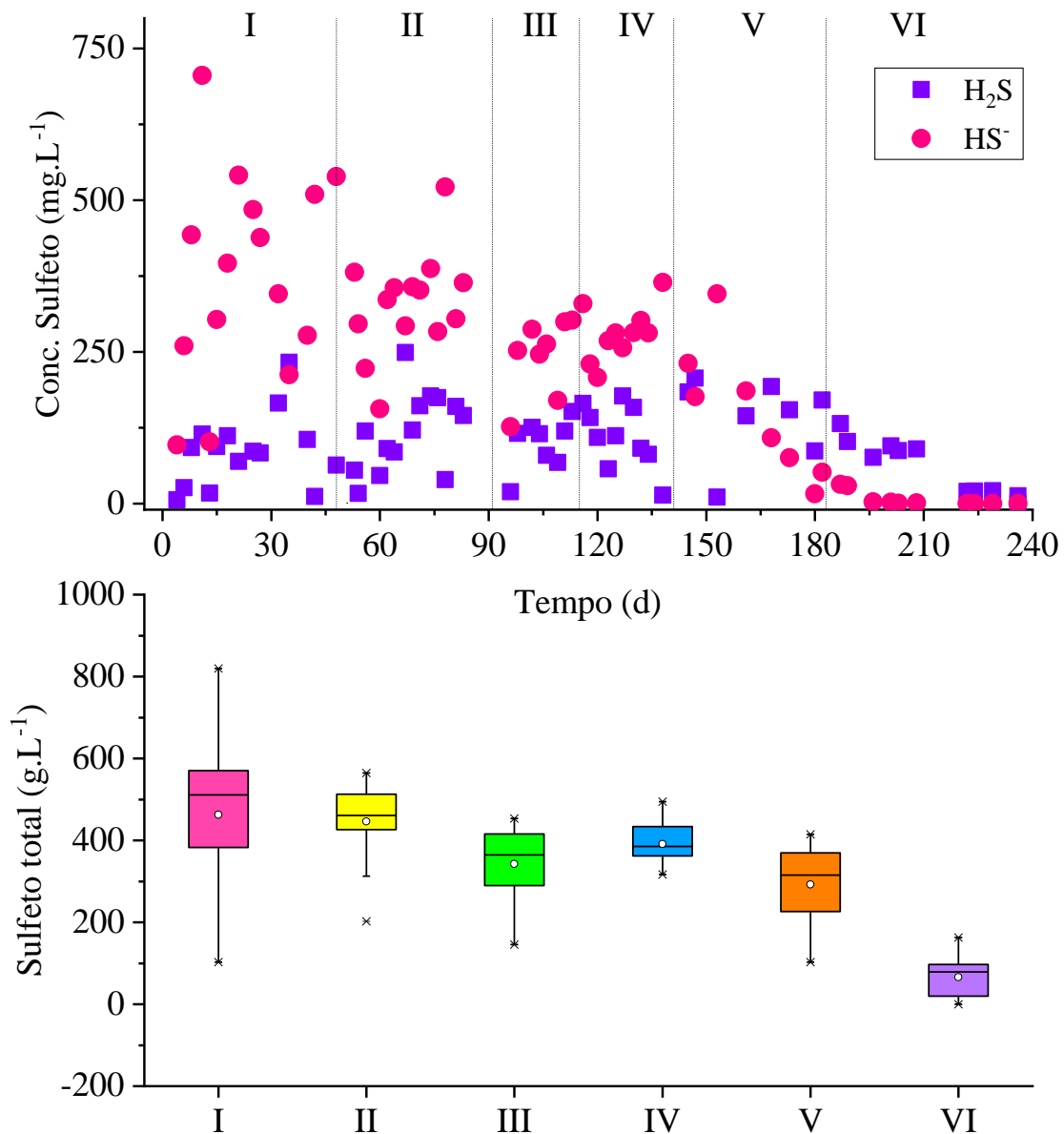


Figura 4. 3- Concentração de sulfeto na forma de H<sub>2</sub>S (■) e na forma de HS<sup>-</sup> (●).

Alguns trabalhos (Bekmezci et al., 2011; Utgikar et al., 2003, 2002), correlacionam a perda da eficiência de remoção de sulfato à elevada concentração de metais adicionadas sem adequada adaptação da população microbiana. Esse fato resulta em acúmulo de compostos orgânicos decorrentes da oxidação incompleta de BRS e à mudança de pH afluente. Os dados do presente trabalho corroboram com estas afirmações.

A presença dos metais em baixas concentrações podem estimular o crescimento microbiano e favorecer rotas metabólicas (Johnson; Hallberg, 2003). Quando em excesso, os metais em solução podem precipitar na forma de sulfeto metálico, diminuindo assim a

concentração do sulfeto e a toxicidade do sulfeto aos microrganismos (Lewis, 2010), desde que não altere a concentração da alcalinidade devida a sulfeto (Godoi et al., 2017a).

Segundo Colipai et al. (2018), Uçar (2017) e Yilmaz et al. (2019), a possibilidade de utilizar o sulfeto dissolvido resultante da redução do sulfato, deslocando o equilíbrio químico e convertendo-o a gás, fluxionando-o para um segundo reator, parece ser a forma mais viável para utilização na precipitação de metais em configurações de reatores de dois estágios.

#### 4.3.2 Alcalinidade, pH e ácidos voláteis

O pH afluente ficou em torno de 5,0 nas Fases I a V e 4,1 na Fase VI em função da adição dos metais (Figura 4.4). Como resultado da sulfetogênese, o pH efluente manteve-se acima de 7 até a metade da Fase V, e em torno de 6,5 ao final dessa fase. A adição dos metais levou à diminuição do pH afluente de valores próximos a 5 para 4 e o pH efluente médio foi  $5,6 \pm 0,7$ . Ao final dessa fase, a alcalinidade produzida não foi suficiente para elevar o pH interno e nos últimos 15 dias de operação, o pH de saída foi inferior a 4.

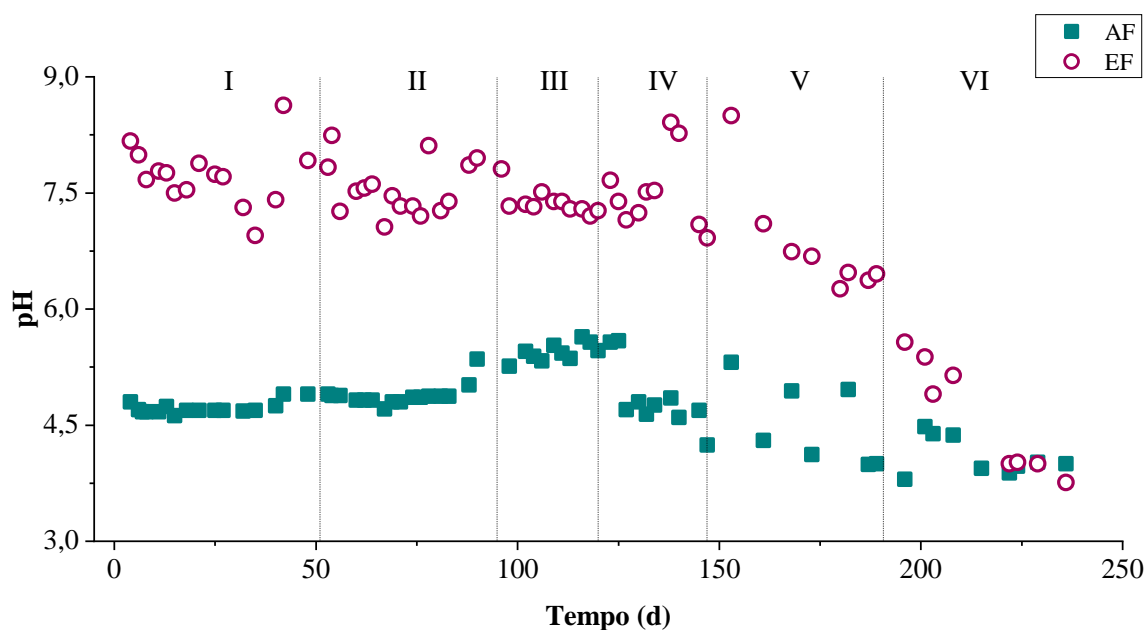


Figura 4. 4- (a) pH afluente (■) e pH efluente (○).

A alcalinidade total bem como a concentração de ácidos voláteis totais diminuíram após a diminuição no aporte de sulfato e matéria orgânica. A alcalinidade a bicarbonato média oscilou de  $1375 \pm 274 \text{ mg L}^{-1}$  na Fase I para  $1275 \pm 196 \text{ mg L}^{-1}$  na Fase II. Nas Fases III e IV a alcalinidade a bicarbonato ficou acima dos  $900 \text{ mg L}^{-1}$ , representando ainda  $>90\%$  da alcalinidade total. Um total de  $575 \pm 270 \text{ mg L}^{-1}$  de alcalinidade a bicarbonato foram gerados

na Fase V (Figura 4. 5). A contribuição do sulfeto para a alcalinidade total representou 30% nas Fases I, II, III, IV e V. No entanto, na Fase VI, a alcalinidade devida a sulfeto foi de apenas 13% do total de alcalinidade produzida, quando houve a adição dos metais. Isso por que a precipitação dos metais na forma de sulfetos metálicos provoca a diminuição da alcalinidade devida a sulfeto e consequente diminuição da capacidade tampão do meio e do pH (Godoi et al., 2017a).

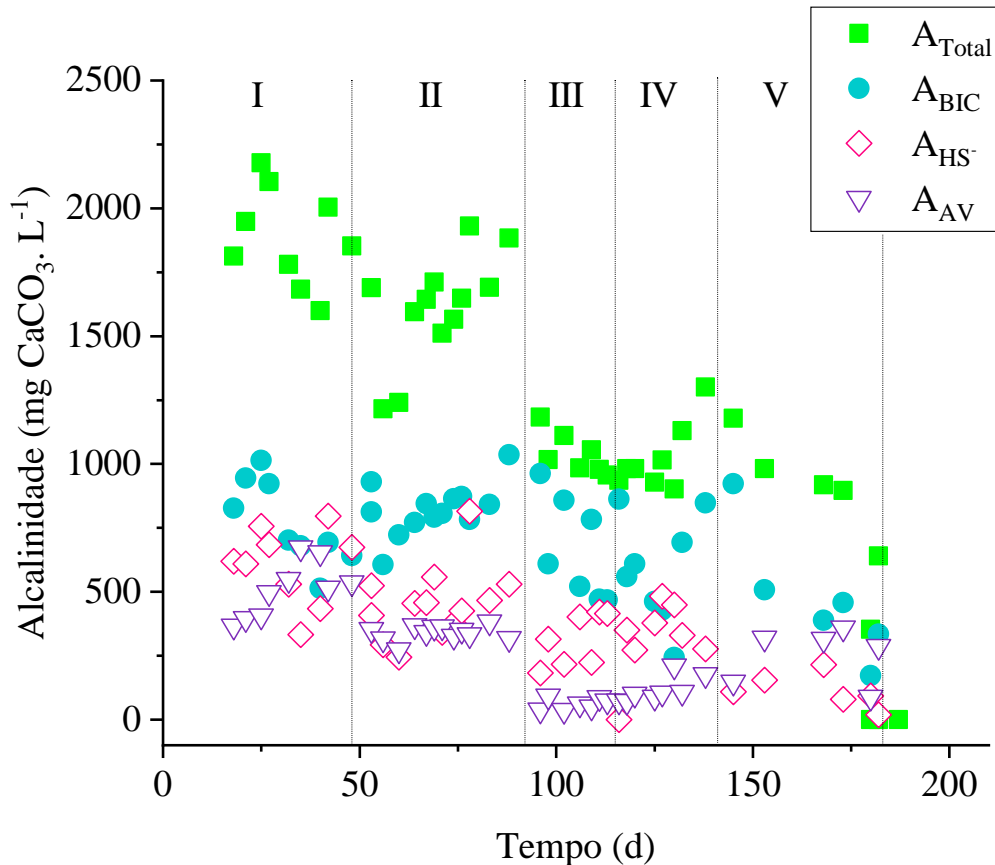


Figura 4. 5- Alcalinidade total (■), alcalinidade a bicarbonato (●), alcalinidade a sulfeto (◇) e alcalinidade a ácidos voláteis (▼).

A relação AI/AP ficou em torno de 0,6 (Fase I), 0,5 (Fase II) até estabilizar em 0,3 nas Fases III e IV. Na Fase V ficou em 0,8 e no 187º dia (último dia em que foi possível medir a alcalinidade), a relação AI/AP estava em 1,2, indicando acidificação do meio, uma vez que o glicerol é rapidamente oxidado, acidificando o meio.

Após completa transição da vinhaça para o glicerol na Fase V, observou-se o aumento na produção de ácidos voláteis totais (AVT) e diminuição de alcalinidade a bicarbonato. A concentração de ácidos voláteis totais foi de 186 mg L<sup>-1</sup> na Fase III para 233 mg L<sup>-1</sup> na Fase IV. Esse valor quase triplicou na Fase V, assemelhando-se às Fase I e II, quando a carga orgânica aplicada foi  $4,8 \pm 0,7$  e  $3,5 \pm 0,2$  g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente.

A partir de análises de cromatografia, a concentração de acetato média no efluente das Fases II, III, IV, V e VI foram analisadas e estão apresentadas na Figura 4. 6. A concentração do acetato representou uma grande parcela dos AVT e não foram detectados propionato e butirato.

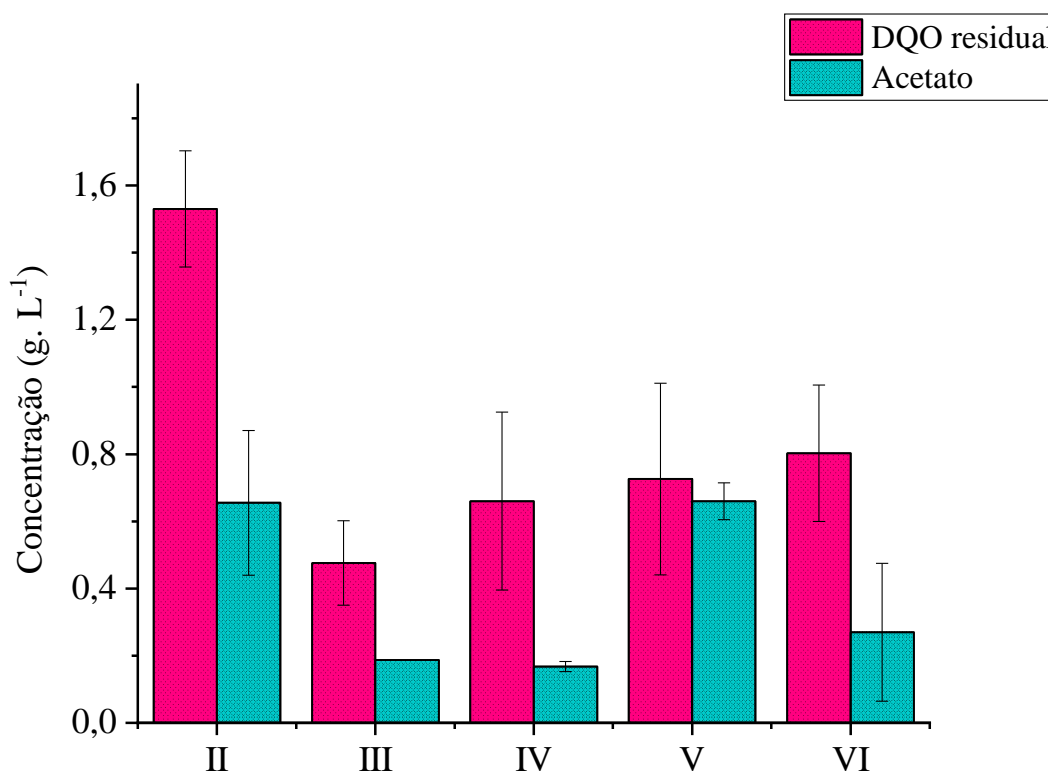
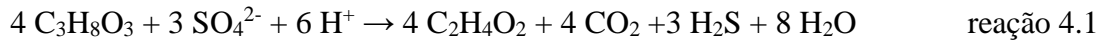


Figura 4. 6- Concentração média de acetato e DQO residual em g L<sup>-1</sup> nas fases operacionais II, III, IV, V e VI.

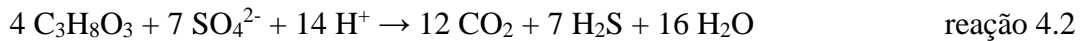
A partir da Figura 4. 6 é possível verificar que uma parcela da vinhaça, medida como DQO, não foi metabolizada e, conseqüentemente, não convertida a acetato ou a outros ácidos orgânicos. Essa parcela não metabolizada pode responder à concentração de compostos recalcitrantes como fenóis e polifenóis ((Parsaee et al., 2019). A partir da Fase V, o glicerol passou a ser a única fonte de carbono que, diferentemente da vinhaça, foi possível fazer o balanço de massa.

A partir da concentração média de acetato detectada no efluente da Fase V, foi possível estimar as concentrações de glicerol oxidado e sulfato reduzido pela via incompleta. De acordo com Kimura et al. (2006) reação 4.1, 1012 mg L<sup>-1</sup> de glicerol foram consumidos, reduzindo 806,4 mg L<sup>-1</sup> de sulfato, resultando em 660 mg L<sup>-1</sup> de acetato no efluente, o principal composto orgânico resultante da oxidação incompleta das BRS. Dessa forma, aproximadamente 70 % da

redução do sulfato ocorreu pela via incompleta e a sulfetogênese foi responsável por 84 % do glicerol metabolizado.



A concentração de acetato média detectada no efluente do reator DFSBR na Fase VI foi de 270 mg L<sup>-1</sup>, resultante da oxidação incompleta. Foram reduzidos em média 530 mg L<sup>-1</sup> de sulfato, sendo aproximadamente 200 mg L<sup>-1</sup> reduzidos pela via completa (reação 4.2), oxidando 110 mg L<sup>-1</sup> de glicerol. Isso corresponde a 38 % do sulfato reduzido pela via completa e 62 % pela via incompleta. De acordo com as reações 4.1 e 4.2, a sulfetogênese foi responsável por aproximadamente 58 % da oxidação do glicerol na Fase VI.



A redução do pH afluente a partir da Fase IV demonstrou importância na estabilidade e eficiência dos processos biológicos envolvidos. Na Fase V, observou-se a inibição de microrganismos importantes para completa conversão dos ácidos a metano e CO<sub>2</sub>, principalmente das metanogênicas consumidoras de acetato, que contribuiu para o acúmulo de acetato superior aos 500 mg L<sup>-1</sup>, resultando em queda na eficiência de remoção de matéria orgânica como DQO e na queda do pH interno do reator, associada além do acúmulo de ácidos, à redução na alcalinidade remanescente na Fase VI, cuja precipitação de sulfetos metálicos contribuiu.

Com a substituição da vinhaça, considerada uma matriz complexa, para o glicerol, composto simples de apenas 3 carbonos, a conversão a ácidos de cadeia menor ocorreu mais facilmente, provocando mudanças quanto às rotas metabólicas de conversão do substrato. O acetato (pKa 4,75), produto da oxidação incompleta do glicerol por BRS, se apresenta da forma não-dissociada em pH baixo, isso significa que, em pH 4,75, aproximadamente 50% do acetato se apresentará na forma não-dissociada (Sánchez-Andrea et al., 2014a).

Grupos carboxilas em pH baixo se encontram na forma não-dissociada e conferem inibição ao crescimento dos microrganismos devido à difusão dos ácidos para dentro das células, que causam desequilíbrio e acidificação do citoplasma (Koschorreck, 2008; Ñancuqueo et al., 2017). Reis et al. (1990) verificaram que 50% da população de BRS foi inibida entre pH 5,8 e 7 na presença de 0,09 mmol de ácido acético (54 mgCH<sub>3</sub>COOH L<sup>-1</sup>). A oxidação do



acetato a  $\text{CO}_2$  foi a reação de etapa mais lenta em reatores tratando a DAM, exigindo maiores tempos de detenção hidráulica aplicado (Koschorreck et al., 2008).

Com relação à análise de sólidos fixos e voláteis a partir da biomassa precipitada e descartada do fundo do reator, os resultados estão apresentados na Figura 4. 7. A maior proporção de SF nas Fases I e II se deve à maior concentração de vinhaça aplicada para maior COV. Isso porque, além de elevada carga orgânica, metais e outros compostos inorgânicos estão presente na vinhaça (Godoi et al., 2019). Com a diminuição do aporte de vinhaça na Fase III e IV, refletiu na menor parcela de SF. No início da Fase VI, a proporção de sólidos fixos em relação aos sólidos totais representava 22%, e ao final da operação a proporção de SF era de 55%, indicando que houve precipitação dos metais junto ao lodo no reator.

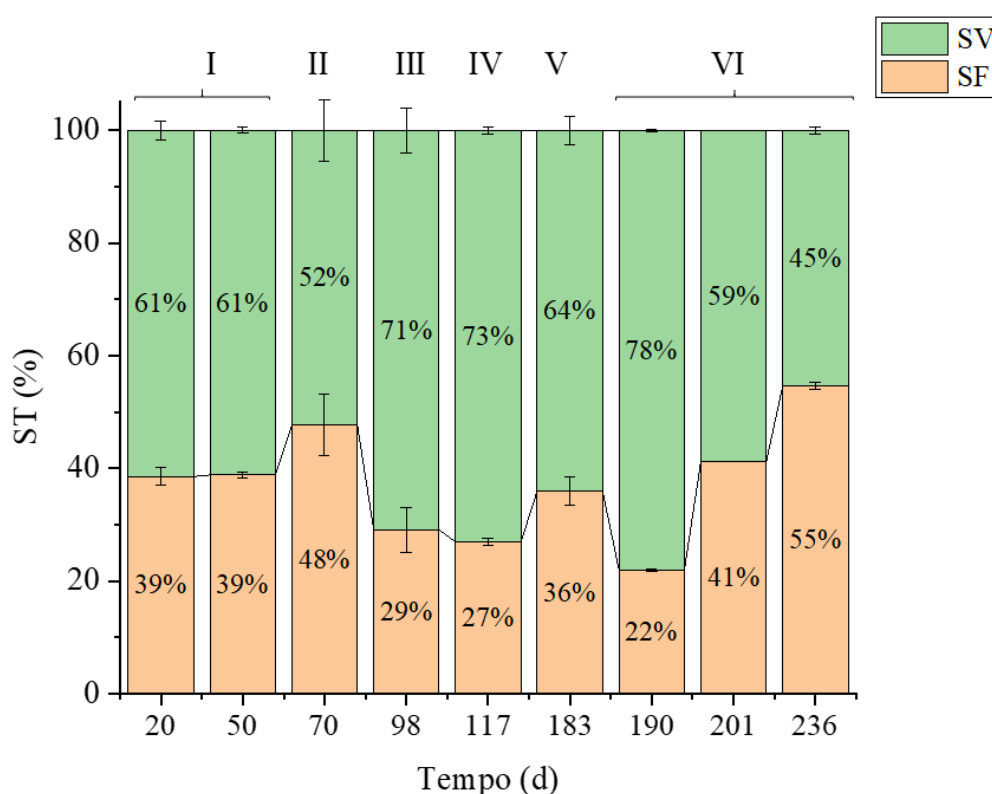


Figura 4. 7- Proporção dos sólidos fixos e voláteis correspondente à análise gravimétrica do lodo.

#### 4.3.4 Análise da diversidade microbiana

Os índices de diversidade e riqueza da biomassa foram realizados a partir da análise dos resultados de sequenciamento da amostra de biomassa coletada no reator DFSBR na Fase VI. As principais informações estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* da biomassa microbiana ao final da Fase VI do reator DFSBR.

	Geral	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
Índice de diversidade Shannon (H')	3,519	3,509	1,936
Índice de Simpson (1-D)	0,9088	0,9084	0,75
Dominância (D)	0,0912	0,0915	0,25
Índice de Margalef	77,22	74,89	3,206
Índice de riqueza Chao1	1161	1117	27,5

Considerando as condições adversas aplicadas (presença de metais e pH 4,1) os índices de riqueza (Chao1= 1161), de diversidade (H'= 3,519 e Margalef= 77,22) e dominância (Simpson= 0,9088 e D= 0,0912), mostraram-se adequados e em conformidade aos encontrados em trabalhos relacionados à DAM (Zhang et al., 2019; Korzhenkov et al., 2019) ou ao tratamento da DAM (Godoi, 2018; Hiibel et al., 2011).

#### 4.3.4.1 Análise taxonômica dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*

Foram classificadas 101214 *reads* em 891 OTUs (Tabela 4.5). Bactérias representaram 99,83 % da abundância relativa total e arqueas 0,14 %. Foram identificados 21 filos do Domínio *Bacteria* e os Filos que representaram mais de 1% da abundância relativa foram: *Firmicutes* (63,6 %), *Bacteroidetes* (19,1 %), *Proteobacteria* (8,9 %), *Thermotogae* (4,5 %) e *Spirochaetes* (1,3 %) (Figura 4. 8). Do Domínio *Archaea*, apenas dois foram identificados, *Euryarchaeota* representando 0,13 % da abundância relativa total e *Crenarchaeota* (0,016 %).

Tabela 4.5- N° de *reads*, OTUs, filos, classes, famílias e gêneros identificados na biomassa do DFSBR na Fase VI.

	Geral	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
N° de <i>reads</i> classificadas em OTUs	101214	101042	147
OTUs	891	864	17
Número de filos	27	21	2
Número de classes	48	38	4
Número de famílias	154	136	10
Número de gêneros	281	261	12

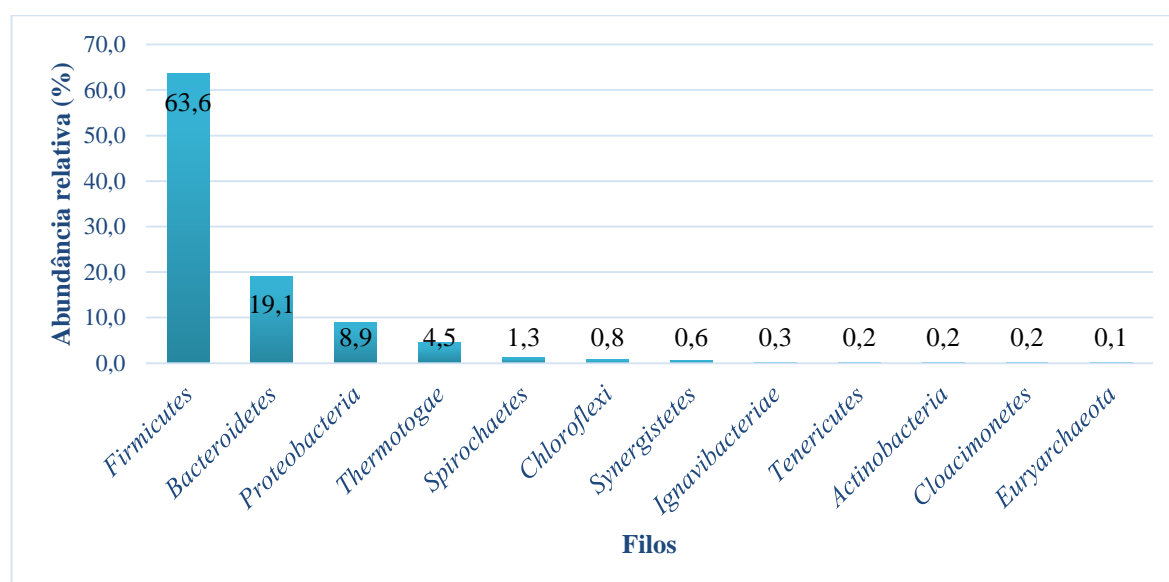


Figura 4. 8- Principais Filos identificados na biomassa do DFSBR durante a Fase VI.

A nível de família, *Veillonellaceae* representaram 41,4 % da abundância relativa total, seguido por *Clostridiaceae* (13,1 %), *Bacteroidaceae* (13,0 %) e *Desulfovibrionaceae* (5,3 %) (Figura 4. 9). No total, 154 famílias foram classificadas e as que representaram menos de 1 % da AR total somadas corresponderam a 8,5 % da abundância.

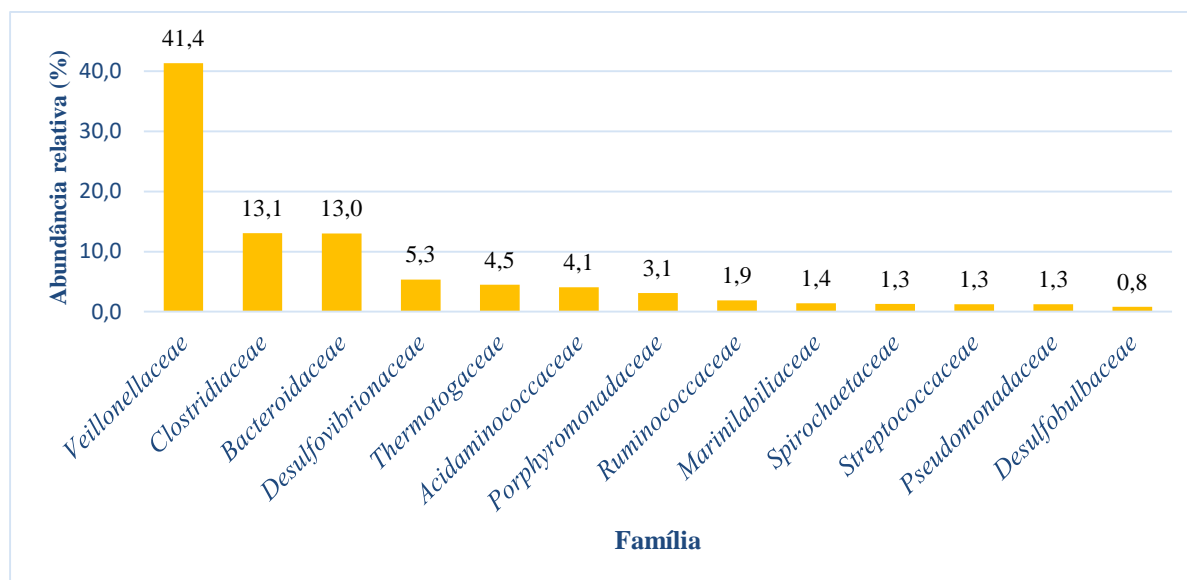


Figura 4. 9- Principais famílias identificadas na biomassa do DFSBR durante a Fase VI.

A nível de gênero, o mais abundante foi *Zymophilus* (24,9 %) que pertence à família *Veillonellaceae* (Tabela 4.6; Figura 4. 10). Microrganismos da família *Veillonellaceae* foram encontrados em amostras de enriquecimento do sedimento do Rio Tinto (Sánchez-Andrea et al., 2013) e reatores sulfetogênicos (Hessler et al., 2018), são fermentativos e estritamente anaeróbios (Schleifer et al., 1990).

Tabela 4.6- Principais gêneros identificados na biomassa do DFSBR durante a Fase VI.

Referência*	Taxonomia	Reads	AR (%)
A	<i>Zymophilus</i>	25141	24,9
B	<i>Pectinatus</i>	16540	16,4
C	<i>Clostridium</i>	13176	13,0
D	<i>Bacteroides</i>	11666	11,5
E	<i>Desulfovibrio</i>	5412	5,4
F	<i>Geotoga</i>	4480	4,4
G	<i>Acidaminococcus</i>	4123	4,1
H	<i>Paludibacter</i>	2041	2,0
Outros	Abaixo de 2% da AR	18463	18,3

\*Referência para compreender os táxons da Figura 4. 10

O gênero *Geotoga* é composto por bactérias anaeróbias fermentativas e redutoras de enxofre (Davey et al., 1993). Os principais produtos resultantes da fermentação são: H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>,

acetato e etanol (Davey et al., 1993). No presente trabalho, o gênero correspondeu a 4,4 % da abundância relativa total, enquanto no trabalho reportado por Zhou et al. (2015) utilizando biorreatores redutores de sulfato, a abundância relativa do gênero variou de acordo com a fonte de carbono. Quando o reator sulfetogênico foi alimentado com lactato, o gênero correspondeu a 3,55 %, com glicose 17,15 %, etanol 2,43 % e formiato apenas 0,17 %, demonstrando a influência que a fonte de carbono provoca para a comunidade microbiana (Zhou et al., 2015).

*Pectinatus*, que representou 16,4 % da biomassa microbiana, são bactérias anaeróbias, fermentativas e capazes de produzir  $H_2S$  (Juvonen; Suihko, 2006). Glicose e frutose são metabolizadas e convertidas em acetato e propionato (Juvonen; Suihko, 2006). Esse gênero é geralmente isolado e encontrado em cervejas contaminadas (Juvonen; Suihko, 2006; Schleifer et al., 1990) e nas buscas na literatura não foram encontrados relatos da presença do gênero em DAM ou reatores sulfetogênicos.

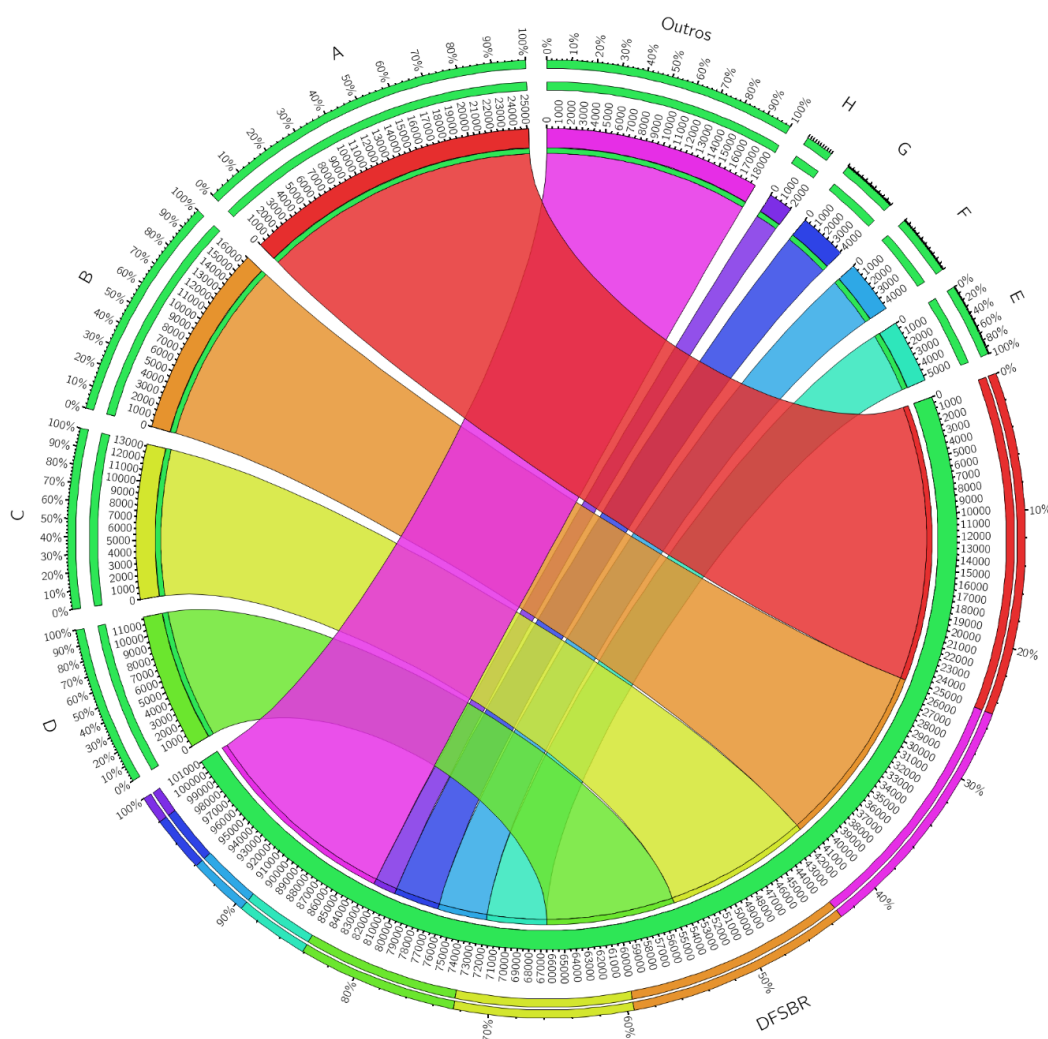


Figura 4. 10- Principais Gêneros do Domínio Bacteria identificados na Fase VI. Legenda das taxonomias: A- *Zymophilus*, B- *Pectinatus*, C- *Clostridium*, D- *Bacteroides*, E- *Desulfobivrio*, F- *Geotoga*, G- *Acidaminococcus* e H- *Paludibacter*.

As BRS representaram aproximadamente 7 %, incluindo os gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfatibacillum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosporosinus*, *Desulfobacter*, além de outros gêneros como *Geogota*, *Acidaminococcus* e *Pectinatus* (Cook et al., 1994; Davey et al., 1993; Juvonen; Suihko, 2006), totalizando aproximadamente 32 % da AR total de bactérias envolvidas no ciclo do enxofre.

O sintrofismo entre bactérias fermentativas, como as representadas pelos gêneros *Paludibacter*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Zymophilus*, e BRS são essenciais para o bom desempenho da sulfetogênese. Como descrito por Liang et al. (2013), o gênero *Paludibacter* associado às BRS teve grande influência na eficiência de redução do sulfato assim como no trabalho reportado por González et al. (2019) em que o gênero *Clostridium* associado ao gênero *Desulfosporosinus* favoreceram a sulfetogênese. O sucesso desse sintrofismo deve-se principalmente aos principais produtos finais (acetato e propionato) decorrentes da fermentação de carboidratos e açúcares por esses gêneros (Cato et al., 1982; Oliveira et al., 2020; Schleifer et al., 1990; Ueki et al., 2006), bem como à capacidade de tolerar ambientes ácidos (Liang et al., 2013; Oliveira et al., 2020; Sánchez-Andrea et al., 2013, 2011; Wilde et al., 1997).

O acetato e propionato resultante do metabolismo das bactérias fermentativas podem ser utilizados facilmente por BRS, que possuem maior afinidade com propionato (Muyzer; Stams, 2008), enquanto arqueas metanogênicas acetoclásticas possuem maior afinidade pelo acetato. No entanto, na ausência de arqueas e bactérias oxidadoras completas, ocorre o acúmulo de acetato, como no presente trabalho, que em pH abaixo de 4,75, apresenta-se na forma de ácido acético, conferindo toxicidade à biomassa.

#### 4.4 Conclusão

A combinação de vinhaça e glicerol como doadores de elétrons proporcionou a completa redução do sulfato em pH afluente de 4,5 e relação DQO:sulfato 1,7. No entanto, o glicerol como única fonte de carbono e o pH abaixo de 4,5 resultou em outras rotas metabólicas provocando o acúmulo de AVT.

A forma de adição de metais, na concentração de projeto, sem adaptação prévia, de forma crescente inserida, se mostrou inadequada, acarretando toxicidade à biomassa. Além disso, a precipitação dos sulfetos metálicos esteve associada à queda do pH, que promove danos ao metabolismo microbiano, tornando o acúmulo de ácidos irreversível.

As análises de sequenciamento indicaram que o Domínio *Bacteria* correspondeu a 99,8 % da biomassa presente do reator DFSBR na Fase VI, enquanto arqueas representaram menos

de 0,2 % da abundância relativa. Na Fase VI, 58 % da oxidação do glicerol foi relacionado à sulfetogênese, enquanto 42 % foi resultante do metabolismo de bactérias fermentativas e arqueas metanogênicas.

Os gêneros *Zymophilus*, *Pectinatus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Geotoga*, *Acidaminococcus* e *Paludibacter* foram os mais abundantes identificados na biomassa do reator DFSBR e o sintrofismo entre BRS e fermentativas possibilitou a sulfetogênese em ambiente ácido e com metais em solução, mas a ausência de bactérias oxidadoras completas levou ao acúmulo de acetato.

Para melhores resultados de eficiência do tratamento aplicado, recomenda-se a adequada aclimação da biomassa às condições ácidas ou a seleção prévia de inóculo com diversidade de microrganismos acidofílicos e o adequado aumento gradual na dosagem de metais a fim de evitar a necessidade de pós-tratamento devido à elevada concentração de acetato no efluente.

## Capítulo 5

### Tratamento biológico da drenagem ácida de mina real e remoção de elementos terras raras e outros metais

#### RESUMO

A DAM real contendo uma alta concentração de sulfato ( $\sim 1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), metais dissolvidos, urânio e elementos terras raras (ETR) foi tratada utilizando um reator biológico de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR). O reator foi operado em modo de fluxo contínuo por 175 dias e a temperatura foi mantida a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . A DAM sintética foi gradualmente substituída pela DAM real em 20 (Fase II), 50 (Fase III) e 75% (Fase IV) do volume médio total. Utilizou-se a vinhaça da cana-de-açúcar como doador de elétrons. O pH afluente do reator diminuiu de 6,9 (Fase I) para 4,6 na Fase IV. Os ETR e os metais de transição foram removidos da DAM real e precipitados no reator DFSBR. A redução de sulfato alcançou  $67 \pm 22\%$  na Fase II e a remoção de DQO foi superior a 56% nas Fases I e II. A remoção de La, Ce, Pr, Nd, Sm e Y foi superior a 70% nas Fases II e III, enquanto Fe, Al, Si e Mn foram removidos com eficiências de 79, 67, 48 e 25%, respectivamente. *Paludibacter*, *Treponema*, *Bacteroides*, *Acetivibrio* e *Clostridium* foram os gêneros de bactérias fermentativas com elevado potencial de adaptação e *Desulfovibrio* a BRS em maior abundância aderida ao material suporte do reator na Fase IV. Os resultados destacaram o potencial uso do DFSBR no tratamento da DAM, oferecendo possibilidades de redução simultânea de sulfato e recuperação de metal e ETR em uma única unidade.

#### 5.1 Introdução

A drenagem ácida de mina (DAM) é um grave problema ambiental que afeta os ecossistemas aquáticos e terrestres, bem como a saúde humana. A DAM é caracterizada como um efluente ácido com elevadas concentrações de sulfato e metais dissolvidos (Johnson; Hallberg, 2005). Os problemas associados ao descarte inadequado da DAM e a falta de tratamento e recuperação de metais representam um desafio ambiental que pode ser agravado por desastres, como o que ocorreu nas cidades de Mariana e Brumadinho-MG, Brasil (Armstrong et al., 2019; Hatje et al., 2017).



Dentre os desafios para o tratamento da DAM, destaca-se a grande quantidade de drenagem gerada em minas desativadas, que exigem tecnologias necessárias capazes de integrar soluções econômicas e ambientalmente amigáveis para limitar os extensos danos causados pelas liberações desse efluente no solo.

A vazão da DAM, em apenas uma das diversas lagoas presente em Caldas-MG decorrente das atividades das Indústrias Nucleares do Brasil (INB), a BF4, por exemplo, pode atingir  $160 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  durante a estação chuvosa. As águas ácidas provenientes das lagoas da INB foram caracterizadas por Miekeley et al. (1992), e devido ao baixo pH em torno de 3, foram detectadas elevadas concentrações de metais dissolvidos, incluindo elementos de terras raras e ítrio (ETR), com concentrações que variam de 0,5 a  $71 \text{ mg L}^{-1}$ .

A presença de ETR também é abundante em várias outras DAM e, quanto menor o pH dessas águas residuárias, maior é a concentração de ETR e outros metais como Al, Mn, Cu e Zn liberados na água (Cravotta, 2008; Stewart et al., 2017). De acordo com Zhao et al. (2007), a modelagem de especiação para as amostras da DAM indicam que os complexos de ETR-sulfato é a principal forma de concentração de ETR dissolvida nas DAM, representando mais de 60% da quantidade total, seguida pela forma de espécies de metais livres.

Devido ao amplo uso dos ETRs em várias aplicações tecnológicas e à grande demanda por esses elementos por países como a China, que agora detém a maior parte da produção de ETR, há uma grande procura desses elementos no mundo, aumentando assim seu valor econômico (Schlinkert; van den Boogaart, 2015).

Uma vez que as estratégias de tratamento físico-químico da DAM estão geralmente associadas aos elevados custos com produtos químicos, principalmente hidróxidos para a neutralização (Johnson; Hallberg, 2005), o tratamento biológico baseado na tecnologia anaeróbia tem sido amplamente proposto, integrando baixos custos de insumos químicos e possivelmente a recuperação de metais das águas residuárias na forma de sulfetos metálicos (Gallegos-Garcia et al., 2009; Lewis, 2010).

Com base nos resultados e lacunas do conhecimento encontrados na literatura, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do DFSBR, no tratamento biológico de uma DAM real com expressiva concentração dos elementos Al, Fe, Mn, Si, U e ETR, visando também o potencial da recuperação de tais elementos.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Configuração do biorreator

O DFSBR foi operado a 30 °C e o TDH variou entre 16 e 18,5 h (Figura 5. 1). O reator foi operado por 180 dias distribuídos em quatro fases operacionais. A biomassa de um reator UASB tratando o efluente de um abatedouro de aves foi usada para inocular o material suporte de acordo com o procedimento descrito por Godoi et al. (2017b).

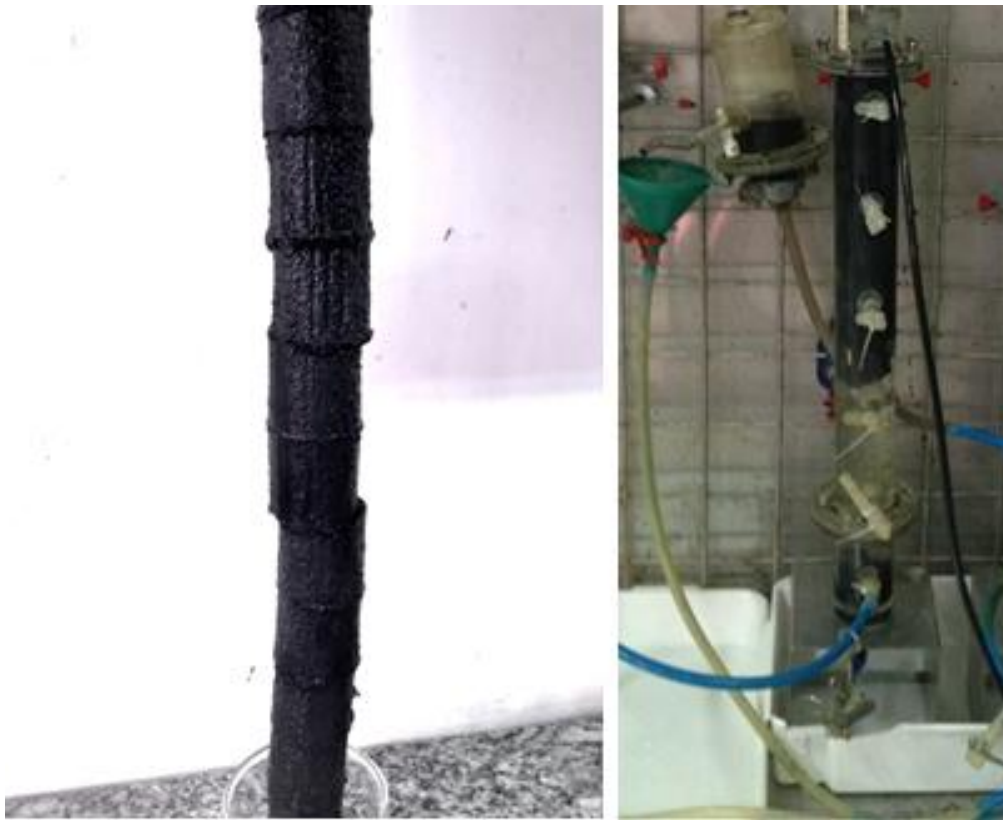


Figura 5. 1- Imagens do material suporte inoculado e do reator de leito estruturado e fluxo descendente (DFSBR).

### 5.2.2 Caracterização da DAM real

A DAM foi coletada de uma lagoa ácida da mina de urânio Osamu Utsumi, denominada BNF (BF4) (Figura 5. 2). A lagoa está localizada em Caldas-MG, operada pela INB e teve sua atividade encerrada em 1998. De acordo com o levantamento realizado por Cravotta (2008), a DAM utilizada no presente estudo possui a maior concentração de ETRs já descrita na literatura

e elevada concentração de metais dissolvidos. O pH da água da mina varia entre 3 e 4 e a concentração de seus principais elementos está descrita na Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Caracterização da água da mina real usada para tratamento biológico.

Elemento	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	ETR	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )
Al	131,5 ± 6,6	La	40,1
Mn	75,6 ± 9,6	Ce	24,9
Fe	1,2 ± 0,1	Pr	3,6
Zn	10,9 ± 0,7	Nd	9,55
Mg	6,1 ± 0,4	U	4,15 ± 0,2
Si	17,2 ± 5,6	Y	4,10 ± 0,4
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	890±80		



Figura 5. 2- Imagens de satélite destacando as principais lagoas de DAM da INB (Google). Onde: R.A- Ribeirão das Antas; BIA- Bacia Ivan Antunes (BF8); T.P- Planta de tratamento físico-químico da DAM; BF4- Bacia Nestor Figueiredo (BNF) 1-lagoa velha e 2- lagoa nova com manta impermeabilizante.

Fonte: Imagens de satélite- Google e demais imagens do autor.

### 5.2.3 Doador de elétrons

Para fornecer carbono e nutrientes que favoreçam o metabolismo das redutoras de sulfato, a vinhaça da cana-de-açúcar foi utilizada como o doador de elétrons do processo. Esse subproduto é gerado ao longo da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil e consiste em um efluente rico em material orgânico, bem como metais (Tabela 5.2). A digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar tem sido amplamente relatada na literatura (Fuess et al., 2019, 2016; Gonçalves et al., 2007; Nadaleti et al., 2020; Niz et al., 2019; Parsaee et al., 2019) e se mostrou adequada como apresentado no Capítulo 3, portanto o seu uso para a redução biológica de sulfato é considerada uma alternativa interessante.

Tabela 5.2- Caracterização da vinhaça da cana-de-açúcar usada como a fonte de C e nutrientes.

Analito	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Analito	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )
Al	5,84	Cu	0,366
Mn	23,28	Ti	0,228
Fe	134,1	Ni	0,204
Zn	1,48	P	147,4
Mg	1907	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2418
Si	53,5	Ca	1614
Cr	0,07	DQO	15. 10 <sup>4</sup>

### 5.2.4 Fases operacionais

O estudo foi dividido em 4 fases operacionais. Durante a Fase I, o biorreator foi alimentado com uma mistura de vinhaça e DAM sintética, consistindo apenas em uma alta concentração de sulfato para desenvolver e enriquecer a biomassa redutora de sulfato. Durante as Fases II, III e IV, a DAM sintética foi substituída gradualmente pela DAM real até atingir 20% (Fase II), 50% (Fase III) e 75% (Fase IV) do volume tratado. A razão DQO:sulfato aplicada variou de  $1,5 \pm 0,4$  a  $2,1 \pm 0,7$ , a fim de fornecer matéria orgânica acima da razão estequiométrica para redução de sulfato (0,67). O pH afluente na fase inicial (tratamento da vinhaça suplementada com sulfato) foi de  $6,9 \pm 0,6$ , enquanto após a aplicação da DAM real em 75%, o pH afluente foi ajustado com NaOH para 4,6 (Tabela 5.3). O sólido precipitado foi coletado do fundo do DFSBR em cada fase operacional para análise do material precipitado.

Tabela 5.3- Valores de concentração média afluyente de pH, sulfato, DQO e metais no DFSBR.

Fase		I (41 d)	II (18 d)	III (71 d)	IV (64 d)
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )		980±180	1150±71	1020±70	985±144
DQO (mg L <sup>-1</sup> )		1530±556	2000±111	1980±519	1770±450
DQO:sulfato		1,5±0,4	1,7±0,2	2,1±0,7	1,8±0,5
pH afluyente		6,9±0,6	5,4±0,2	5,1±0,1	4,6±0,2
Conc. Af. (mg L <sup>-1</sup> ):	Al	-	25±11	71±27	96±18
	Fe	-	8±4	11±8	6±2
	Mn	-	15±2	31±2	62±5
	Si	-	8±3	12±5	11±2
	La	-	8±4	18±6	29±10
	Ce	-	6±3	14±6	18±6
	Pr	-	0,4±0,3	1,0±0,4	3,0±0,4
	Nd	-	2±1	5±2	7±3
	Sm	-	0,2±0,1	0,6±0,3	0,8±0,3
	Y	-	0,8±0,5	2,0±0,7	3,2±0,4
	U	-	1,1±0,6	3,7±2,0	3,2±1,4

### 5.2.5 Métodos analíticos

DQO, sulfeto total (ST) e alcalinidade foram determinadas de acordo com Standard Methods (APHA et al., 2012). O pH das amostras era medido imediatamente após a coleta. As amostras filtradas foram acidificadas com HNO<sub>3</sub> para a análise de sulfato, ETRs e metal(óides) por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O material acumulado na parte inferior do biorreator também foi analisado por ICP-OES. Os limites de detecção foram (mg L<sup>-1</sup>): Al <0,001, Fe, Mn, Sm e Y <0,002 Si <0,009, La <0,005, Ce <0,008, Pr e Nd <0,004 e U <0,040.

### 5.2.6 Análise da diversidade microbiana

Para a análise metagenômica, a amostra de biomassa aderida ao material suporte do reator DFSBR do dia 126 de operação foi submetida à extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene RNAr 16S, de acordo com a metodologia descrita na seção 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3, respectivamente.

### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Remoção do sulfato e DQO

A oxidação da matéria orgânica associada à redução de sulfato foi alcançada com sucesso na primeira fase operacional, quando a vinhaça suplementada com sulfato foi tratada. Na Fase I, foram observados  $62 \pm 14\%$  de remoção de DQO e a média de remoção de sulfato foi de  $54 \pm 22\%$ , atingindo 87% nos últimos dias, indicando o estabelecimento do processo de redução de sulfato (Figura 5. 3). Durante a Fase II, com 20% de DAM real, a remoção de DQO e sulfato alcançou  $56 \pm 6\%$  e  $67 \pm 22\%$ , respectivamente (Figura 5. 4).

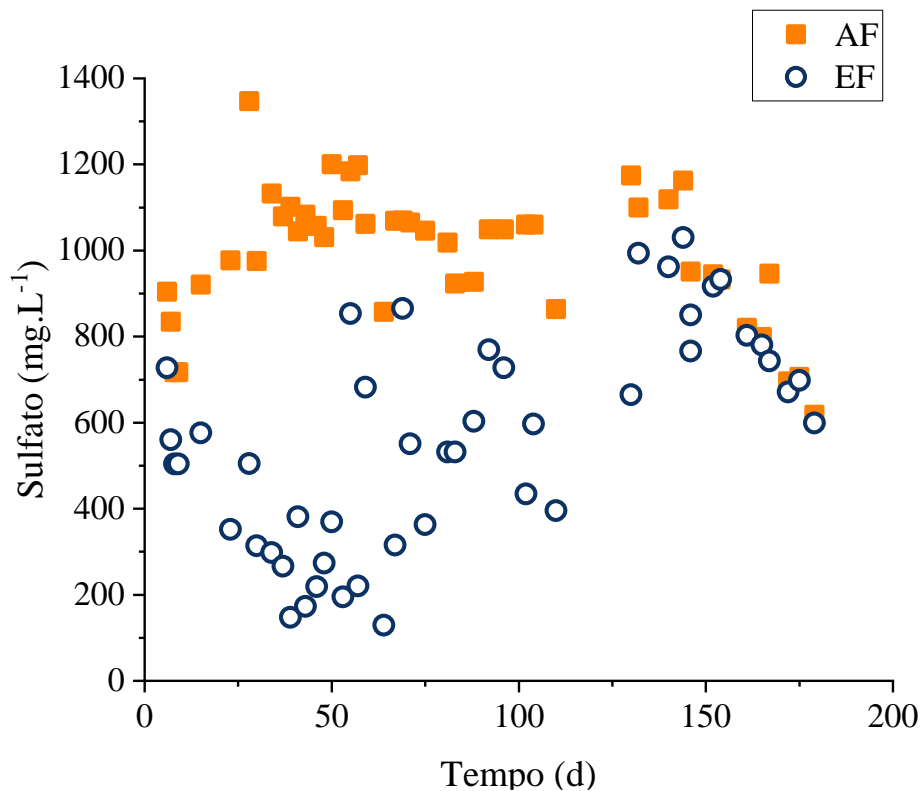


Figura 5. 3- Concentração de sulfato afluente (■) e efluentes (○).

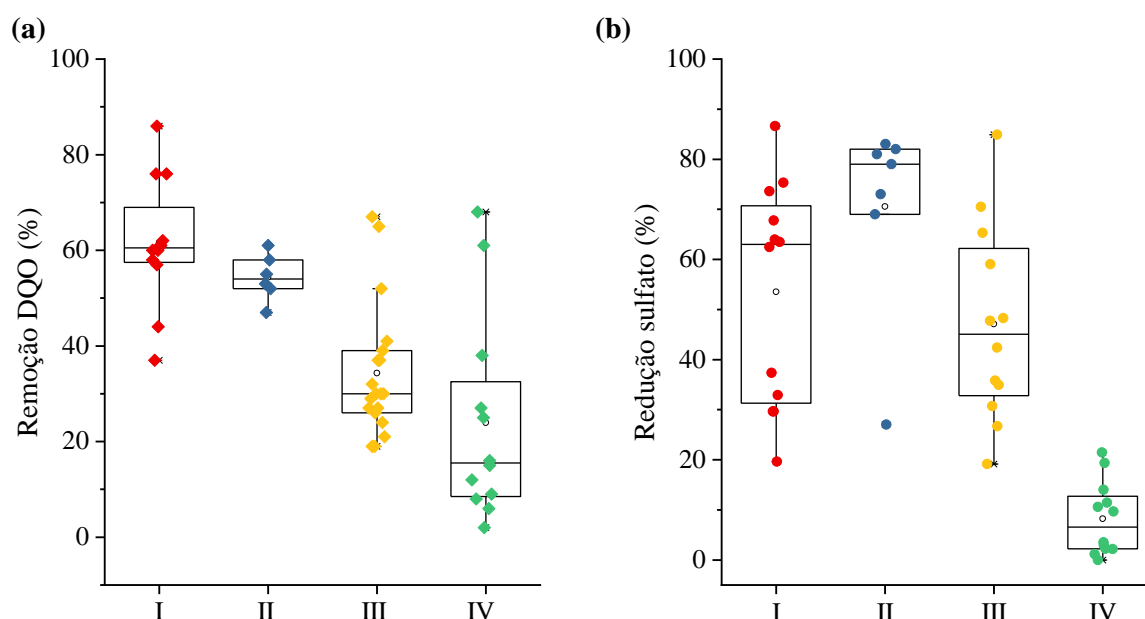


Figura 5. 4- Análise boxplot da remoção de DQO (a) e remoção de sulfato (b) nas diferentes fases.

Embora a mudança da concentração de DAM não tenha afetado o desempenho do reator no início da Fase III, no meio desta fase a remoção de DQO caiu para 30%, ficando muito instável. A maior concentração de metais dissolvidos e o baixo pH (em torno de 5,0) nas Fases III e IV (50% e 75% de DAM) podem ter comprometido seriamente a sulfetogênese, levando a reduções expressivas nas eficiências de remoção de DQO e sulfato, próximas a 20% e 10%, respectivamente.

Estequiometricamente, a sulfetogênese foi responsável pela oxidação de 37, 46, 53 e 25% da DQO removida nas Fases I, II, III e IV, respectivamente. Embora a produção de biogás não tenha sido medida neste estudo, a metanogênese parece ser uma importante via complementar de remoção de DQO, provavelmente resultado da razão DQO:sulfato próxima a 2, que possibilita a participação da metanogênese no processo global de remoção de matéria orgânica (Godoi et al., 2015).

### 5.3.2 Sulfeto

Após o estabelecimento da sulfetogênese no DFSBR durante a Fase I, o reator apresentou  $129 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfeto total no efluente. Durante a Fase II, apesar da menor eficiência de remoção de sulfato observada, o incremento de sulfato no afluente (Tabela 5.3)

possivelmente estimulou a redução de sulfato, promovendo o aumento observado de sulfeto, que atingiu  $210 \pm 40 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 5. 5), apesar do aporte de metais e da precipitação desses.

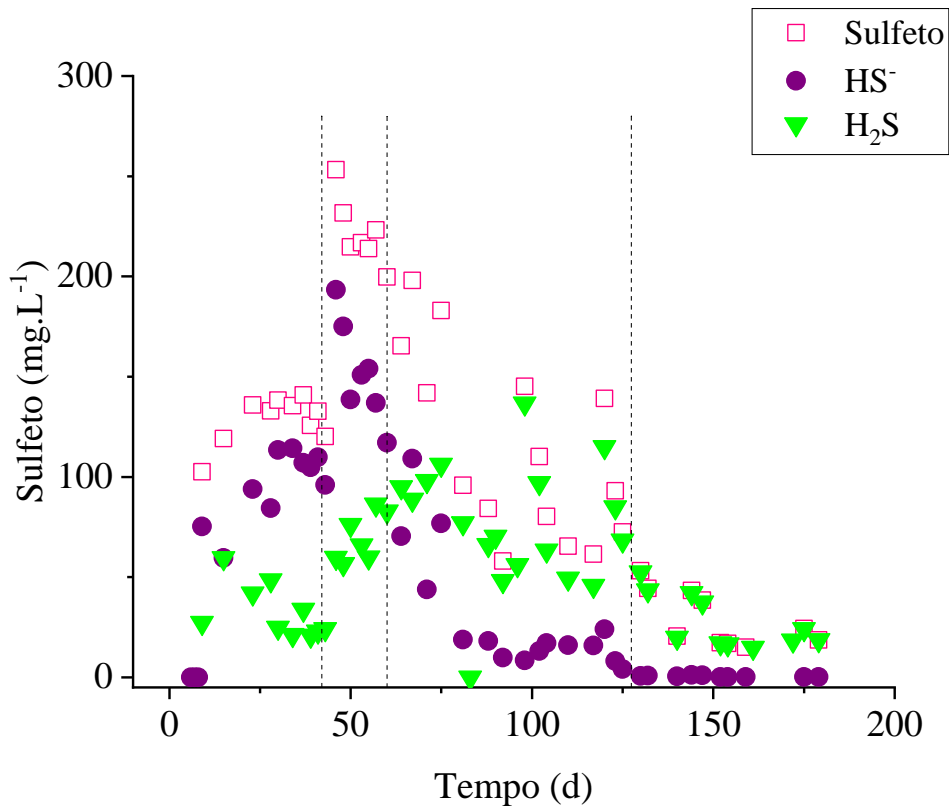


Figura 5. 5- Concentração total de sulfeto (■), ânion bissulfeto como  $\text{HS}^-$  (●) e o sulfeto de hidrogênio (▼).

Na Fase III, a concentração de sulfeto diminuiu para  $107 \pm 53 \text{ mg L}^{-1}$ , associada à redução na eficiência da sulfetogênese e à precipitação de sulfetos metálicos (Figura 5. 5). Devido à baixa redução de sulfato, menos de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfeto foi gerado no sistema na Fase IV, quando a sulfetogênese foi severamente afetada e a concentração de sulfato de saída permaneceu instável.

Uma vez que a toxicidade do sulfeto em sistemas biológicos é geralmente atribuída à forma molecular ( $\text{H}_2\text{S}$ ) do sulfeto de hidrogênio (Lens et al., 1998), a especiação das formas de sulfeto na fase líquida foi estimada e o  $\text{H}_2\text{S}$  alcançou uma concentração máxima de  $136 \text{ mg L}^{-1}$  somente no dia 98 do presente estudo, possivelmente não atingindo níveis tóxicos aos microrganismos.



### 5.3.3 Alcalinidade e pH

A alcalinidade produzida aumentou o pH médio do sistema de cerca de 7,0 para 7,5 na Fase I, de 5,4 para 7,4 na Fase II, de 5,0 para 6,4 na Fase III e de 4,7 para 5,2 na Fase IV (Figura 5. 6). Na Fase I (ausência de metais dissolvidos) foram produzidos  $1456 \pm 190$  mg de  $\text{CaCO}_3$   $\text{L}^{-1}$ . Embora a adição de DAM não tenha afetado a redução de sulfato na Fase II, a alcalinidade total no efluente do DFSBR oscilou para  $1331 \pm 96$  mg $\text{CaCO}_3$   $\text{L}^{-1}$  (Figura 5. 6). Provavelmente, essa diminuição está relacionada à liberação de prótons causada pela precipitação de sulfeto de metal e pelo consumo de  $\text{HS}^-$  devido à precipitação de sulfeto metálicos (Godoi et al., 2017a).

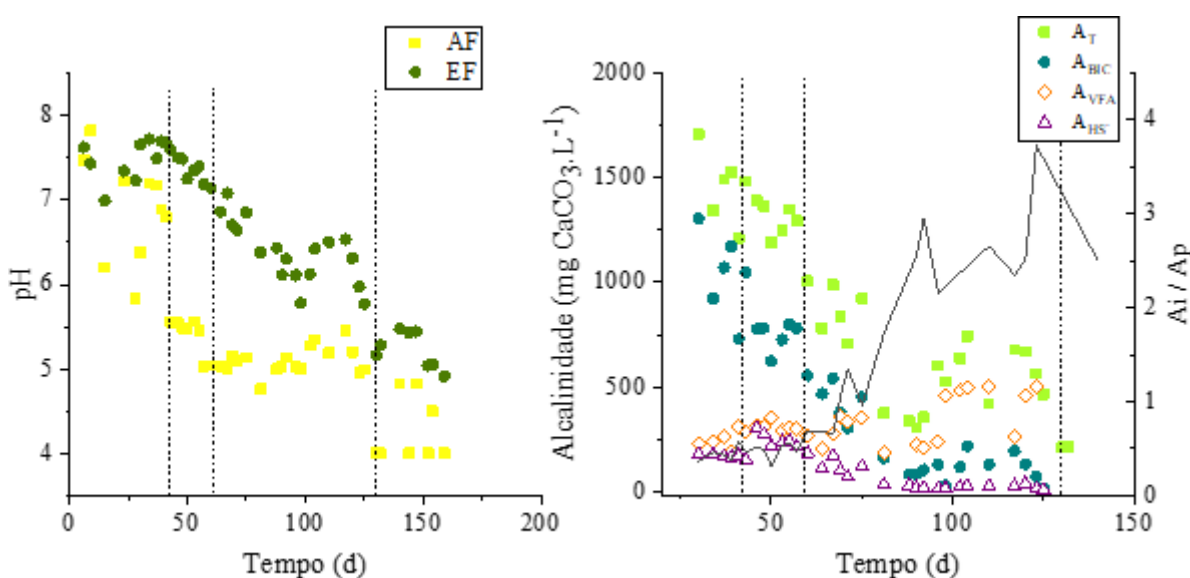


Figura 5. 6- pH afluente (■) e pH efluente (●) (a); Alcalinidade total- $A_T$  (■) alcalinidade a bicarbonato- $A_{BIC}$  (●) alcalinidade a ácidos voláteis- $A_{VFA}$  (◆) e alcalinidade a sulfeto- $A_{HS^-}$  (▲) como concentração de  $\text{CaCO}_3$  e (—)  $A_i / A_p$  (b).

Durante a Fase III, com o aumento da concentração de metais e a diminuição da eficiência da redução de sulfato, a produção de alcalinidade total caiu para  $626 \pm 219$  mg $\text{CaCO}_3$   $\text{L}^{-1}$ . A alcalinidade devido a sulfeto na Fase I correspondeu a  $172 \pm 6$  mg  $\text{CaCO}_3$   $\text{L}^{-1}$ , na Fase II  $236 \pm 48$  mg $\text{CaCO}_3$   $\text{L}^{-1}$  e na Fase III  $54 \pm 58$  mg $\text{CaCO}_3$   $\text{L}^{-1}$ .

A razão  $A_i / A_p$  (alcalinidade intermediária / alcalinidade parcial) aumentou de  $0,4 \pm 0,1$  (Fases I e II) para  $1,9 \pm 1,0$  na Fase III, demonstrando a instabilidade da digestão anaeróbia pelo acúmulo de ácidos voláteis, após o aumento da concentração da DAM.

Rodriguez et al. (2012), trabalhando com a DAM coletada na mesma mina de urânio, também relataram instabilidade na geração de alcalinidade e consequente diminuição do pH

efluente. O baixo pH da DAM associada aos metais dissolvidos podem ser as principais causas para a queda de eficiência observada no sistema a partir da Fase III.

O acúmulo de ácidos voláteis totais ao longo das Fases III e IV, em que o pH esteve abaixo de 7,0, pode sugerir que a inibição da redução de sulfato esteja relacionada ao aumento da concentração da forma livre de ácido acético, que é mais expressivo em valores de pH abaixo de 6,2 (Reis et al., 1992). No entanto, tal hipótese não pode ser confirmada uma vez que o ácido acético não foi determinado individualmente.

#### 5.3.4 Remoção dos metais terras raras e outros metaloides

Os resultados referentes à remoção de metais de transição e dos ETRs estão apresentados nas Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente. A precipitação dos metais de interesse se relaciona à manutenção da sulfetogênese e metanogênese, ainda que com eficiências da ordem de 20%, porém mantendo o pH em valores acima de 5,0 e produzindo sulfeto, necessários para a precipitação dos metais no DFSBR.

Embora o Mn precipite geralmente em torno de pH 9,0 (Ayora et al., 2016), durante as Fases II e III, o tratamento foi capaz de remover em média 35 e 20%, respectivamente, quando o pH efluente era superior a 6,0. Na Fase IV, quando o pH caiu para menos de 6,0, o Mn manteve-se na forma dissolvida. A remoção incipiente de Mn em comparação com os outros analitos deve-se ao elevado produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ) do MnS e à complexidade das interações que governam a solubilidade do Mn (Bekmezci et al., 2011; Santos; Johnson, 2017).

Os elementos Al e Fe, amplamente associados à DAM (Ayora et al., 2016; Kefeni et al., 2017; Sun et al., 2012), apresentaram remoção de eficiência semelhante em torno de 70% nas Fases II e III, e caíram nas últimas fases para menos de 40%. Apesar da eficiência de remoção semelhante, a pequena concentração de Fe provavelmente precipitou como sulfeto (FeS) e o Al como hidróxido quando o pH efluente aumentou de 5 para em torno de 7 nas Fases II e III. A alta concentração de sulfeto dissolvido pode ter favorecido a formação de sulfetos metálicos, precipitando parcialmente com os metais de transição.

De acordo com a constante de dissociação ácida ( $pK_a$ ) do Al, valores de pH entre 1,5 e 6,0 promovem a formação de complexos de sulfato de Al na DAM, e para valores de pH acima, o Al está presente como complexos de hidróxido (España, 2007). Falagán et al. (2017b) também encontraram o Al na forma de hidroxissulfato e outras formas sob pH 5.

O metaloide Si está geralmente presente na DAM como Si(OH) e geralmente tem o mesmo comportamento do Al devido à carga e raios iônicos semelhantes ( $Al^{3+} = 0,5\text{Å}$  e  $Si^{4+} =$

0,47Å) (Caraballo et al., 2019). Estudos reportados na literatura sugerem que o Si poderia co-precipitar como hidrobasaluminita em pH 6 (Caraballo et al., 2019) e Sánchez-España et al. (2018, 2016) também relataram a interação entre Si e Al em condições bióticas e abióticas em ambientes ácidos.

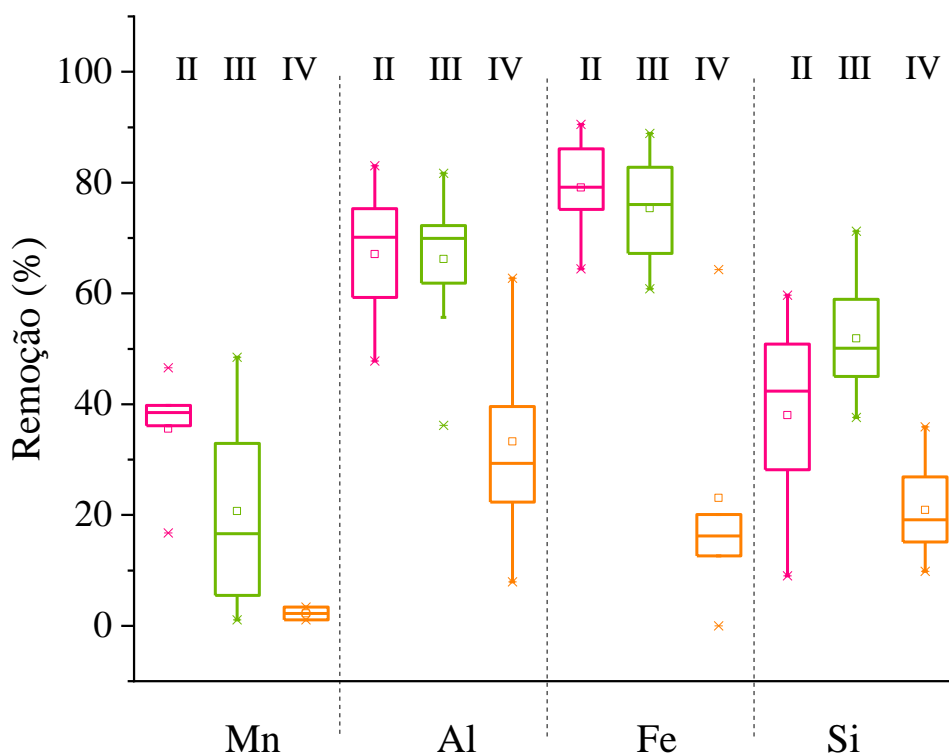


Figura 5. 7- Análise boxplot de metais de transição e remoção de metaloides Si nas Fases II, III e IV.

Em relação aos ETRs, La, Ce, Nd e Y foram removidos no DFSBR com eficiência média superior a 70%, enquanto Pr e Sm apresentaram eficiências de remoção superior a 80% na Fase II (Figura 5. 8). Comparando com outras DAM já caracterizadas, contendo ETRs dissolvidos, o DFSBR foi capaz de tratar a maior concentração dos terras raras já descrita (Miekeley et al., 1992; Zhao et al., 2007; Sun et al., 2012 e Stewart et al., 2017). A remoção obtida sugere que eles podem ser co-precipitados com alumínio ou ferro férrico (Stewart et al., 2017), como sulfeto metálico ou diretamente como  $\text{ETR}(\text{OH})_3$  (Ziemkiewicz; Water, 2016).

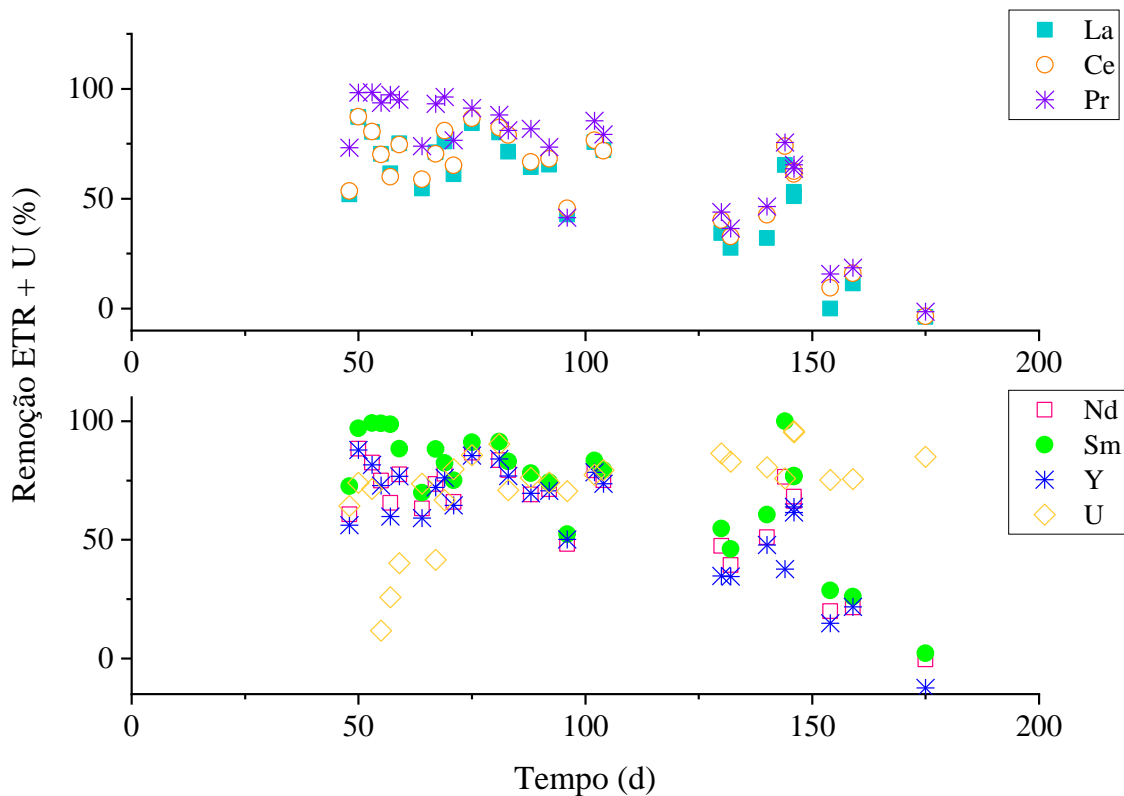


Figura 5. 8- Remoção de ETR e U da fração dissolvida.

A remoção dos TRs e metais no DFSBR por precipitação foi confirmada em cada descarga de material do fundo cônico do reator. A análise do lodo indicou quantidades expressivas de vários elementos (Tabela 5.4). A segunda câmara do sistema, usada como equalizador do nível da água (Figura 5. 1), também foi útil para reter o lodo rico em metais (Tabela 5.4).

A maior concentração de ETR precipitado foi alcançada para o La, que atingiu  $696 \text{ mg L}^{-1}$  no lodo coletado. Na mesma amostra, o Al acumulou-se em uma concentração de até  $2 \text{ g L}^{-1}$ . A concentração dos metais detectados foi proporcional ao valor considerado nas águas residuárias que estavam alimentando o biorreator. A alta concentração de ferro acumulado na biomassa sugere que ele veio da vinhaça, que também é rica em Fe.

Tabela 5.4- Concentração de metais precipitados em  $\text{mg L}^{-1}$

Day	La	Ce	Pr	U	Nd	Sm	Y	Mn	Al	Fe	Si
57	86	67	4	n.d	23	3	9	34	243	236	41
90	245	176	20	n.d	52	6	24	80	702	135	75
137	194	136	17	5	45	5	22	87	620	87	71
110*	696	484	55	n.d	155	15	79	735	2587	406	76

\* amostra coletada no fundo cônico do equalizador de nível de água.

Com base na concentração dos ETRs presentes na DAM real (Tabela 5.1) estima-se que, com o tratamento anaeróbio, se ao menos 50% dos elementos totais precipitassem no biorreator, a cada 100 m<sup>3</sup> de DAM tratada 4, 1, 0,5, 0,2 kg de La, Ce, Nd e Y, respectivamente, poderiam ser recuperados.

O preço do óxido de lantânio, óxido de cério, óxido de neodímio e óxido de ítrio em 2018 foi de 2, 2, 51 e 3 US\$. kg<sup>-1</sup>, respectivamente (US Geological Survey, 2019). O preço dos ETRs podem atingir mais de 500 vezes o preço do minério de ferro, por exemplo, e o ítrio é o elemento TR mais valioso analisado neste estudo. Mais de 2400 m<sup>3</sup> de DAM são gerados por dia na lagoa BF4 (apenas um dos quatro principais lagos ácidos dispostos na empresa) e esse volume é ainda maior durante as estações chuvosas.

A empresa INB gastou cerca de R\$ 1,8 mi (ou US\$ 430 mil) na compra de hidróxido de cálcio apenas em 2018 para o tratamento da DAM (que consiste na adição do álcali com o objetivo de aumentar o pH da água da mina, deixando a estação de tratamento com um pH superior a 11, de modo a evitar que o efluente tratado ao entrar em contato com águas ácidas até o ponto de lançamento, mantenha o pH próximo a neutralidade) para cumprir as leis ambientais brasileiras.

Embora o NaOH tenha sido utilizado na Fase IV, foi utilizado em pequena concentração apenas para manter o pH da entrada em torno de 4,8, a fim de não afetar a sulfetogênese e não foi adicionado para neutralizar completamente o meio. O sistema de remediação abiótica não apenas possui um alto custo operacional, mas também a geração de lodo produzido pelo tratamento físico-químico é muito superior quando comparado ao tratamento biológico (Johnson; Hallberg, 2005). Além da vantagem ambiental, o tratamento biológico também traz benefícios econômicos e parece promissor para recuperar elementos valiosos da DAM, uma vez que o material precipitado também é mais estável.

### 5.3.5 Análise da diversidade microbiana

Os índices foram calculados baseados no número de sequências classificadas em OTU. A amostra submetida ao sequenciamento *Miseq* é referente à biomassa aderida ao material suporte durante a Fase IV, quando a DAM real correspondia a 75 % do volume da alimentação. A biomassa aderida esteve em contato direto com os elementos U, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Y, Fe, Al, Si, Mn e outros (não mencionados no trabalho) durante 80 dias, em concentrações que variaram de acordo com a proporção de DAM real aplicada nas Fases II, III e IV. A concentração dos metais/metaloídes e terras raras a que a biomassa esteve em contato está

apresentada na Tabela 5.3. Os índices de diversidade e riqueza da biomassa aderida ao material suporte do reator DFSBR na Fase IV estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* da biomassa microbiana na Fase IV do reator DFSBR.

	Geral	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
Índice de diversidade Shannon (H')	3,47	3,44	1,94
Índice de Simpson (D)	0,11	0,12	0,68
Índice de Margalef	87,26	85,2	1,92
Índice de riqueza Chao1	1277	1243	21

Foram 1026 OTUs classificados no Domínio *Bacteria*, os que representaram menos de 0,1 % da abundância relativa foram 953 OTUs (AR 8,1 %) e equivalem a 93% dos OTU classificados. Apenas 14 OTUs estiveram acima dos 1 % de AR e o OTU mais abundante representou 30 % da AR total.

Os índices de Shannon (H') e Simpson (D) são utilizados para estimar a comunidade microbiana, mas há uma correlação positiva para o índice Shannon e negativa para Simpson, isso significa que quanto menor o valor de Simpson, maior a diversidade microbiana.

No trabalho reportado por Zeng et al. (2018) os índices de diversidade microbiano do lodo granular exposto às concentrações de 10 a 50  $\mu\text{M}$  (2,36 – 11,8  $\text{mg L}^{-1}$ ) de urânio (VI) por 24 h, variou de H' 4,43 a 5,14 e D 0,025 a 0,047. O índice de riqueza d 1 oscilou entre 2552 a 3440. A amostra que apresentou menor índice de riqueza Chao1 e diversidade Shannon foi a amostra em que esteve exposta à concentração de 40  $\mu\text{M}$  de U (Chao1=2552 e H'= 4,43) e o índice de Simpson de 0,047. E a amostra que obteve os melhores índices de diversidade e riqueza foi a da biomassa exposta a 10  $\mu\text{M}$  de U por 24 h (H' 5,14; D 0,025 e Chao1 3440). Enquanto a amostra que não esteve em contato com U apresentou índices de diversidade inferiores a todas as concentrações, exceto à exposta aos 40  $\mu\text{M}$  de U. Os autores concluíram que a exposição ao urânio aumentou a diversidade e a riqueza da biomassa microbiana.

Já os índices de Shannon reportados por Yan et al. (2016) do sedimento de um solo contaminado por U (>40  $\text{mg/ kg}$ ) variou conforme a profundidade do sedimento coletado. Entre 0 a 15 cm, H'= 4,272; 15 a 30 cm, H' 4,145, e; 30 a 45 cm, H'= 4,232. O solo de uma área não contaminada foi analisada nas mesmas profundidades e constataram que a diversidade foi maior no sedimento não contaminado (Yan et al., 2016).

Os índices apresentados no presente trabalho indicam boa diversidade do Domínio *Bacteria*, mas baixa diversidade de arqueas. O índice Shannon foi semelhante ao trabalho reportado por Zeng et al. (2018), embora a biomassa do presente trabalho tenha sido exposta a 80 dias ao urânio e também a outros elementos tóxicos em elevadas concentrações.

### 5.3.5.1 Análise taxonômica dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*

No total, 170257 *reads* foram classificadas em 1052 OTUs, sendo 1026 do Domínio *Bacteria* que representaram 98,5 % da abundância relativa. A Tabela 5.5 apresenta o número de OTUs, filios, classes, famílias e gêneros identificados tanto para o Domínio *Bacteria* quanto para *Archaea*. A classificação de cada OTU a nível de gênero e espécie foi considerada quando houve mais de 97 % de similaridade das sequências.

Tabela 5.5- Nº de *reads*, OTUs, filios, classes, famílias e gêneros identificados na biomassa do DFSBR na Fase IV.

	Geral	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
Nº de <i>reads</i> classificadas em OTUs	170257	167768	2448
OTUs	1052	1026	16
Número de filios	28	22	2
Número de classes	47	37	4
Número de famílias	155	140	7
Número de gêneros	288	270	10

Os 5 principais filios identificados na biomassa aderida ao material suporte do reator foram: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Proteobacteria* (do Domínio *Bacteria*) e *Crenarchaeota* (Domínio *Archaea*) que somados representaram 96,5 % da abundância relativa total, outros filios representaram 3,5 % (Figura 5. 9). Os filios mais comumente encontrados em DAM do Domínio *Bacteria* são *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes* (Méndez-García et al., 2015).

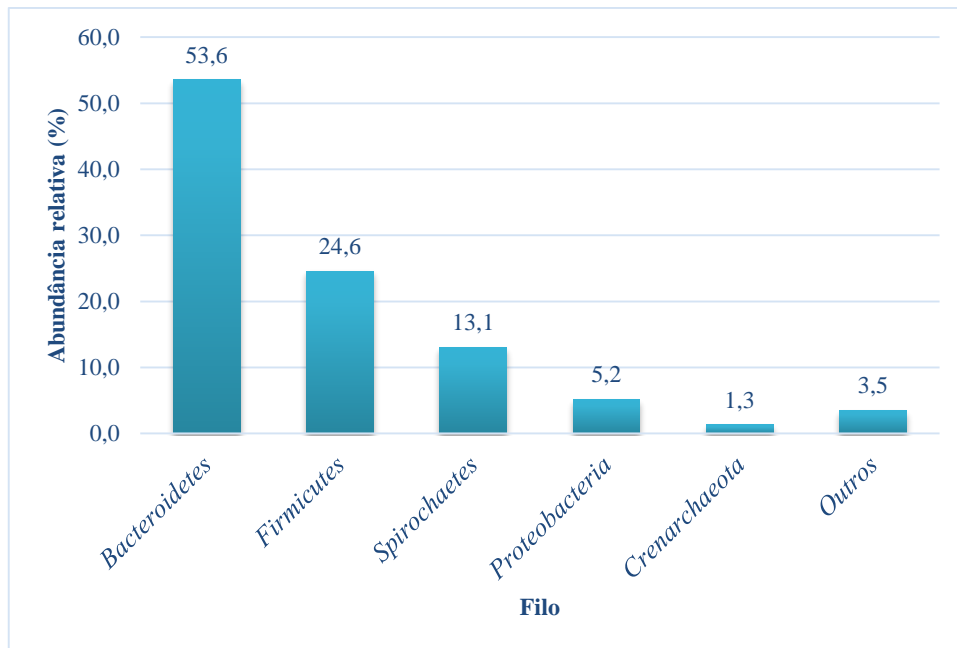


Figura 5. 9- Principais Filos do Domínio *Bacteria* e *Archaea* identificados na biomassa do material suporte do reator DFSBR.

As Arqueas representaram 1,4 % da diversidade microbiana total. As famílias identificadas foram: *Crenarchaeota* (94 %), *Methanobacteriaceae* (4,5 %), *Methanosaetaceae* (0,8 %), *Methanosarcinaceae* (0,6 %), *Thermoplasmatales* (0,2 %), *Methanoregulaceae* (0,04 %) e *Methanospirillaceae* (0,04 %). O gênero mais abundante identificado foi o *Candidatus Nitrosocaldus*, arquea autotrófica, termofílica e oxidadora de amônia (Qin et al., 2017). A presença desse gênero deve estar relacionada à vinhaça, caracterizada com elevada concentração de nitrogênio e temperatura após o processo em torno dos 90 °C (Niz et al., 2019). *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanosaeta*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter* são gêneros mais encontrados em áreas de biorremediação de DAM (Sánchez-Andrea et al., 2014).



Tabela 5.6- Gêneros do Domínio *Archaea* identificados na biomassa aderida ao material suporte na Fase IV do reator DFSBR.

Gênero	Reads	AR (%)
<i>Candidatus Nitrosocaldus</i>	2298	93,9
<i>Methanobacterium</i>	97	4,0
<i>Methanosaeta</i>	20	0,8
<i>Methanomethylovorans</i>	13	0,5
<i>Methanobrevibacter</i>	8	0,3
<i>Thermogymnomonas</i>	4	0,2
<i>Methanothermobacter</i>	4	0,2
<i>Methanosarcina</i>	2	0,1
<i>Methanospirillum</i>	1	0,0
<i>Methanolinea</i>	1	0,0

No total, foram identificados 270 gêneros de bactérias, os com abundância relativa superior a 2 % estão apresentados na Tabela 5.7 e Figura 5. 10. Os outros 263 gêneros representaram 16,3 % da diversidade microbiana.

Tabela 5.7- Principais gêneros identificados na biomassa aderido ao material suporte do reator DFSBR durante a Fase IV.

Referência	Gênero	Reads	AR (%)
A	<i>Paludibacter</i>	70732	41,5
B	<i>Clostridium</i>	21682	12,7
C	<i>Treponema</i>	21329	12,5
D	<i>Bacteroides</i>	14301	8,4
E	<i>Acetivibrio</i>	6699	3,9
F	<i>Parabacteroides</i>	4241	2,5
G	<i>Desulfovibrio</i>	3543	2,1
Outros	<i>Outros</i>	27730	16,3

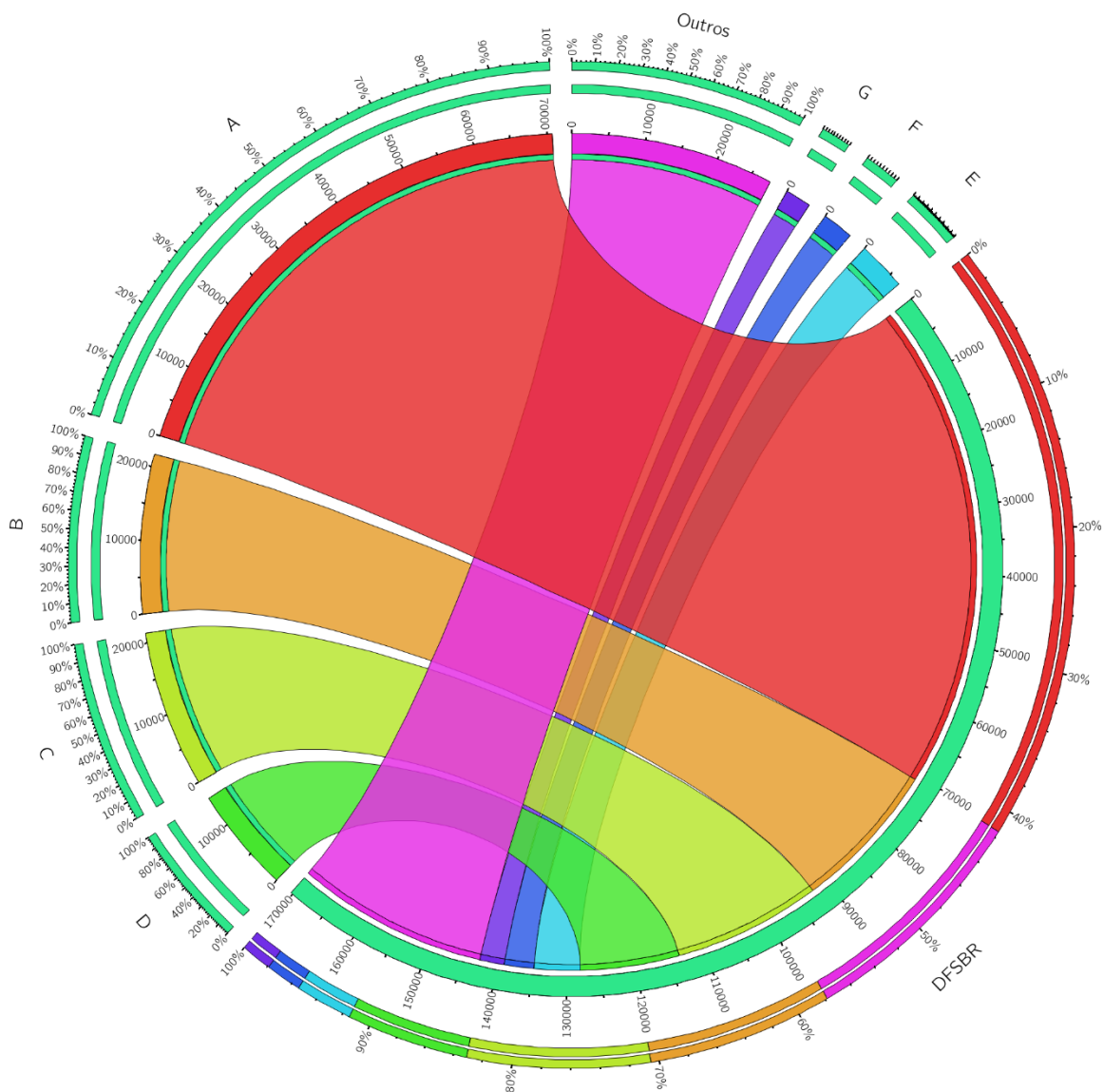


Figura 5. 10- Principais Gêneros do Domínio Bacteria identificados na Fase IV. Legenda das taxonomias: A- *Paludibacter*, B- *Clostridium*, C- *Treponema*, D- *Bacteroides*, E- *Acetivibrio*, F- *Parabacteroides* e G- *Desulfovibrio*.

O gênero *Parabacteroides* foi um dos 5 gêneros mais abundantes no lodo granular exposto a urânio nas concentrações de 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$  (Zeng et al., 2018). Quando exposto à concentração de 40  $\mu\text{M}$  de U, os gêneros *Paludibacter* e *Clostridium* representaram 4,25 e 7,18 %, respectivamente. E os gêneros *Pseudomonas* com 14,96 % e *Parabacteroides* (4,71 %) estiveram entre os 5 mais abundantes quando a concentração de U foi 50  $\mu\text{M}$  (Zeng et al., 2018).

Os gêneros de bactérias fermentativas mais abundantes no presente trabalho já foram reportados em vários estudos de caracterização microbiológica de DAM ou de reatores sulfetogênicos, como: *Paludibacter* (Ahmed et al., 2019; Guo et al., 2019; Liang et al., 2013;

Sánchez-Andrea et al., 2013; Sato et al., 2019; Zeng et al., 2018), *Clostridium* (Ahmed et al., 2019; Bertolino et al., 2014; Hu et al., 2015; Ilhan-Sungur et al., 2017; Sánchez-Andrea et al., 2011; Vasquez et al., 2018), *Bacteroides* (Hou et al., 2019; Sato et al., 2019; Vasquez et al., 2018; Zeng et al., 2019), *Acetivibrio* (Ahmed et al., 2019; Pérez et al., 2018) e *Parabacteroides* (Zeng et al., 2018; Hu et al., 2015). Somados, esses gêneros representaram 81,6 % da abundância relativa na amostra avaliada.

*Treponema*, *Bacteroides*, *Acetivibrio* e *Clostridium* são gêneros geralmente encontrados em abundância em sistemas de tratamentos biológicos que utilizam compostos complexos para a redução do sulfato (Vasquez et al., 2018; Sánchez-Andrea et al., 2014).

As representantes de BRS em maior abundância foram: *Desulfovibrio* (2,1 %), *Desulfatirhabdium* (0,9 %), *Desulfosporosinus* (0,7 %) e *Desulfobacterium* (0,25 %). *Desulfovibrio* são capazes de converter o urânio solúvel (VI) em insolúvel (IV) (Yan et al., 2016).

O sintrofismo entre as BRS e as bactérias fermentativas foram essenciais para o bom funcionamento da sulfetogênese. Os gêneros *Paludibacter*, *Treponema*, *Bacteroides*, *Acetivibrio* e *Clostridium* tiveram importante papel no metabolismo da vinhaça, que é um substrato complexo, e demonstraram elevada tolerância e capacidade de adaptação às condições extremas de pH baixo e elevada concentração de metais/metaloídes, elementos terras raras e urânio presentes na DAM real, com potencial uso futuro para biorremediação de áreas de DAM.

#### 5.4 Conclusão

O emprego da vinhaça como fonte de carbono para o sistema de tratamento biológico da DAM real possibilitou a manutenção da sulfetogênese e metanogênese no reator. A alcalinidade gerada pela sulfetogênese e metanogênese foi capaz de aumentar o pH em pelo menos uma unidade, promovendo as condições para a remoção dos elementos metálicos/metaloídes Al, Fe, Mn, Si, U e TRs da fração dissolvida. Os elementos químicos precipitaram e acumularam no fundo cônico do biorreator, indicando potencial recuperação desses elementos no sistema de tratamento biológico da DAM.

A configuração do biorreator DFSBR, baseada na imobilização da biomassa no material suporte, parece adequada para tratar águas residuárias contendo alta concentração de metais, pois o material precipitado não causou a colmatação do leito.

O sintrofismo entre as BRS *Desulfovibrio*, *Desulfatirhabdium*, *Desulfosporosinus* e *Desulfobacterium* e os gêneros de bactérias fermentativas *Paludibacter*, *Treponema*,

*Bacteroides*, *Acetivibrio* e *Clostridium* foi importante para o desempenho do reator e demonstraram elevada tolerância às condições extremas impostas.

Esta pesquisa abre perspectivas para a aplicação da configuração DFSBR visando a redução simultânea de sulfato e recuperação de metal e TRs em uma única unidade, embora problemas com o desempenho do reator devam ser superados em futuras investigações para permitir a operação do sistema a longo prazo.

Finalmente, este também é o primeiro estudo a descrever um biorreator sulfetogênico tratando DAM real rica em ETRs e urânio usando a vinhaça da cana-de-açúcar como doador de elétrons.

## Capítulo 6

### Neutralização biológica e remoção de metais e elementos terras raras de efluente ácido de mina de urânio desativada

#### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o tratamento biológico anaeróbico da drenagem ácida de mina (DAM) real da mina de urânio desativada, contendo os metais Al, Fe, Mn, Si, U e os elementos terras raras (ETR) Ce, La, Nd, Pr e Y, sem a adição de alcalinizantes. Foi verificada ainda a influência da DAM real para o sistema de tratamento utilizando o glicerol como doador de elétrons e o potencial biológico para neutralização da DAM real com pH inferior a 4. O reator DFSBR de aproximadamente 2,5 L foi operado por 385 dias e a DAM sintética (Fase I) foi substituída em 20 (Fase II), 50 (Fase III) e 75% (Fase IV) por DAM real. O glicerol utilizado como doador de elétrons para a sulfetogênese possibilitou o aumento do pH efluente para próximo do neutro com a produção média da alcalinidade total gerada de  $428 \pm 77$ ,  $257 \pm 180$ ,  $363 \pm 117$  e  $253 \pm 171$  mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> nas Fases I, II, III e IV, respectivamente. A oxidação do glicerol foi superior aos 60% ao longo de toda operação e, com exceção da Fase III, a redução de sulfato média foi superior a 40%. A produção de sulfeto total dissolvido foi menor que 150 mg L<sup>-1</sup>, ficando abaixo dos valores considerados tóxicos para os microrganismos atuantes nos processos biológicos pertinentes ao sistema de tratamento proposto. A remoção do U e dos ETR foi superior aos 60% na Fase II e a remoção média do La, Ce, Nd, Pr, Y e U nas Fases III e IV correspondeu a  $92 \pm 6$ ,  $96 \pm 8$ ,  $93 \pm 6$ ,  $92 \pm 6$ ,  $96 \pm 2$  e  $94 \pm 3\%$ , respectivamente. O sintrofismo entre bactérias fermentativas (*Treponema*, *Paludibacter*, *Zymophilus* e *Clostridium*) e BRS (*Thermodesulfobium*, *Desulfovibrio*, *Pectinatus*, *Desulfobacterium*, *Caldisericum* e *Desulfosporosinus*) foi estabelecido e demonstraram elevada capacidade de adaptação ao meio moderadamente ácido, contendo metais. A configuração do reator DFSBR de único estágio mostrou-se adequada para o tratamento anaeróbico da DAM real com eficiente neutralização do efluente e a remoção superior a 90% dos principais elementos analisados.

## 6.1 Introdução

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização do glicerol como doador de elétrons no tratamento da DAM real, sem a utilização de alcalinizantes, considerando o pH afluente inferior a 4 e a elevada concentração de metais, metaloides e elementos terras raras presentes. Verificar os microrganismos envolvidos no tratamento e o potencial biológico para neutralização da DAM real com pH inferior a 4 também foram explorados.

## 6.2 Material e métodos

O reator utilizado foi o mesmo descrito na seção 2.1 (Figura 2. 3) e as análises físico-químicas descritas na seção 2.2. A análise de metais foi realizada pelo Laboratório Ambiental da INB utilizando ICP-OES, Marca: SPECTRO; Modelo Flame Modula (Figura 6. 1), de acordo com US EPA 200.7.

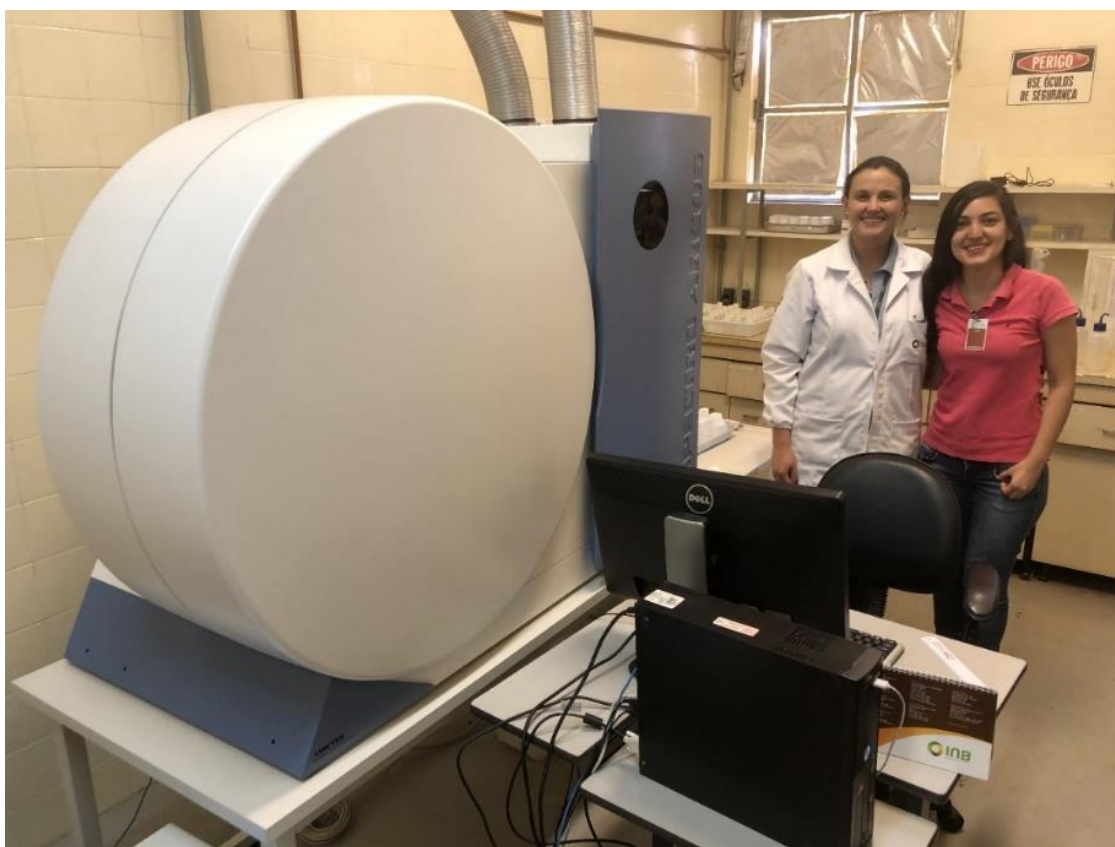


Figura 6. 1- Equipamento ICP-OES, Laboratório Ambiental- INB.

### 6.2.1 Fases operacionais

A operação do reator baseou-se na aplicação gradual da DAM (v/v). A concentração de sulfato foi mantida próxima a concentração da DAM real de 800 mg/L durante todas as fases operacionais visando o estabelecimento e manutenção da sulfetogênese. A alimentação consistiu na adição do Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suplementar para manutenção da concentração de sulfato como acceptor final de elétrons e o glicerol como o doador de elétrons. A partir do estabelecimento da sulfetogênese, na Fase II, houve a substituição do meio sintético em 20%, 50% (Fase III) e 75% (Fase IV) pela DAM real. O aumento do TDH nas Fase III teve como objetivo avaliar o seu efeito para a performance do reator. Os principais parâmetros operacionais estão descritos na Tabela 6.1.

Tabela 6.1- Valores de concentração média afluyente de pH, sulfato e DQO

<b>Fase</b>	<b>I (130d)</b>	<b>II (119 d)</b>	<b>III (51 d)</b>	<b>IV (85 d)</b>
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	873±163	886±376	834±358	907±276
DQO:sulfato	1,2±0,3	1,1±0,6	1,0±0,5	1,0±0,4
pH afluyente	6,6±0,5	4,3±0,9	3,5±0,2	3,7±0,5
TDH (h)	22±8	29±4	35±8	29±4
DAM real (%)	0	20	50	75

Foram feitos dois descartes de fundo do lodo do reator nos dias 137 (Fase II) e dia 365 (Fase IV) com volume de 300 a 500 mL e submetido a análise cromatográfica (ICP-OES) a fim de verificar a concentração de metais precipitados na parte cônica inferior do DFSBR. A partir do 266° dia de operação, manteve-se o reator DFSBR recirculando durante 30 dias devido a falta de coleta da DAM real.

### 6.2.2 Água residuária

A DAM foi coletada, em média, a cada dois meses nas lagoas BF4 (velha e nova) da INB- Caldas (Figura 6. 2). O pH da DAM coletada foi 3,4 e a concentração média dos analitos presente no afluyente em cada fase de operação está descrita na Tabela 6.2.

Tabela 6.2- Concentração média dos analitos presentes no meio para alimentação em mg L<sup>-1</sup>.

Analitos	II (119 d)	III (51 d)	IV (85 d)
Al	28,2±13,7	62,6	58,9±3,9
Fe	0,8±1,4	3,6	1,1±0,5
Mn	18,4±9,6	33,1	30,5±0,7
Si	3,7±2,1	9,0	10,3±0,4
Ce	5,5±2,7	12,0	11,7±1,0
La	9,0±4,3	25,0	20,9±1,4
Nd	2,0±1,0	4,2	3,3±0,2
Pr	0,8±0,4	1,6	1,2±0,1
U	0,9±0,6	1,3	0,6±0,3
Y	0,9±0,5	1,6	1,4±0,1



Figura 6. 2- Local de coleta da DAM para o preparo da alimentação do reator anaeróbico. A imagem apresenta as duas lagoas BF4, a lagoa nova revestida com manta impermeabilizante e a lagoa velha onde não há impermeabilização.

À alimentação foi adicionado 1 mL L<sup>-1</sup> da solução de vitaminas, composta por (g L<sup>-1</sup>): 0,002 de Biotina; 0,02 de Niacina; 0,05 de Piridoxina; 0,01 de Riboflavina; 0,02 de Tiamina;



0,01 de Cianocobalamina; 0,01 de ácido *p*-aminobenzóico, e; 0,01 de ácido pantotênico. Houve suplementação dos nutrientes fósforo e nitrogênio como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente, em  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de cada composto a partir do dia 150.

### 6.2.3 *Análise da diversidade microbiana*

Para a análise metagenômica, a amostra de biomassa aderida ao material suporte do reator DFSBR no dia 385 de operação (Fase IV- 75 % DAM real) foi submetida à extração de DNA, PCR e sequenciamento do gene RNAr 16S, de acordo com a metodologia descrita na seção 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3, respectivamente.

## 6.3 Resultados e discussão

### 6.3.1 *Remoção de DQO e sulfato*

O reator foi operado por 385 dias e a primeira fase foi para estabelecer a sulfetogênese e metanogênese, sem a adição da DAM. A remoção de DQO média foi  $60 \pm 14 \%$  na Fase I e após a introdução de DAM real em 20 % do volume final, a remoção média oscilou para  $50 \pm 26 \%$  na Fase II. Com a substituição da DAM em 50% (Fase III), a oxidação do glicerol foi superior a 80%, e na Fase VI decresceu para remoção média de 60% (Figura 6. 3).

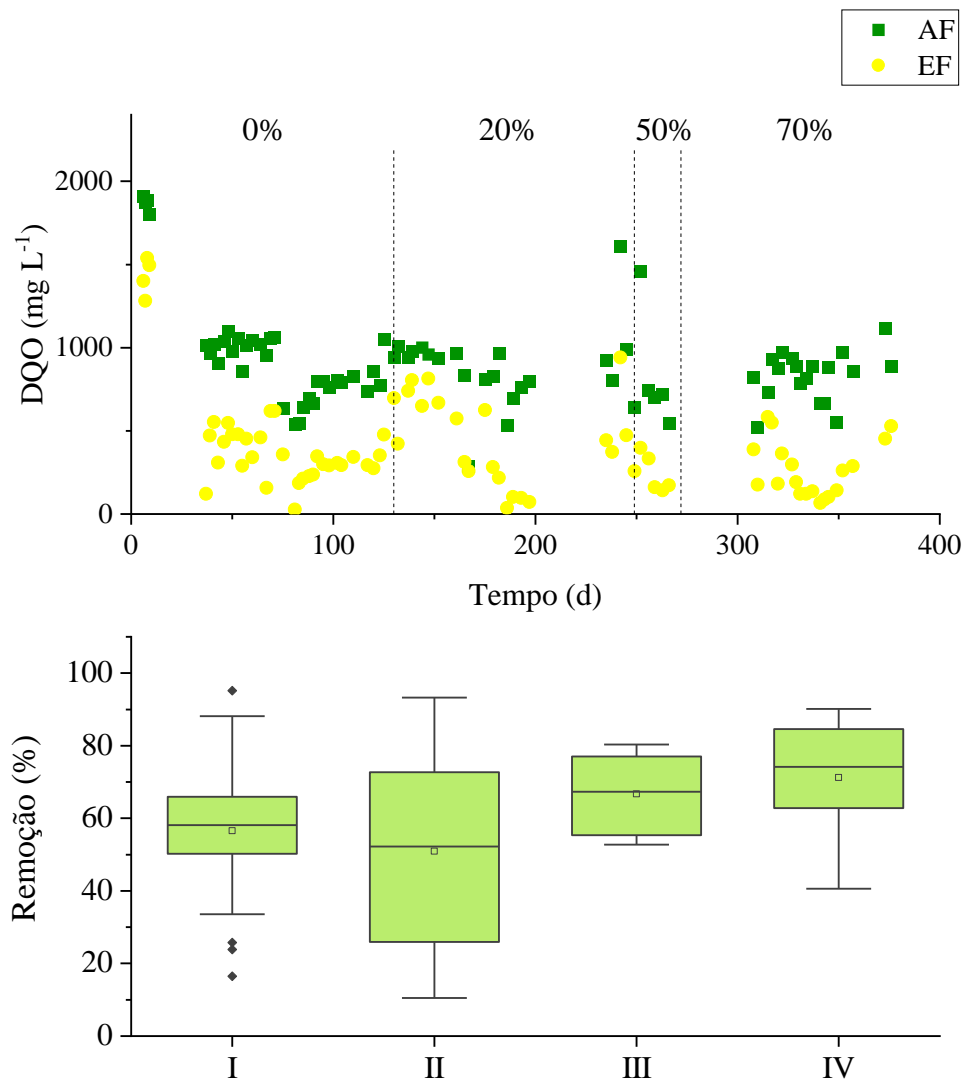


Figura 6. 3- Concentrações do glicerol afluente (■) e efluente (●) medidas como DQO e análise boxplot da eficiência de remoção de DQO nas fases operacionais.

Após a adaptação das BRS na Fase I, quando houve a substituição gradual do efluente sintético para a DAM real (Fase II), a sulfetogênese foi afetada inicialmente, mas após alguns dias, observou-se o aumento na redução do sulfato, creditada à adaptação da biomassa microbiana (Figura 6. 4). Com 50% de DAM (Fase III), a média da redução do sulfato caiu para 20%. Na Fase IV, após um período de paralisação do reator e aumento da DAM em 75%, a média de remoção foi de aproximadamente 40%, com melhora do desempenho após 327 dias de operação.

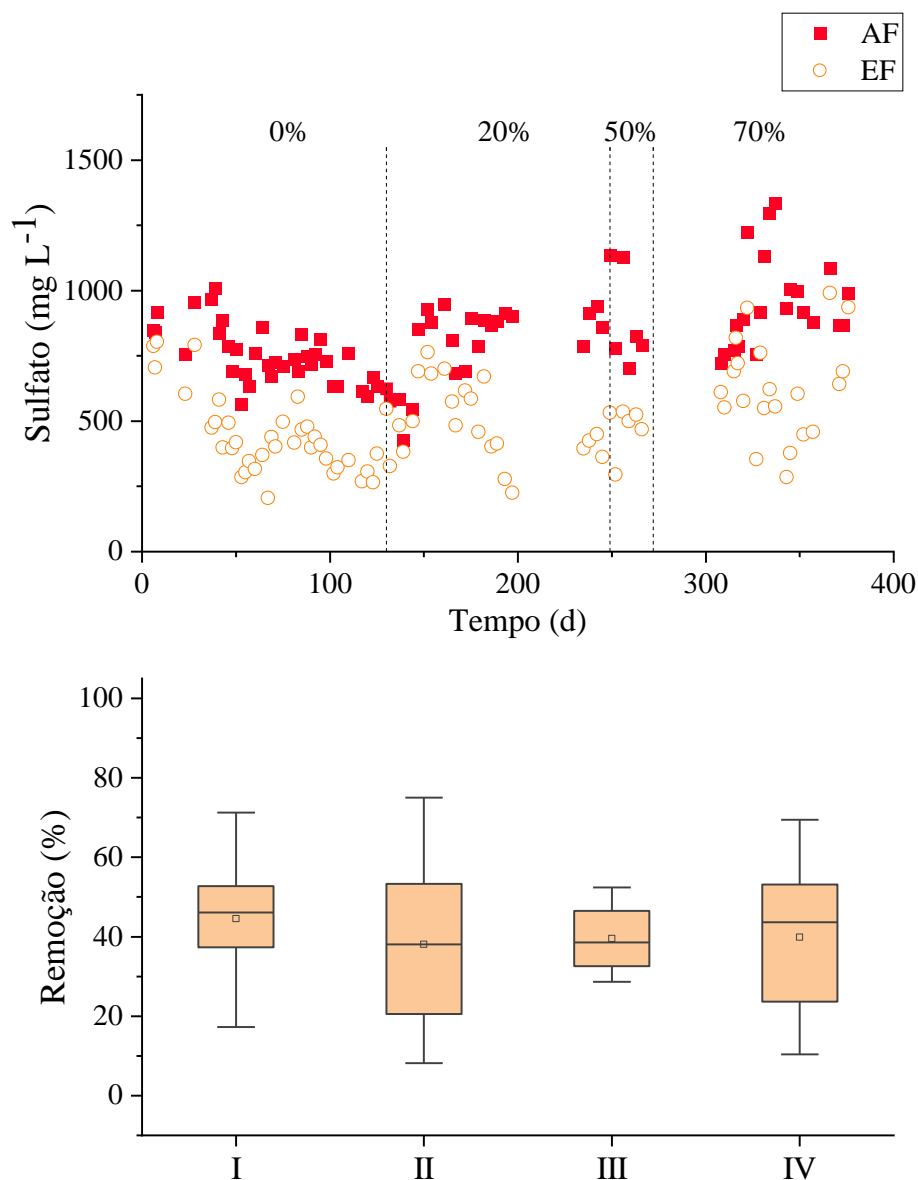


Figura 6. 4- Concentrações de sulfato afluente (■) e efluente (○) e análise boxplot da eficiência de redução de sulfato nas 4 fases operacionais.

A queda da redução do sulfato na Fase III para 20% e a elevada remoção de DQO após o período de recirculação indica que na competição entre as bactérias fermentativas, arqueas metanogênicas e BRS, as últimas tiveram seu desempenho prejudicado. A oxidação da matéria orgânica correspondeu em média a 40% via sulfetogênese. Sendo a menor participação das BRS na Fase III, enquanto na Fase II era de  $44 \pm 21$  %. A menor participação da sulfetogênese na remoção de matéria orgânica foi observada na Fase III (Tabela 6.3), o que provavelmente pode ter ocorrido devido ao baixo pH afluente de  $3,5 \pm 0,2$ , relacionado ao acúmulo de ácidos durante o período de 30 dias sem alimentação do reator (entre os dias 200 e 230), provocando maior competição entre as arqueas e as BRS e inibição das últimas. No

entanto, o sintrofismo entre as espécies foi restabelecido, como demonstrado pela melhora observada da redução do sulfato na Fase IV.

Tabela 6.3- Participação das BRS na oxidação da matéria orgânica

Fase	I	II	III	IV
% BRS (média)	44	44	37	45
Desvio	12	21	14	18

Godoi et al. (2017b) também verificaram que a participação das BRS na remoção de DQO correspondeu a aproximadamente 40%, sendo a via metanogênica a segunda mais expressiva após a via sulfetogênica, pois as condições operacionais de pH 6 e relação DQO:sulfato de 2 favoreceram essas rotas metabólicas.

No tratamento anaeróbio, as BRS geralmente competem com bactérias fermentativas, arqueas metanogênicas, homoacetogênicas e bactérias acetogênicas prótons-redutoras (Muyzer; Stams, 2008). O glicerol, por ser um composto simples, de baixo peso molecular, apresenta elevada velocidade de conversão por BRS produtoras de acetato, uma vez que BRS oxidadoras completas são de difícil obtenção, favorecendo metanogênicas acetoclásticas (Cao et al., 2012).

Nas condições aplicadas no presente estudo, com pH afluente em torno de 4 e relação DQO:sulfato de 1, o sintrofismo entre as comunidades possibilitou remoção de DQO superior a 60% ao longo de toda a operação. O estabelecimento desse sintrofismo pode estar relacionado ao pH efluente superior a 6, que possibilitou os processos sulfetogênico e metanogênico.

O aumento do TDH para  $35 \pm 8$  h na Fase III pode também estar relacionado ao bom desempenho na oxidação do glicerol, mas que não provocou o mesmo efeito para a redução do sulfato, inferindo-se que a rota de conversão do glicerol favorecida foi a fermentativa ou metanogênica. Korzhenkov et al. (2019) verificaram que em áreas de DAM, a AR de arqueas aumentam à medida que o pH diminui. De fato, arqueas estiveram presentes em abundância relativa de 46 – 58 % em sedimentos de mina ácida (pH 1,8-2,4) demonstrado no trabalho de Chen et al. (2013) e superior a 50 % da AR na mina Fankou de pH 2,32- 2,49 na província de Guangdong (Huang et al., 2011).

A diminuição do TDH de aproximadamente 2 dias para 1 dia influenciou negativamente na eficiência de remoção de DQO e na redução do sulfato, conforme reportado por Sahinkaya et al. (2018), mas após 25 dias nessas condições, a eficiência melhorou,

ultrapassando os 90% de remoção. No entanto, o pH afluente da água residuária tratada foi em torno de 7 durante toda a operação.

Cunha et al. (2019) também encontraram a presença de arqueas metanogênicas e fermentativas competindo com as BRS tratando DAM sintética com etanol em pH 4 e relação DQO:sulfato abaixo de 1. O fluxo de elétrons pela via sulfetogênica aumentou de  $68 \pm 6$  para  $75 \pm 11$  quando a relação DQO:sulfato diminuiu de 0,8 para 0,67. Sahinkaya et al. (2019) reportaram que 90% do fluxo de elétrons para a oxidação do etanol foi via redução do sulfato, quando o pH afluente era 4 e a relação DQO:sulfato de 0,75.

### 6.3.2 Sulfeto

Os valores da concentração de sulfeto produzido devido à redução do sulfato e sua especiação calculada estão apresentados na Figura 6. 5. A produção média do sulfeto total dissolvido nas Fases I, II, III e IV foi  $112 \pm 35$ ,  $67 \pm 32$ ,  $76 \pm 31$  e  $50 \pm 36$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O sulfeto na forma de H<sub>2</sub>S ficou em concentração dentro dos limites reportados como não prejudicial às populações atuantes na remoção de matéria orgânica e sulfato (Lu et al., 2016; Speece, 1983).

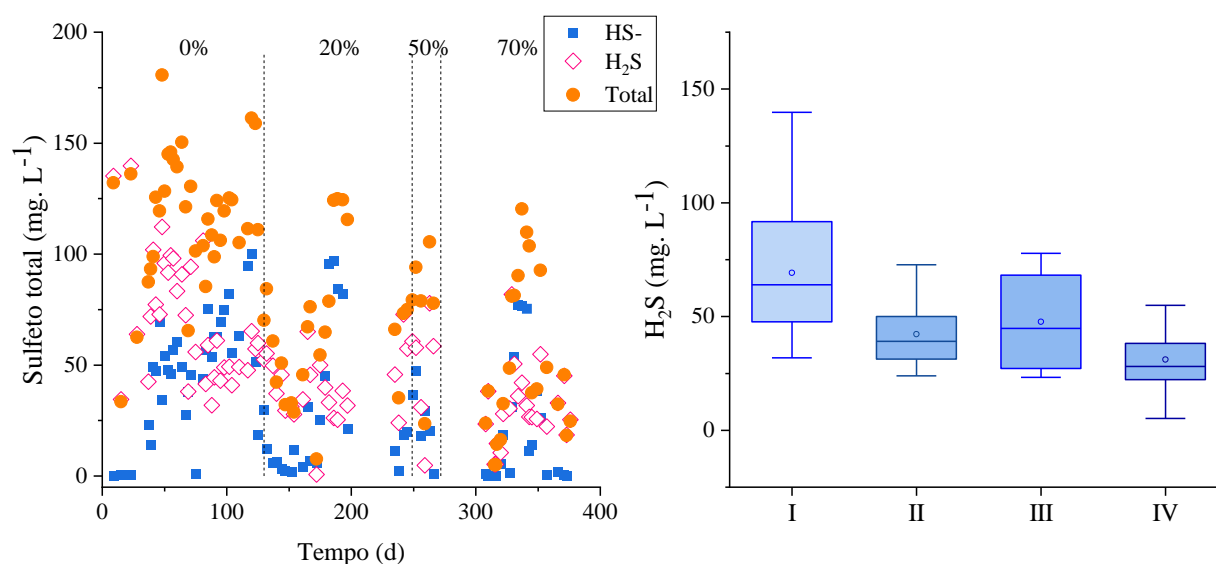


Figura 6. 5- Concentração total de sulfeto (●), ânion bissulfeto como HS<sup>-</sup> (■) e o sulfeto de hidrogênio-H<sub>2</sub>S (◇) e análise boxplot correspondente à produção de H<sub>2</sub>S.

A concentração de sulfeto total foi inferior ao sulfeto teórico calculado (Equação 6.1), o que pode ser explicado pela precipitação dos metais na forma de sulfeto (Reação 1.6) e/ou reoxidação pela intrusão de oxigênio pela bomba, uma vez que não houve fluxo do gás N<sub>2</sub> junto

ao meio de modo a expelir o  $O_2$ . Erros analíticos devido à evaporação do sulfeto de hidrogênio na forma de  $H_2S$  gasoso também é uma possibilidade para a concentração de sulfeto total inferior ao sulfeto teórico.

$$\text{Sulfeto teórico} = \frac{SO_4 \text{ removido}}{3} \quad \text{Eq. 6.1}$$

### 6.3.3 Alcalinidade e pH

A oxidação incompleta do glicerol gera o acetato como demonstrado na reação 6.3 (Kimura et al., 2006) que pode ser consumido por arqueas metanogênicas acetoclásticas (reação 6.4) (Muyzer; Stams, 2008), gerando assim alcalinidade. A alcalinidade gerada, referente tanto à sulfetogênese quanto à oxidação completa de compostos orgânicos, foi suficiente para elevar o pH de  $4,3 \pm 0,9$  para  $6,6 \pm 0,6$  na Fase II, de  $3,5 \pm 0,2$  para  $7,0 \pm 0,4$  na Fase III e de  $3,7 \pm 0,5$  para  $6,0 \pm 1,3$  na Fase IV (Figura 6. 6).

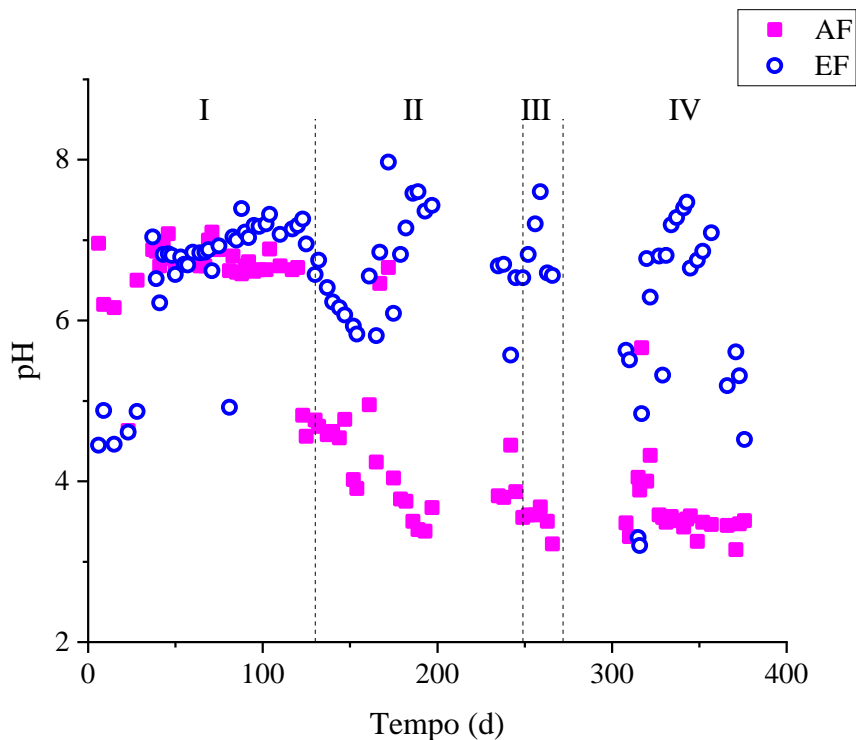
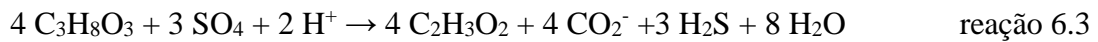


Figura 6. 6- pH afluente (■) e efluente (○) do meio.

A produção da alcalinidade total ficou na média de  $428 \pm 77$ ,  $257 \pm 180$ ,  $363 \pm 117$  e  $253 \pm 171$   $\text{mgCaCO}_3 \text{L}^{-1}$  nas Fases I, II, III e IV, respectivamente (Figura 6. 7). A alcalinidade devida a sulfeto representou 20 % da alcalinidade total produzida na Fase I, 17 % na Fase II, 10 % na Fase III e 15 % na Fase IV. A alcalinidade a bicarbonato predominou nas Fases III e IV, representando 76 e 72 % da alcalinidade total, respectivamente.

Esses valores são muito inferiores quando comparados ao Capítulo 5, que sob condições semelhantes, mas utilizando a vinhaça como doador de elétrons e pH afluente próximo de 5, com 20 % de DAM real, a alcalinidade efluente total foi  $1331 \pm 96$   $\text{mgCaCO}_3 \text{L}^{-1}$  e  $626 \pm 219$   $\text{mgCaCO}_3 \text{L}^{-1}$ , com 50 % de DAM real. No presente trabalho, na Fase III (DAM 50%), a alcalinidade efluente correspondeu a  $363 \pm 117$   $\text{mgCaCO}_3 \text{L}^{-1}$ . Essa diferença deve-se à elevada concentração de ácidos orgânicos presentes na vinhaça real, que promovem o tamponamento do meio, devido à constante de dissociação dos ácidos orgânicos (Sánchez-Andrea et al., 2014) presentes na vinhaça e contribuem para manter a alcalinidade total elevada, em função da alcalinidade devida aos ácidos voláteis.

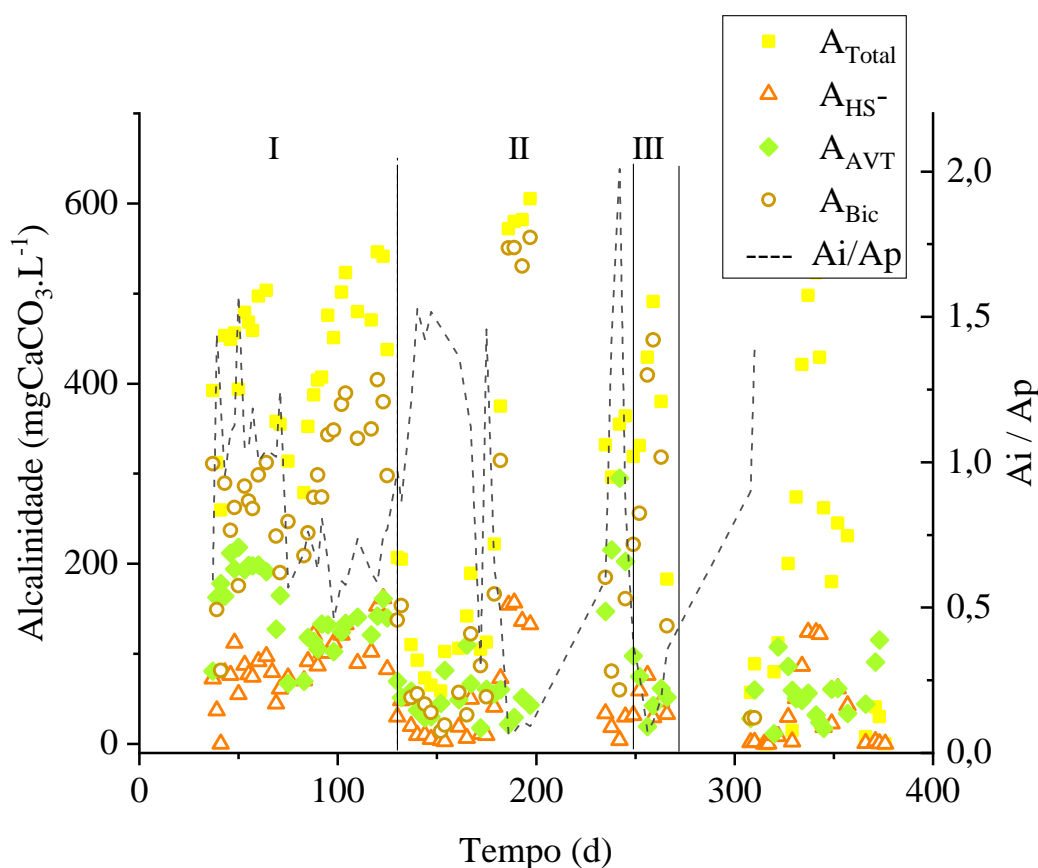


Figura 6. 7- Concentração da alcalinidade total- $A_T$  (■), alcalinidade a bicarbonato- $A_{\text{BIC}}$  (○), alcalinidade a ácidos voláteis- $A_{\text{AV}}$  (◆) e alcalinidade a sulfeto- $A_{\text{HS}^-}$  (△) medida como  $\text{CaCO}_3$  em  $\text{mg L}^{-1}$  e relação  $A_i / A_p$  (---).

O acúmulo médio de ácidos voláteis totais (AVT) em cada fase foi de  $290 \pm 80$ ,  $161 \pm 141$ ,  $100 \pm 42$  e  $110 \pm 59$  mg L<sup>-1</sup> correspondente às Fases I, II, III e IV, respectivamente. O acúmulo de ácidos pode estar relacionado à oxidação incompleta do glicerol (Eq. 6.1) (Bertolino et al., 2014). Além do acetato, o 3-hidroxiopropionato também pode resultar da oxidação incompleta do glicerol quando intermediada por *D. carbinolicus* via redução do sulfato e 1,3- propanediol na ausência do sulfato (Santos et al., 2018).

A oxidação do acetato via sulfetogênese é uma etapa importante pois, além de gerar alcalinidade durante a oxidação, como sua especiação é dependente do pH, o acúmulo do mesmo na forma de ácido acético mesmo em concentrações da ordem de micro molar pode conferir toxicidade aos microrganismos (Ñancuqueo et al., 2016).

A relação entre a alcalinidade intermediária (Ai) e a alcalinidade parcial (Ap) foi muito instável e oscilou durante toda a operação. Demonstrando grande desequilíbrio entre a produção e consumo de ácidos orgânicos voláteis, principalmente nos primeiros dias referentes à cada fase (Figura 6. 7). A diminuição de alcalinidade total na Fase IV pode estar relacionada à precipitação de sulfetos metálicos (Reação 1.7).

A neutralização do pH efluente, quando o pH inicial correspondia a aproximadamente 4, representa uma grande conquista do tratamento anaeróbio. Atualmente, o processo utilizado para o tratamento da DAM gerada na INB é o físico-químico convencional que consiste na adição de Ca(OH)<sub>2</sub> com o objetivo de elevar o pH para posterior lançamento no meio ambiente. No ano de 2018, foram gastos 1,6 milhões de reais na compra do alcalinizante.

#### 6.3.4 Remoção dos metais, terras raras e outros metaloides

Os metais detectados em solução aumentaram suas concentrações à medida que aumentou a proporção de DAM real a ser tratada. A remoção do Al foi superior a 70% nas Fases II e III, aumentando para  $85 \pm 13$  % na Fase IV (Figura 6. 8). A remoção média do Mn foi inferior aos 20% e do Fe e Si inferior aos 30% na Fase IV, com muitos períodos sem remoção na Fase II.



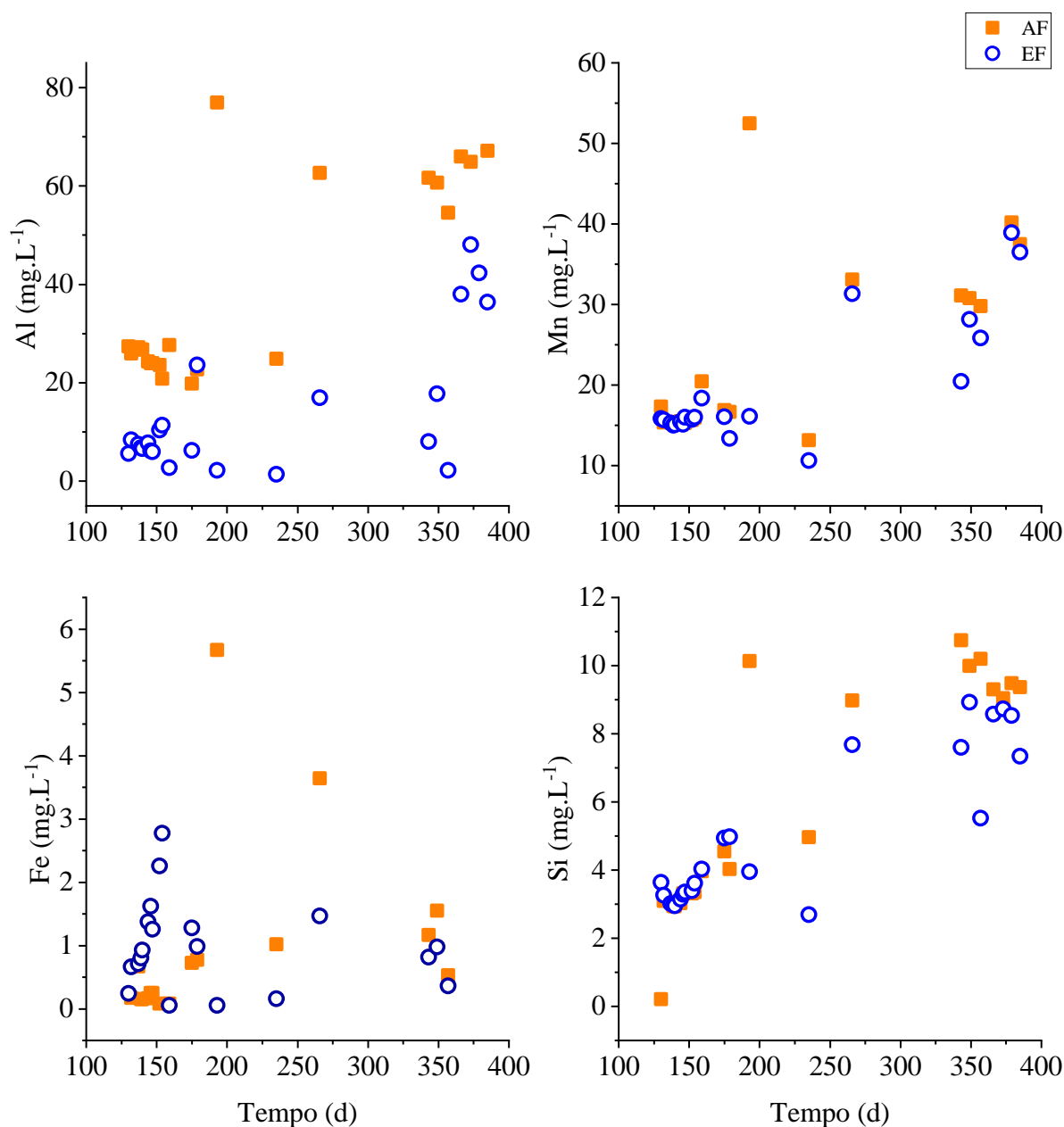


Figura 6. 8- Remoção dos metais de transição e remoção do metaloide Si.

O Al é um metal que mesmo em concentrações muito baixas acarreta toxicidade aos seres vivos de uma forma geral (Falagán et al., 2017b). A remoção desse elemento da DAM no sistema de tratamento se torna ainda mais importante devido ao lançamento desse efluente aos córregos que margeiam a cidade. A concentração do Al presente na DAM da lagoa BF4 da INB é de  $131 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$ , muito superior às DAM relatadas na literatura de  $40\text{-}78 \text{ mg L}^{-1}$  (Crane; Sapsford, 2018; Seo et al., 2017).

O alumínio geralmente precipita como hidróxido (Isosaari; Sillanpää, 2017), mas também como carbonato (Seo et al., 2017) e a formação do composto Al-hidróxi-sulfato pode

contribuir para a co-precipitação ou adsorção de metais traços como o U, Zn, Cu e Pb (Sánchez-España et al., 2016). A precipitação do Al começa a ocorrer em pH 4,5, ainda que incipiente, mas em pH 5,5, o Al é removido quase que completamente (93,5 – 98%) utilizando os agentes neutralizantes NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Seo et al., 2017).

O Mn pode precipitar como sulfeto, hidróxido ou mesmo carbonato, no entanto, como o produto de solubilidade é muito alto, a remoção torna-se mais eficiente quanto maior for o pH no meio (Sahinkaya et al., 2011). Além disso, a quantidade de sulfeto requerido para precipitação do Mn é até 130 vezes maior que o requerido para precipitar outros metais (Ni, Cu, Fe, Zn e Co) em pH 6,5 (Yilmaz et al., 2019). Seo et al. (2017) verificaram que a precipitação começou a ocorrer a partir de pH 7,5 e sua completa remoção em pH 9,5, não verificando influência quanto ao tipo de agente neutralizador adotado. As condições observadas neste estudo justificam a remoção incipiente no presente trabalho, uma vez que o pH efluente médio não ultrapassou 7,0.

Além dos metais, a presença dos elementos Ca e P também foram avaliadas. O Ca é um elemento encontrado em elevadas concentrações em DAM real. No presente trabalho, a concentração foi superior a 60 mg L<sup>-1</sup> (Figura 6. 9) e na DAM descrita por (Kefeni et al., 2015) foi de 612,5 mg L<sup>-1</sup>. Na Fase II quando a concentração era de aproximadamente 20 mg L<sup>-1</sup>, praticamente não houve remoção do Ca e na Fase IV, o residual presente no efluente superou os 50 mg L<sup>-1</sup>. No trabalho reportado por Kefeni et al. (2015), a remoção do Ca em pH 10,4 foi superior aos 90%, e em pH 11,9 foi totalmente removido, no entanto em pH 8,4 a remoção não ultrapassou os 50%, demonstrando forte dependência de pH alcalino.

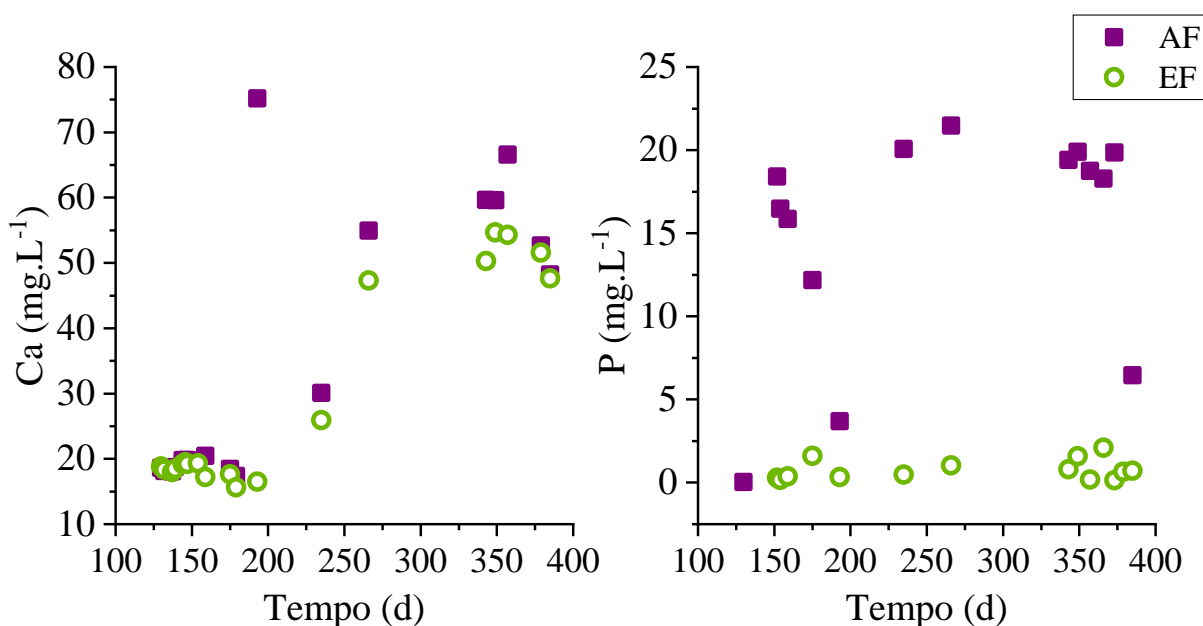


Figura 6. 9- Concentrações afluentes (■) e efluentes (○) do Ca e P.

O fósforo, com concentração que variou de 4 a 21 mg L<sup>-1</sup>, foi removido eficientemente durante toda a operação. Devido ao baixo K<sub>ps</sub> dos fosfatos (10<sup>-24</sup>), os mesmos podem estar precipitando com os ETR na forma de ETRPO<sub>4</sub> em pH neutro (Edahbi et al., 2019; Mäkinen et al., 2017). No entanto, a remoção do P ainda não foi completamente entendida, uma vez que há duas rotas possíveis para a remoção desse elemento: por reação química com outros elementos e pela via biológica (Salo et al., 2018).

A concentração afluyente e efluente dos ETR e U está apresentada na Figura 6.10. A remoção média do U e dos ETR foi mais eficiente quando houve suplementação do fósforo na corrente afluyente. Na Fase I, quando não havia adição de fósforo ao meio, a remoção do U e dos ETR foi superior aos 60%. Após o dia 150, quando passou-se a adicionar o P, a eficiência de remoção média do La, Ce, Nd, Pr, Y e U correspondeu a 92 ± 6, 96 ± 8, 93 ± 6, 92 ± 6, 96 ± 2 e 94 ± 3%, respectivamente, demonstrando a melhora na eficiência de remoção após adição do fósforo.

De acordo com Edahbi et al. (2019), os ETR podem precipitar como carbonatos, sulfatos, fosfatos, hidróxidos e fluoretos devido ao baixo produto de solubilidade (K<sub>ps</sub>) em condições de pH neutro (Tabela 1.7). A formação de carbonatos como ETR<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (K<sub>ps</sub>= 10<sup>-28.25</sup> a 10<sup>-35.77</sup>) mostra-se como outra alternativa provável de precipitação dos ETR (Rodríguez-Blanco et al., 2014), o que pode justificar a menor média de alcalinidade total produzida na Fase IV quando comparada à fase anterior, mesmo com redução média de sulfato superior à Fase III.

O K<sub>ps</sub> do Y(OH)<sub>3</sub> de 10<sup>-22</sup> (Edahbi et al., 2019) é inferior aos demais, mas ainda assim pode representar uma outra forma de como esse metal pode estar precipitando no lodo, no entanto, a precipitação dos ETR na forma de hidróxido ocorre a partir de pH > 8 (Miskufova et al., 2018). A precipitação dos ETR na forma de sulfeto metálico foi proposta por Mäkinen et al. (2017), mas estudos realizados por Salo et al. (2018) não identificaram a precipitação na forma de ETR<sub>2</sub>S<sub>3</sub>.

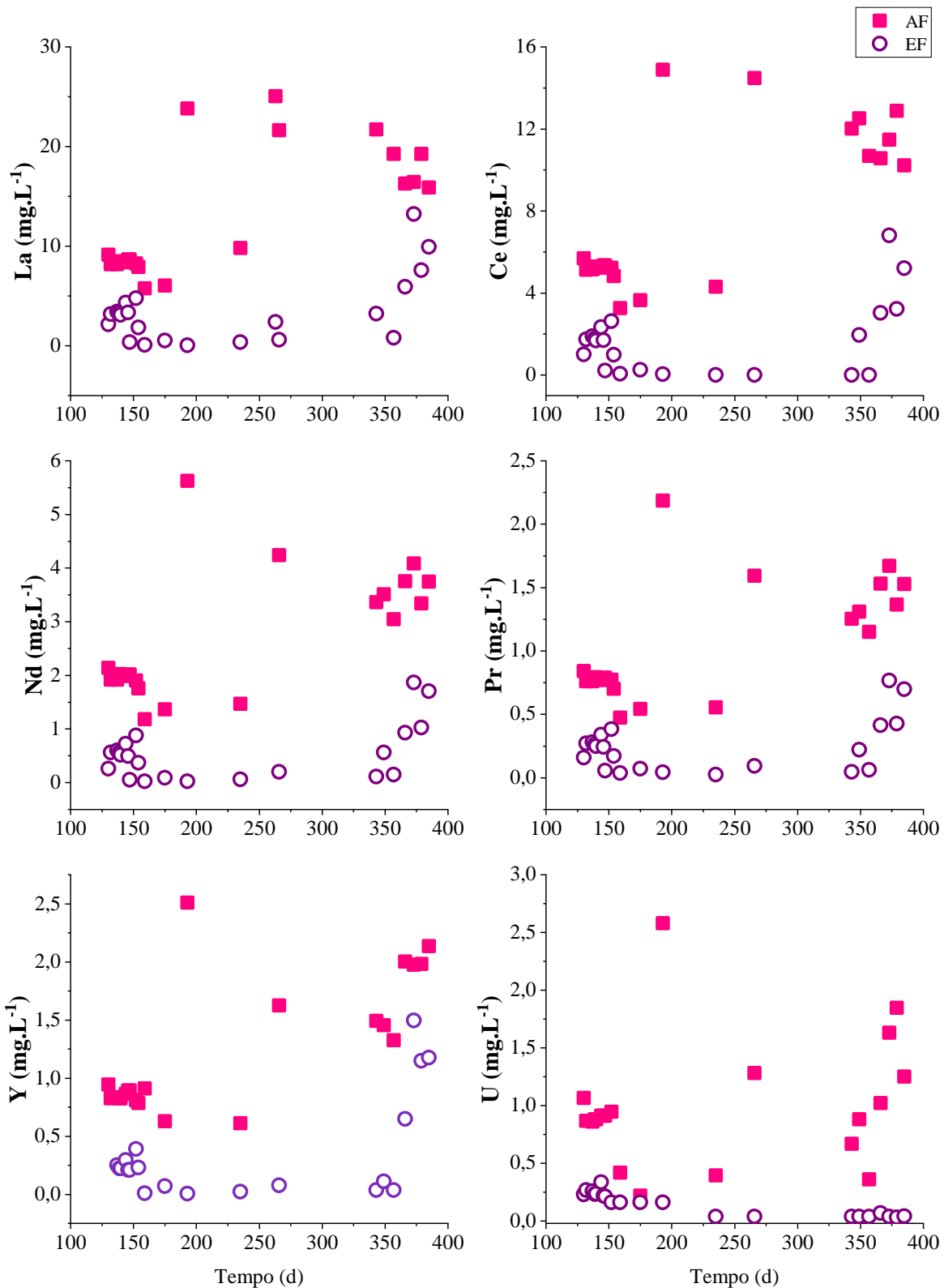


Figura 6. 10- Concentrações afluentes (■) e efluente (○) do La, Ce, Nd, Pr, Y e U.

Foi realizada a análise do lodo precipitado para avaliar a precipitação de metais na parte cônica inferior do reator. Nessa ocasião, a concentração do La foi de 112 mg L<sup>-1</sup>, Ce= 86 mg L<sup>-1</sup>, Nd=35 mg L<sup>-1</sup>, Pr= 12 mg L<sup>-1</sup>, Y= 17 mg L<sup>-1</sup>, U= 1,5 mg L<sup>-1</sup>, além dos metais Al= 528

mg L<sup>-1</sup>, Mn= 19 mg L<sup>-1</sup> e o metaloide Si= 17 mg L<sup>-1</sup>. Com exceção do urânio, a concentração dos analitos precipitados analisados foi proporcional à concentração do efluente tratado.

A elevada concentração de metais característica da DAM em questão não provocou problemas operacionais quanto ao material suporte, não havendo obstruções ou colmatação do leito como reportado em estudos anteriores (Dobslaw et al., 2018; Sahinkaya et al., 2019).

Ao contrário do que foi observado no trabalho utilizando a vinhaça como o doador de elétrons e 75% de DAM real (Capítulo 5), em que os microrganismos foram severamente afetados e a eficiência de remoção dos constituintes de interesse foi reduzida, no presente trabalho, mesmo com a eficiência de redução do sulfato abaixo de 60%, a remoção dos ETR foi mantida por mais de 360 dias de operação.

Apenas após o descarte de fundo do lodo do reator no dia 365 é que se verificou a queda na eficiência de remoção de sulfato e DQO, afetando assim a biomassa microbiana, o que pode ter ocorrido devido ao arraste dos microrganismos ativos, presentes em suspensão.

A recuperação do material precipitado ainda constitui um desafio para o presente trabalho que precisa ser melhor estudado.

### 6.3.5 Análise da diversidade microbiana

O índice de riqueza Chao1 e os índices de diversidade Shannon e Simpson para a biomassa aderida ao material suporte do reator DFSBR ao final da Fase IV estão apresentados na Tabela 6.4. Todos os índices analisados para o Domínio *Archaea* estiverem abaixo dos analisados para *Bacteria*. Isso porque arqueas representaram menos de 0,2 % da abundância relativa total.

Tabela 6.4- Índices de diversidade, dominância e riqueza para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* da biomassa microbiana na Fase IV do reator DFSBR.

	Geral	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
Índice de diversidade Shannon (H')	3,009	2,997	1,605
Índice de Simpson (1-D)	0,9	0,9	0,7127
Dominância (D)	0,09	0,09	0,2873
Índice de riqueza Chao1	1131	1112	14

Mesmo após 385 dias de operação do reator, sendo 80 dias na Fase IV, ou seja, tratando 75 % de DAM real e sem a utilização de alcalinizantes, os índices avaliados indicaram elevada diversidade e riqueza para o Domínio *Bacteria*. Resultados semelhantes foram encontrados por Kim et al. (2009) e Ahmed et al. (2019). De acordo com Kim et al. (2009), a diversidade microbiana foi afetada pelo nível de contaminação da DAM, a área quanto mais contaminada por DAM, menor o índice de Shannon, ficando abaixo de 3,0 ( $H'$ ). O índice de Simpson oscilou entre 0,84 quando Fe/S= 1 para 0,82 (Fe/S= 2) e 0,86 quando a relação foi 3 (Kim et al., 2009), índices semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

Segundo Ahmed et al. (2019), a diversidade microbiana após tratamento de um efluente com pH próximo a 6 contendo Fe (III), na faixa de concentração de 29 a 71 mg L<sup>-1</sup> e sulfato na faixa de 50 – 41 mg L<sup>-1</sup>, foi  $H'$ = 2,36 para relação Fe/S= 1 aumentando para  $H'$  2,57 quando Fe/S foi igual a 3.

O índice Shannon da comunidade bacteriana do sedimento de DAM reportado por Hou et al. (2019) variaram de 5,76 a 7,86, indicando elevada diversidade, enquanto os índices de riqueza Chao1 foram semelhantes (média de 1069 para a área de DAM mais contaminada por Zn, As, Cd e Pb).

Giordani et al. (2019) também verificaram índices de diversidade superiores ao presente trabalho ( $H'$ = 4,626) em reator batelada sequencial, pH 4, relação DQO:sulfato 1 (Sulfato e DQO= 1000 mg L<sup>-1</sup>) e utilizando o etanol como doador de elétrons para o tratamento de DAM contendo metais. No entanto, a DAM tratada era sintética e a concentração dos metais Zn, Cu e Fe inferiores a 20, 4 e 100 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente e poucos dias de operação (17 d).

Os resultados apresentados indicam elevada diversidade e riqueza microbiana ( $H'$ = 3,009, 1-D= 0,9 e Chao1= 1131) da biomassa aderida ao material suporte (cilindros de polietileno de baixa densidade), considerando o tratamento após 385 dias, em pH inferior a 4, metais, metaloides, elementos terras raras e o urânio presentes na DAM real.

#### 6.3.5.1 Análise taxonômica dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*

Foram classificadas 785 OTUs, 239 gêneros de bactérias e apenas 6 gêneros de arqueas. O número de *reads*, OTUs, filos, classes, famílias e gêneros para os Domínios bactérias e arqueas estão apresentados na Tabela 6.5. Bactérias representaram 99,8 % da comunidade microbiana e arqueas 0,17%.

Tabela 6. 5- N° de *reads*, OTUs, filios, classes, famílias e gêneros identificados na biomassa do DFSBR na Fase IV.

	Geral	Domínio <i>Bacteria</i>	Domínio <i>Archaea</i>
N° de <i>reads</i> classificadas em OTUs	126417	126176	220
OTUs	785	765	13
Número de filios	26	20	2
Número de classes	45	35	4
Número de famílias	137	126	5
Número de gêneros	251	239	6

*Spirochaetes* foi o filo que representou 32,5 % da AR total, seguido por *Firmicutes* (27,2 %), *Bacteroidetes* (20,8 %), *Proteobacteria* (13,1 %), *Caldiserica* (4,2 %), *Fusobacteria* (0,6 %) e *Thermotogae* (0,5 %) (Figura 6. 11). Os outros 13 filios identificados representaram 1,1 % da AR.

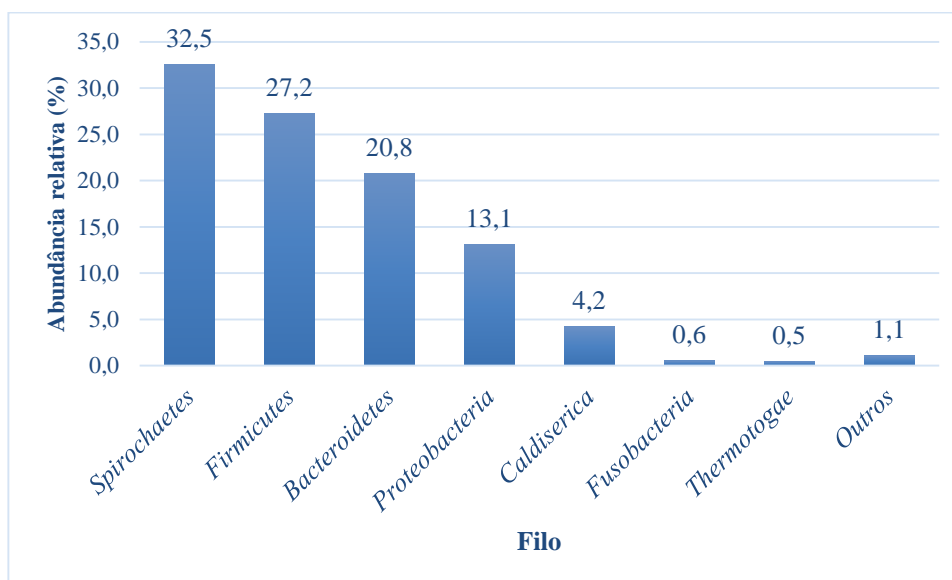


Figura 6. 11- Principais Filios do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa do material suporte do reator DFSBR ao final da Fase IV.

Para o Domínio *Archaea*, dois filios foram identificados: *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, representando 0,17 e 0,001 % da AR total, respectivamente. A nível de Família, foram classificadas quatro pertencentes ao Filo *Euryarchaeota*: *Methanobacteriaceae* (53,6 %), *Methanosaetaceae* (32,3 %), *Methanomassiliicoccaceae* (7,3 %) e *Thermoplasmatales* (5,9 %) e um pertencente ao filo *Crenarchaeota* (0,9 %) de mesmo nome. Apenas 6 gêneros foram

identificados: *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanomassiliicoccus*, *Thermogymnomonas*, *Methanobrevibacter* e *Candidatus Nitrosocaldus* (Figura 6. 12).

Arqueas do Filo *Euryarchaeota* foram encontradas em mina de urânio em pH ácido (1,3 – 5,0), concentração de urânio da ordem de 23 – 99 mg L<sup>-1</sup>, em processo de biorremediação, ainda que em baixa abundância relativa (Coral et al., 2018). Arqueas acidofílicas *Euryarchaeota* superaram a AR de bactérias e representaram 67 % da comunidade microbiana encontrada no sedimento da mina de cobre *Parys Mountain* (pH 1,7) (Korzhenkov et al., 2019). O grupo *Thermoplasmatales* geralmente são encontradas em ambientes ácidos, como no sedimento do Rio Tinto (Sánchez-Andrea et al., 2011), *Iron Mountain* (Edwards et al., 2000) e áreas associadas à DAM (Méndez-García et al., 2015).

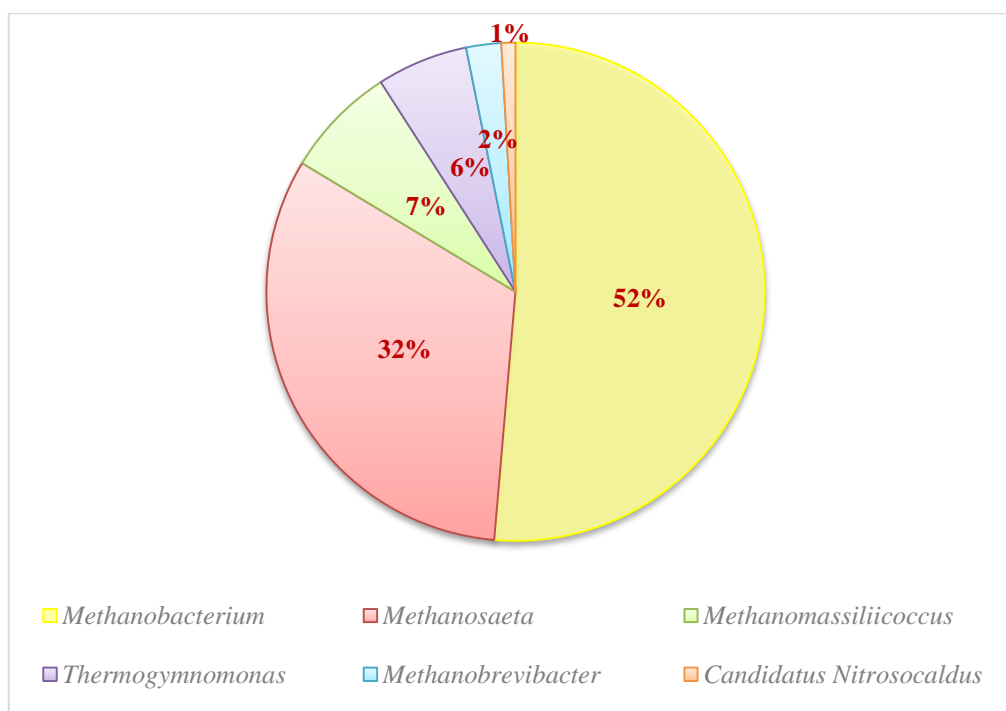


Figura 6. 12- Principais gêneros do Domínio *Archaea* identificados na biomassa aderida ao material suporte ao final da Fase IV

Para o domínio bactéria, foram identificados 239 gêneros, os principais estão apresentados na Tabela 6.6 e Figura 6. 13. A soma dos 10 principais gêneros representou 92% da abundância relativa microbiana.



Tabela 6.6- Principais gêneros do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa aderido ao material suporte do reator DFSBR ao final da Fase IV (Figura 6. 13).

Referência	Gênero	Reads	AR (%)
A	<i>Treponema</i>	40935	32,4
B	<i>Paludibacter</i>	24879	19,7
C	<i>Thermodesulfoibium</i>	14307	11,3
D	<i>Desulfovibrio</i>	6872	5,4
E	<i>Pectinatus</i>	6374	5,0
F	<i>Desulfobacterium</i>	5810	4,6
G	<i>Caldisericum</i>	5321	4,2
H	<i>Zymophilus</i>	4309	3,4
I	<i>Clostridium</i>	4070	3,2
J	<i>Desulfosporosinus</i>	3895	3,1
K	<i>Acidithiobacillus</i>	1641	1,3
Outros	Outros	8004	6,3

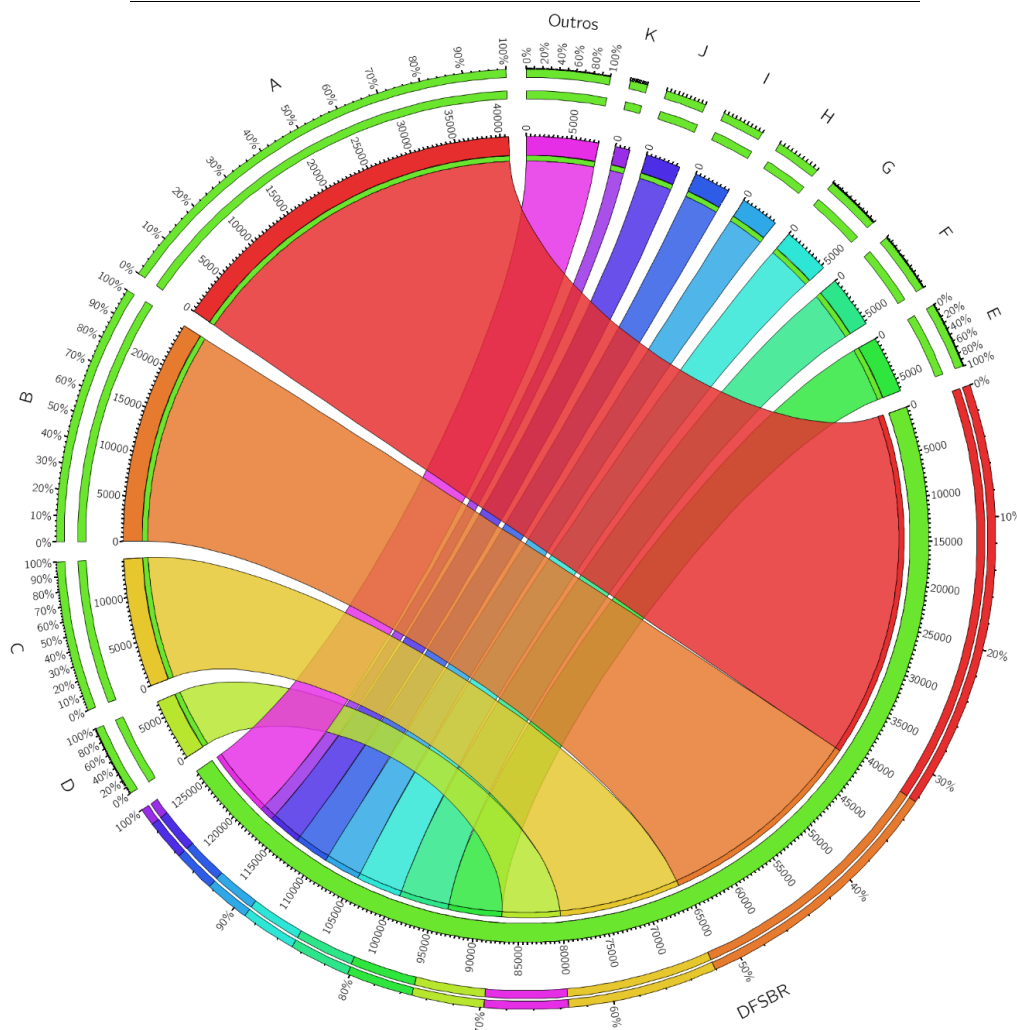


Figura 6. 13- Principais gêneros do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa aderida ao material suporte do reator na Fase VI. Legenda das taxonomias: A- *Treponema*, B- *Paludibacter*, C- *Thermodesulfoibium*, D- *Desulfovibrio*, E- *Pectinatus*, F- *Desulfobacterium*, G- *Caldisericum*, H- *Zymophilus*, I- *Clostridium*, J- *Desulfosporosinus* e H- *Acidithiobacillus*.

Os gêneros *Treponema*, *Paludibacter*, *Zymophilus* e *Clostridium* representaram 59 % da AR e são bactérias fermentativas em sintrofismo com BRS. Enquanto os gêneros de BRS ou envolvidas no ciclo do enxofre, amplamente relatados na literatura e encontrados em DAM como: *Thermodesulfobium* (Mori et al., 2003; Muyzer and Stams, 2008; Sánchez-Andrea et al., 2015, 2013, 2011), *Desulfovibrio* (Ahmed et al., 2019; Bertolino et al., 2014; Hu et al., 2015; Muyzer and Stams, 2008; Sato et al., 2019; Xingyu et al., 2013), *Pectinatus* (Juvonen; Suihko, 2006), *Desulfobacterium* (Ñancuqueo et al., 2017; Sánchez-Andrea et al., 2014; Muyzer; Stams, 2008), *Caldisericum* (Mori et al., 2009; Yan et al., 2016; Zeng et al., 2019, 2018) e *Desulfosporosinus* (Karnachuk et al., 2015; Muyzer; Stams, 2008; Sánchez-Andrea et al., 2015, 2014b; Santos; Johnson, 2018, 2017; Sato et al., 2019; Zhang et al., 2019) representaram 34% da comunidade microbiana.

A espécie *Thermodesulfobium narugense* foi a primeira BRS acidofílica relatada por Mori et al. (2003) e isolada de águas termais próximo a lagoas ácidas. Outras duas BRS acidofílicas foram descritas recentemente (Johnson; Sánchez-Andrea, 2019), *Thermodesulfobium acidiphilum* com crescimento entre pH 3,7 - 6,5 (Frolov et al., 2017) e *Thermodesulfobium* sp. strain 3baa mais tolerante a pH ácido crescendo entre 2,6 - 6,6 (Rüffel et al., 2018).

O gênero *Acidithiobacillus*, embora não reduza o sulfato a sulfeto, é uma bactéria acidofílica amplamente encontrada em efluentes de DAM e envolvidas no ciclo do Fe (Coral et al., 2018; Falagán et al., 2017b, 2017a; Kadnikov et al., 2019, 2016; Sánchez-Andrea et al., 2011; Santos and Johnson, 2018; Streten-Joyce et al., 2013b; Zhou et al., 2010) e representou 1,3 % da AR da biomassa.

O gênero *Caldisericum*, além de redutora de tiosulfato, está relacionado também à exposição e tolerância do gênero ao urânio e outros metais (Sar et al., 2013; Zeng et al., 2019, 2018). Enquanto os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfosporosinus* são BRS oxidadoras incompletas do glicerol, levando-o a acetato (Ñancuqueo et al., 2016; Sánchez-Andrea et al., 2014). A presença em abundância dos gêneros de bactérias oxidadoras incompletas e a ausência de arqueas metanogênicas acetoclásticas justificam o residual orgânico medido como DQO no efluente do reator.

#### 6.4 Conclusão

A alcalinidade gerada no sistema foi suficiente para elevar o pH de 4 para próximo da neutralidade.

O sintrofismo entre bactérias redutoras de sulfato e bactérias fermentativas foi estabelecido e favoreceu a oxidação do glicerol com eficiência superior a 60% ao longo dos 385 dias de operação do reator.

O processo sulfetogênico teve a eficiência reduzida após a paralisação da operação por 30 dias (Fase II), no entanto, retornando paulatinamente com o retorno da operação do reator.

O glicerol foi eficiente como fonte de carbono e doador de elétrons para tratamento da DAM real em condições de pH ácido por longo período de operação.

A adição de nutrientes como nitrogênio e fósforo contribuiu para incremento da eficiência de remoção dos ETR.

O material suporte proporcionou adesão adequada da biomassa microbiana e precipitação eficiente de metais sem que houvesse problemas de colmatação do reator.

*Treponema*, *Paludibacter*, *Zymophilus* e *Clostridium* foram os gêneros de bactérias fermentativas em maior abundância e demonstraram elevada capacidade de adaptação a meio ácido, contendo metais.

Os gêneros envolvidos no ciclo do enxofre e redutoras de sulfato *Thermodesulfobium*, *Desulfovibrio*, *Pectinatus*, *Desulfobacterium*, *Caldisericum* e *Desulfosporosinus* representaram 34% da comunidade microbiana.

A configuração do reator e do meio suporte mostraram-se adequados para o tratamento da DAM real com elevadas concentrações de metais, metaloides e ETR em baixo pH.

## Capítulo 7

### A influência do doador de elétrons para a redução de sulfato e na diversidade microbiana de reator sulfetogênico de fluxo contínuo.

#### RESUMO

A influência da doador de elétrons sobre as velocidades de redução do sulfato, produção de sulfeto e para a diversidade microbiana em pH moderadamente ácido foram investigadas no presente trabalho. O reator sulfetogênico foi operado de forma contínua por 178 dias e nesse período glicerol, etanol e sacarose foram testados como fontes de carbono. Amostras da biomassa suspensa foram coletadas semanalmente, totalizando 25 amostras que foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA (MiSeq™ da plataforma *Illumina*). O glicerol foi o doador de e<sup>-</sup> que apresentou maior domínio de bactérias redutoras de sulfato (BRS), no entanto, maiores velocidades de redução do sulfato foram atingidas utilizando o etanol como doador de e<sup>-</sup>. A adição da sacarose influenciou negativamente na população microbiana, acentuando o acúmulo de acetato no reator. Os gêneros *Desulfosporosinus* e *Paludibacter*, associados ao sintrofismo BRS e bactérias fermentativas, foram os mais abundantes ao longo da operação. Após transição do glicerol para etanol e sacarose foi verificada a redução sistemática da abundância relativa da população de BRS e o aumento de bactérias fermentativas da família *Ruminococcaceae*.

#### 7.1 Introdução

O enxofre se apresenta como um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre e é encontrado em abundância em rochas e sedimentos na forma de pirita (FeS<sub>2</sub>), gesso (CaSO<sub>4</sub>) e águas marinhas (Muyzer; Stams, 2008). Efluentes com elevada concentração de compostos sulfúricos tem origem tanto antrópica, como efluentes industriais e da mineração, como natural, a partir de atividades vulcânicas (Johnson; Hallberg, 2003).

Os microrganismos redutores de sulfato, representados pelos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, além do ciclo do enxofre, que utilizam o sulfato como receptor final de elétrons na degradação de compostos orgânicos (Muyzer; Stams, 2008), desenvolvem também papel

importante no ciclo do carbono, onde são responsáveis por mais de 50% de todo carbono mineralizado em sedimentos marinhos.

O interesse nas bactérias redutoras de sulfato (BRS) aumentou consideravelmente nos últimos anos devido à importância das mesmas na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos, benzoatos e fenóis presentes em sedimentos anaeróbios, e por desenvolverem função reguladora em ecossistemas e em processos de biorremediação (Castro et al., 2000).

No processo anaeróbio, as BRS podem oxidar completamente o composto orgânico a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  ou incompletamente, resultando em acetato. Os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus* e *Desulfosarcina* são exemplos de oxidadoras completas, enquanto *Desulfosporosinus*, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* e *Desulfobotulus* são oxidadoras incompletas (Huang et al., 2020; Kimura et al., 2006). Bactérias do filo *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria* são geralmente encontradas em efluentes ácidos e concentração elevada de sulfato (Méndez-García et al., 2015) semelhantes ao efluente utilizado no presente trabalho.

A seleção de uma comunidade adaptada ao processo de redução de sulfato em baixo pH contribui para o sucesso do tratamento biológico (Johnson; Sánchez-Andrea, 2019), uma vez que alguns substratos utilizados em baixo pH podem constituir toxicidade aos microrganismos, como é o caso do lactato ( $\text{pK}_a$  3,86), amplamente utilizado como meio de cultura para BRS (Postgate, 1963) e que em condições ácidas, se encontra na forma não dissociada.

Em geral, os doadores de elétrons orgânicos do grupo carboxila e o sulfeto resultante da redução do sulfato se encontram na forma não dissociada em pH ácido ( $< 5$ ) (Qian et al., 2019), que é a forma mais tóxica para o crescimento celular quando comparada a forma iônica (Johnson; Sánchez-Andrea, 2019). O que ocorre é que em condições ácidas a energia demandada para o crescimento da biomassa microbiana fica em segundo plano e mais energia é utilizada para manter o pH interno da célula sob condições neutras de modo a evitar a difusão dos prótons para o interior da célula (Sánchez-Andrea et al., 2014).

Dessa forma, a seleção de microrganismos adaptados para condições ácidas, em especial as BRS acidotolerantes e as BRS acidofílicas, se apresentam como a chave para o sucesso no tratamento da DAM (Johnson; Sánchez-Andrea, 2019; Qian et al., 2019; Sánchez-Andrea et al., 2014). Estudos utilizando inóculo com comunidades neutrofílicas para o tratamento da DAM apresentaram boas eficiências de redução de sulfato e oxidação do substrato (Rodriguez et al., 2011), no entanto, ao diminuir o pH para condições ácidas, as eficiências começam a diminuir levando à falência do sistema.

Kimura et al. (2006) relataram que o sintrofismo entre *D. acididurans* e *Ac. aromatica*, espécies acidofílicas, apresentaram melhores resultados para a redução do sulfato em relação ao glicerol oxidado quando comparada a culturas puras de *D. acididurans*. Isso porque a *Ac. aromatica* funciona como um catalizador para a reação acetoclástica, consumindo o acetato e produzindo H<sub>2</sub> que é utilizado como uma segunda fonte de elétrons para a *D. acididurans*.

Estudos utilizando a mesma configuração do biorreator e inóculo do presente trabalho foram relatados por Nãncucho e Johnson (2012; 2014), Santos e Johnson (2017; 2018) e Holanda e Johnson (2020). A origem do inóculo foi descrita por Santos e Johnson (2018) em que culturas puras de bactérias sulfetogênicas e não sulfetogênicas das espécies *Desulfosporosinus acididurans* e *Acidocella aromática*, respectivamente, foram enriquecidas e mantidas com uma cultura sulfetogênica enriquecida de uma mineração de cobre abandonada Cantareas na Espanha (Rowe et al., 2007). O mix dessas culturas foi mantido em um biorreator contínuo de 5 L de mesma configuração e alimentado com o meio de cultura descrito por Nãncucho et al. (2016).

A alteração da diversidade microbiana em função do substrato utilizado foi reportado anteriormente por Hiibel et al. (2011) e Costa et al. (2021). De acordo com Costa et al. (2021), BRS do gênero *Desulfobubus* foram favorecidas quando utilizado o glicerol como doador de elétrons para o tratamento de DAM sintética, representando 36,7 % da abundância relativa, enquanto o uso do lactato favoreceu bactérias do gênero *Desulfovibrio*, com 32,1 % e *Desulforhabdus*, 15,2 % da AR. O uso da sacarose, no entanto, favoreceu outras rotas metabólicas, relatadas pelo aumento do gênero *Pectinatus* (Costa et al., 2021).

Dessa forma, alguns parâmetros precisam ser levados em consideração para que o tratamento da DAM ocorra de forma satisfatória sob condições ácidas, como: o inóculo do biorreator e o doador de elétrons. O presente capítulo teve como objetivo identificar e acompanhar a composição microbiológica de um biorreator sulfetogênico, inoculado com bactérias acidofílicas e ácido-tolerantes selecionadas, e verificar a influência dos substratos utilizados como fonte de carbono para a atividade microbiana em pH moderadamente ácido (pH 5). A pesquisa foi desenvolvida durante o doutorado sanduíche com duração de 6 meses na Universidade de Bangor, no País de Gales.

## 7.2 Material e métodos

O presente capítulo diferencia-se dos demais por utilizar outra configuração de reator e métodos analíticos diferentes.

### 7.2.1 Configurações do biorreator sulfetogênico (aSRBR)

O biorreator sulfetogênico acidofílico (acidophilic sulfate-reducing bioreactor-aSRBR) de único estágio utilizado possui volume de trabalho útil de 2 L (Figura 7. 1) e foi inoculado com comunidade mista de bactérias acidofílicas e BRS acidofílicas (Santos; Johnson, 2018). O inóculo proveio de um reator mãe, de fluxo contínuo, com comunidade sulfetogênica enriquecida a partir do sedimento coletado na mina de cobre abandonada Cantareas na Espanha (Rowe et al., 2007) e de culturas puras do gênero *Acidocella aromática* e *Desulfosporosinus acididurans* (Santos; Johnson, 2018). O reator mãe foi mantido com finalidade exclusiva de inocular outros biorreatores. Enquanto o pH do meio de cultura de alimentação do biorreator era de 2,1, o pH do aSRBR foi fixado em 5 e a temperatura em 30 °C, mantidos sob controle durante toda a operação utilizando o equipamento FerMac 310/60 (Electrolab, UK). O gás nitrogênio garantiu a anaerobiose do meio reacional e o carregamento do gás H<sub>2</sub>S para o reator *off-line*. O meio suporte utilizado foram pérolas de vidro porosas em que 2/3 do material foi pré-inoculado e retirado do reator mãe (*mother reactor*), de mesma configuração, mas volume de 5 L. Enquanto 1/3 do material suporte não houve inoculação prévia.

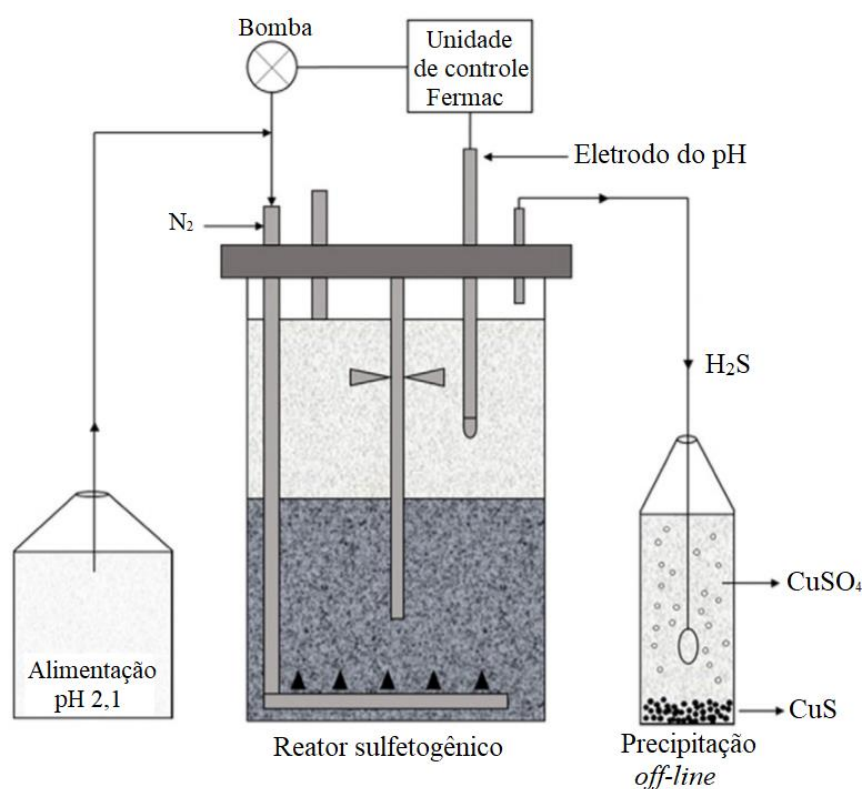


Figura 7. 1- Configuração do biorreator sulfetogênico  
Fonte: Santos; Johnson, 2017

### 7.2.2 Caracterização do meio de cultura de alimentação do biorreator, meio basal e elementos traços

O meio reacional utilizado na Fase I da operação do biorreator possuiu a seguinte composição: 25 mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ), 5 mM de glicerol,  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $20 \text{ mL L}^{-1}$  da solução basal 50x concentrada (Tabela 7.1) e  $1 \text{ mL L}^{-1}$  da solução de elementos traços (Tabela 7.2). O pH do meio afluente ajustado para 2,1 e o pH no biorreator mantido em 5. O controle da alimentação foi feita pela diferença de pH entre a fase líquida do biorreator e o licor de alimentação, isso significa que à medida que a alcalinidade produzida com a redução do sulfato elevava o pH para 5, o meio de pH 2,1 alimentava o reator. Ou seja, a alimentação do reator ocorria em função da redução do sulfato e geração de alcalinidade.

Tabela 7.1- Composição da solução basal 50x concentrada

Componentes	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
$\text{NaSO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	7.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	22.5
KCl	2.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.7

Tabela 7.2- Composição da solução traço de metais 1000x concentrada em pH 2

Componentes	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Cr}(\text{SO}_4)_3 \cdot 15 \text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.6
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{NaVO}_3$	0.1



### 7.2.3 Fases operacionais

As concentrações de sulfato, glicerol, etanol e sacarose estão descritos na Tabela 7.3. O glicerol foi o único doador de elétrons na Fase I e na Fase II houve a transição do glicerol para o etanol em que foram adicionados 2,5 mM de glicerol (230 mg L<sup>-1</sup>) e 2,5 a 3,3 mM (115 - 152 mg L<sup>-1</sup>) de etanol de forma a balancear as unidades de carbono no meio. Na Fase IIb e IIc o etanol foi o único doador de elétrons e com o objetivo de diminuir o residual de sulfato no efluente, a concentração de sulfato afluyente passou de 35,9 mM (3446 mgSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>) para 11 mM (1060 mgSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>). Na Fase III, a sacarose foi introduzida juntamente com o etanol simulando uma condição semelhante à composição da vinhaça descrita por Godoi et al. (2015). Na Fase IV, devido à esterilização a pressão e calor do meio de alimentação junto com a sacarose em pH 2, a sacarose foi degradada parcialmente em glicose e frutose (que possuem a mesma forma molecular) antes de alimentar o biorreator e com isso, as concentrações dos açúcares glicose, frutose e sacarose oscilaram na Fase IV.

Tabela 7. 3- Parâmetros operacionais do biorreator em mM

Conc. (mM)	I (68 d)	IIa (17d)	IIb (17d)	IIc (8d)	IIIa (21d)	IIIb (10d)	IIIc (8d)	IV (30d)
Sulfato	35,7	35,4	35,9	11,1	8,7	35,8	10,8	10,8
Glicerol	5,40	2,5	-	-	-	5,30	-	-
Etanol		2,5	3,0	3,3	7,5	-	7,5	10,1
*Sac+Gli+Fru	-	-	-	-	6	-	-	0,6~6,0

Fase IIIa- Acúmulo de acetato e falência do reator.

Fase IIIb e c- Fase de recuperação do reator.

\*Sac= sacarose; Gli= glicose, e; Fru= frutose.

### 7.2.4 Determinação do sulfato e acetato

Para analisar a concentração de sulfato e acetato as amostras foram filtradas utilizando filtros em membrana nitrocelulose 0.2 µm (Whatman, UK) e mantidas congeladas. A concentração dos padrões utilizados são apresentados na Tabela 7.4. A técnica utilizada foi a cromatografia iônica Dionex IC25, uma coluna Ion Pac® AS-11, um supressor ARSR ULTRA 4 mm e detector de condutividade DS11.

Tabela 7.4- Concentrações dos padrões de calibração do sulfato e acetato

Padrões	Conc. (mM)	Conc. (mM)	Conc. (mM)
Sulfato	0,5	2	5
Acetato	0,1	0,5	1

### 7.2.5 Determinação dos compostos orgânicos

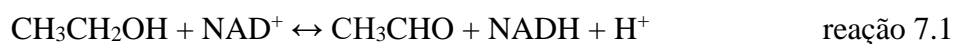
Para determinar os compostos orgânicos, alíquotas de 15 mL do afluente e efluente foram coletadas, filtradas em membranas 0,2 µm (Whatman, UK) e congeladas. As concentrações de glicerol, sacarose, frutose e glicose foram determinadas utilizando cromatografia iônica Dionex ICS 3000 equipada com coluna de separação Carbo Pac™ Pa10 e detector amperométrico ED 40. Padrões de concentrações 0,5, 1 e 2 mM foram utilizados para calibrar a curva dos compostos orgânicos (Tabela 7.5).

Tabela 7.5- Concentrações dos padrões de calibração do sulfato e acetato

Padrões	Conc. (mM)	Conc. (mM)	Conc. (mM)
Glicerol	0,5	1	2
Frutose	0,5	1	2
Sacarose	0,5	1	2
Glicose	0,5	1	2

### 7.2.6 Determinação do etanol

Para a determinação do etanol foi utilizado o método de oxidação enzimática e produção de NADH detectável por UV em pH alcalino. A reação 7.1 demonstra como funciona a reação em que a enzima álcool desidrogenase (ADH) age como o catalisador na presença de NAD<sup>+</sup> e a produção de NADH é medida em absorbância a 340 nm.



Como a reação é reversível, a hidrazina é utilizada como o agente removedor do produto acetaldeído, que reage com o grupo carbonil gerando um composto orgânico hidrazone, evitando assim a oxidação do NADH a etanol.

Os reagentes utilizados foram:

- 1-Solução de enzima: O ADH *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, UK) foi dissolvido em 0,1 M do tampão glicine-NaOH contendo 30 % de sacarose e concentração final de 5 U mL<sup>-1</sup>.
- 2-NAD<sup>+</sup>: A β-nicotinamida adenina dinucleotídeo hidratado (Sigma-Aldrich, UK) foi dissolvido em 0,1 M do tampão glicine-NaOH pH 9 para concentração final de 2,5 mM.
- 3-Solução de hidrazina: A hidrazina hidratada (Thermo Fisher Scientific, UK) foi dissolvida em água ultrapura com concentração final de 10 % (m/v).
- 4-Solução mix: O volume de 1,8 mL de 2,5 mM NAD<sup>+</sup> foi misturado a 0,2 mL de solução de ADH (1) mais 15 μL da solução 3. Cada reação necessita de aproximadamente 200 uL dessa solução.

O etanol absoluto (Fisher Scientific, UK) foi utilizado no preparo dos padrões das seguintes concentrações: 0, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM.

O volume de 200 uL da solução 4 foi incubado por 5 minutos a 30°C em tubos de centrífuga de 1,5 mL e em seguida, 50 uL da amostra adicionada e misturada à solução. O volume total de cada amostra foi transferido para uma placa 96-well UV-star (Greiner Bio-one, UK). Cada amostra foi analisada utilizando a Multiskan™ GO microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, UK) (Figura 7. 2). O comprimento de onda utilizado foi de 340 nm, *linear shaking* por 5s e mudanças na absorbância que possibilitaram a leitura.

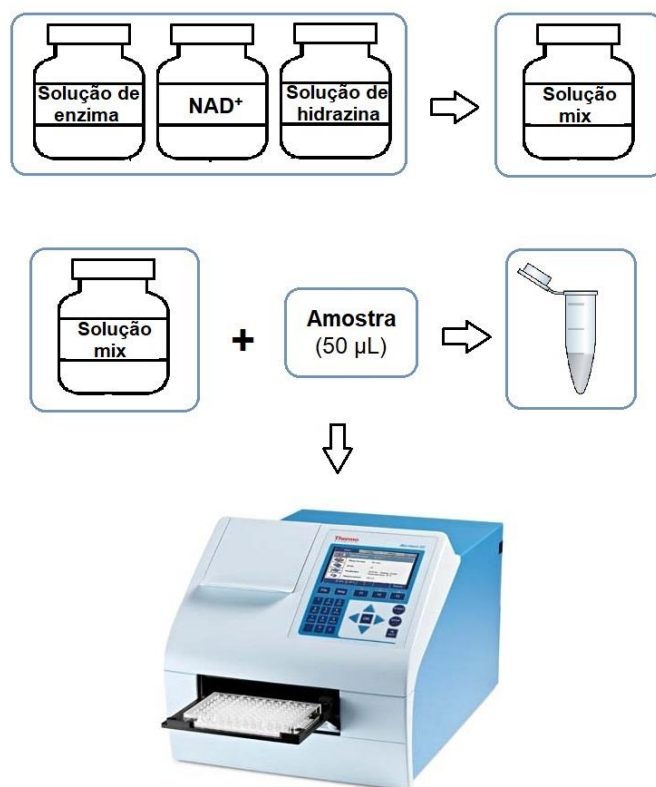


Figura 7. 2- Representação esquemática da metodologia de análise do etanol  
 Fonte: A autora

### 7.2.7 Determinação do cobre total

A concentração do cobre total foi determinada utilizando o método colorimétrico descrito por Anwar et al. (2000). O método utiliza três soluções: 1- a solução de hidroxilamina; 2- o tampão Tartarato e 3- o ácido bicinconínico. Para preparar a de solução de hidroxilamina (10 %), 10 g de hidroxilamina.HCl (Sigma, UK) foram dissolvidos em 100 mL de água ultrapura. Para o tampão Tartarato, dissolveu-se 14.11 g de tartarato de sódio e potássio em 100 mL de água ultrapura e pH ajustado em 5.5 utilizando HCl. A solução de ácido bicinconínico (0.2 %, Sigma, UK) foi diluída duas vezes com a solução tampão de Tartarato.

A curva de calibração possibilitou detectar concentrações que variaram entre 0.25 mM a 2 mM de  $\text{Cu}^+$ . Para determinação do cobre, 200  $\mu\text{L}$  da solução de hidroxilamina foram adicionados a amostra de volume final 50  $\mu\text{L}$  (considerando a necessidade de diluição). Após 5 minutos, foram adicionados 650  $\mu\text{L}$  do tampão tartarato e 50  $\mu\text{L}$  da solução de ácido bicinconínico a amostra. A absorbância foi medida a 562 nm.

### 7.2.8 Identificação molecular

Aproximadamente 20 mL de amostra líquida foram coletadas do sobrenadante no interior do reator semanalmente (Tabela 7.6) e filtradas em membrana nitrocelulose 0,2 µm (Whatman, UK) para a extração de DNA (Figura 7. 3). O kit utilizado foi o PowerSoil Ultraclean Microbial DNA (Mobio, CA, USA) e a extração seguiu o protocolo do kit.

Tabela 7.6- Relação das amostras analisadas pelo sequenciamento

Dia de operação	Fase
3	I
10	I
17	I
24	I
31	I
38	I
45	I
59	I
66	I
73	IIa
80	IIa
86	IIa
94	IIb
101	IIb
108	IIc
115	IIIa
122	IIIa
129	IIIa
136	IIIb
143	IIIc
150	IIIc
157	IV
163	IV
170	IV
178	IV

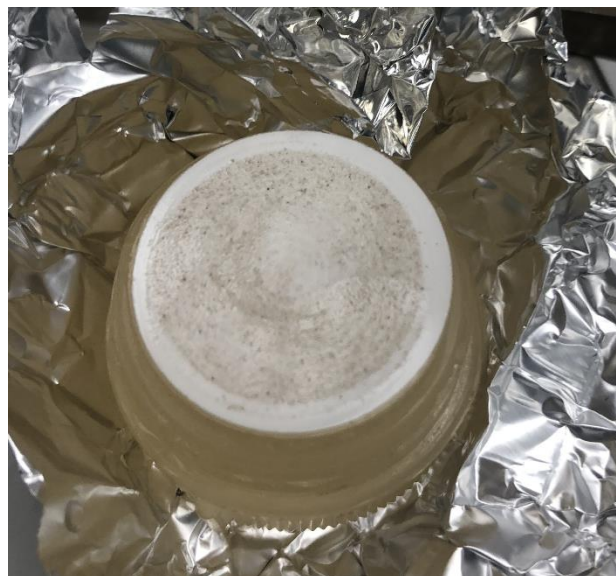


Figura 7. 3- Filtro após filtração de 20 mL da amostra do interior do biorreator para extração de DNA.

Fonte: A autora

Os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação da região variável V4 do gene 16S rRNA por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers Pro341F (CCTA CGGGNBGCASCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), possibilitando identificar tanto o Domínio *Bacteria* quanto Domínio *Archaea*. A amplificação do 16S rRNA foi realizada por qPCRmix-HS™ SYBR mastermix (Evrogen, Russia) utilizando as condições descritas por Korzhenkov et al. (2019). A purificação dos produtos de PCR foram realizados utilizando o kit Cleanup Mini (Evrogen, Russia). O sequenciamento foi conduzido no MiSeq™ *Personal Sequencing System technology* da Illumina Inc. (San Diego, CA, USA) utilizando leituras de 250pb *paired-end*. Todo o tratamento e análise dos dados sequenciados foram realizados conforme descrito por Korzhenkov et al. (2019).

As bibliotecas de metabarcodes dos amplicons do gene 16S rRNA correspondentes à região variável V3-V4 foram preparadas por PCR único com primers de fusão de dupla indexação descrito por Fadrosh et al. (2014).

Após o tratamento e análise de bioinformática, as figuras foram plotadas utilizando os programas Origin, Microsoft excel e website <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/visualize/> de acordo com a metodologia descrita por Krzywinski et al. (2009).

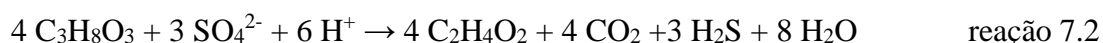
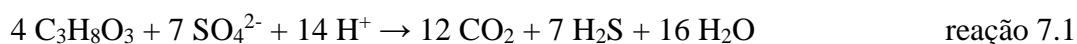
### 7.3 Resultados e discussão

A Fase I foi marcada pela concentração em excesso de sulfato (~35 mM) para a oxidação de aproximadamente 5 mM de glicerol. A redução média do sulfato na Fase I foi de  $5,8 \pm 3,2$  mM ( $15 \pm 7$  %) (Tabela 7.7), enquanto a oxidação do glicerol foi de 100%.

Tabela 7.7- Concentração de sulfato reduzido e acetato produzido (mM) em cada fase.

<b>Fase</b>	<b>Sulfato removido (mM)</b>	<b>Acetato (mM)</b>
I	$5,8 \pm 3,2$	$2,5 \pm 0,6$
IIa	$5,5 \pm 1,1$	$3,3 \pm 1,2$
IIb	$6,7 \pm 1,2$	$3,3 \pm 1,2$
IIc	$5,3 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,1$
IIIa	$6,3 \pm 4,5$	$14,1 \pm 5,6$
IIIb	$10,6 \pm 0,8$	$6,6 \pm 1,4$
IIIc	$0,9 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,6$
IV	$5,6 \pm 1,0$	$8,8 \pm 1,0$

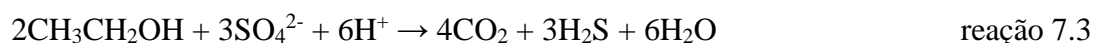
O glicerol pode ser oxidado pelas vias completa e incompleta. A oxidação incompleta do glicerol resulta na produção do acetato. Em pH 5, considerando apenas o glicerol como doador de elétrons, a completa oxidação de 4 mM do glicerol requer 7 mM de sulfato pela via sulfetogênica (reação 7.1), enquanto a via incompleta requer 3 mM de sulfato para oxidar 4 mM de glicerol e converte-lo em 4 mM de acetato e 3 mM de sulfeto, como representado na reação 7.2 (Kimura et al., 2006).



Dessa forma, como foram adicionados 5,4 mM de glicerol, o consumo de sulfato não ultrapassaria os 4,5 mM na oxidação incompleta e 10,5 mM pela via completa. Os resultados indicam que a redução do sulfato ocorreu tanto pela via completa quanto incompleta. A conversão do glicerol pela via incompleta foi equivalente a  $2,5 \pm 0,6$  mM, o equivalente à produção do acetato, reduzindo 1,87mM de sulfato, considerando-se apenas a sulfetogênese

como via de oxidação. Os outros 4 mM de sulfato reduzidos foram devidos à via completa em que foram oxidados 2,3 mM de glicerol. Ou seja, aproximadamente 70 % da redução do sulfato ocorreu pela via completa.

Na Fase IIa, a redução média de sulfato foi de  $5,5 \pm 1,1$  mM ( $15,6 \pm 2,9$  %), quando se utilizou etanol e glicerol como doadores de elétrons. Após a completa transição para o etanol na Fase IIb, a redução média do sulfato foi de  $6,7 \pm 1,2$  mM ( $18,7 \pm 3,3$  %) (Tabela 7.7). Fazendo o balanço de massa, 1,65 mM de sulfato foram reduzidos pela via incompleta, gerando  $3,3 \pm 1,2$  mM de acetato (reação 7.3) e 4 mM de sulfato reduzidos pela via completa oxidando 2,7 mM de etanol (reação 7.4).



Considerando que a redução do sulfato tenha ocorrido via oxidação completa, seriam necessários 11,25 mM de sulfato para remover 7,5 mM de etanol na Fase IIc e apenas 3,75 mM de sulfato pela via incompleta, gerando 7,5 mM de acetato. Nessa fase (IIc), foram reduzidos  $5,3 \pm 0,2$  mM de sulfato e  $4,61 \pm 0,1$  mM de acetato foram gerados. Dessa forma, se 4,6 mM de acetato foram gerados, a mesma quantidade de etanol foi oxidada pela via incompleta (reação 7.4) utilizando aproximadamente 2,3 mM de sulfato. Sendo os outros 3 mM de sulfato reduzidos responsáveis pela oxidação de 2 mM de etanol via oxidação completa (reação 7.3). Nessa fase, houve 50 % de redução do sulfato, sendo aproximadamente 56 % do sulfato removido pela via completa.

Comparando as fontes de carbono glicerol e etanol, o glicerol por conter 3 carbonos e o etanol 2 C, foi necessário aumentar a concentração de 5 mM para 7,5 mM para o etanol. O potencial doador de elétrons utilizando o glicerol é de  $14 e^-$  por mol reduzido, como foram usados 5 mols, o total de elétrons disponíveis é de 70 elétrons, enquanto para o etanol são  $12 e^-$  por mol, totalizando 30 a 120 elétrons disponíveis. A velocidade de redução do sulfato média foi de  $88 \pm 58$   $\mu\text{Moles SO}_4^{2-} \text{ red L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na Fase I,  $80 \pm 39$  na Fase IIa,  $143 \pm 30$  na Fase IIb e  $142 \pm 25$   $\mu\text{Moles SO}_4^{2-} \text{ red L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  na Fase IIc. Como há maior fluxo de elétrons, a velocidade de redução do sulfato também foi maior quando o etanol foi o principal doador de  $e^-$ , conseqüentemente, diminuindo o TDH médio nessas fases (Figura 7. 4). Resultados semelhantes foram reportados por Guo et al. (2019).



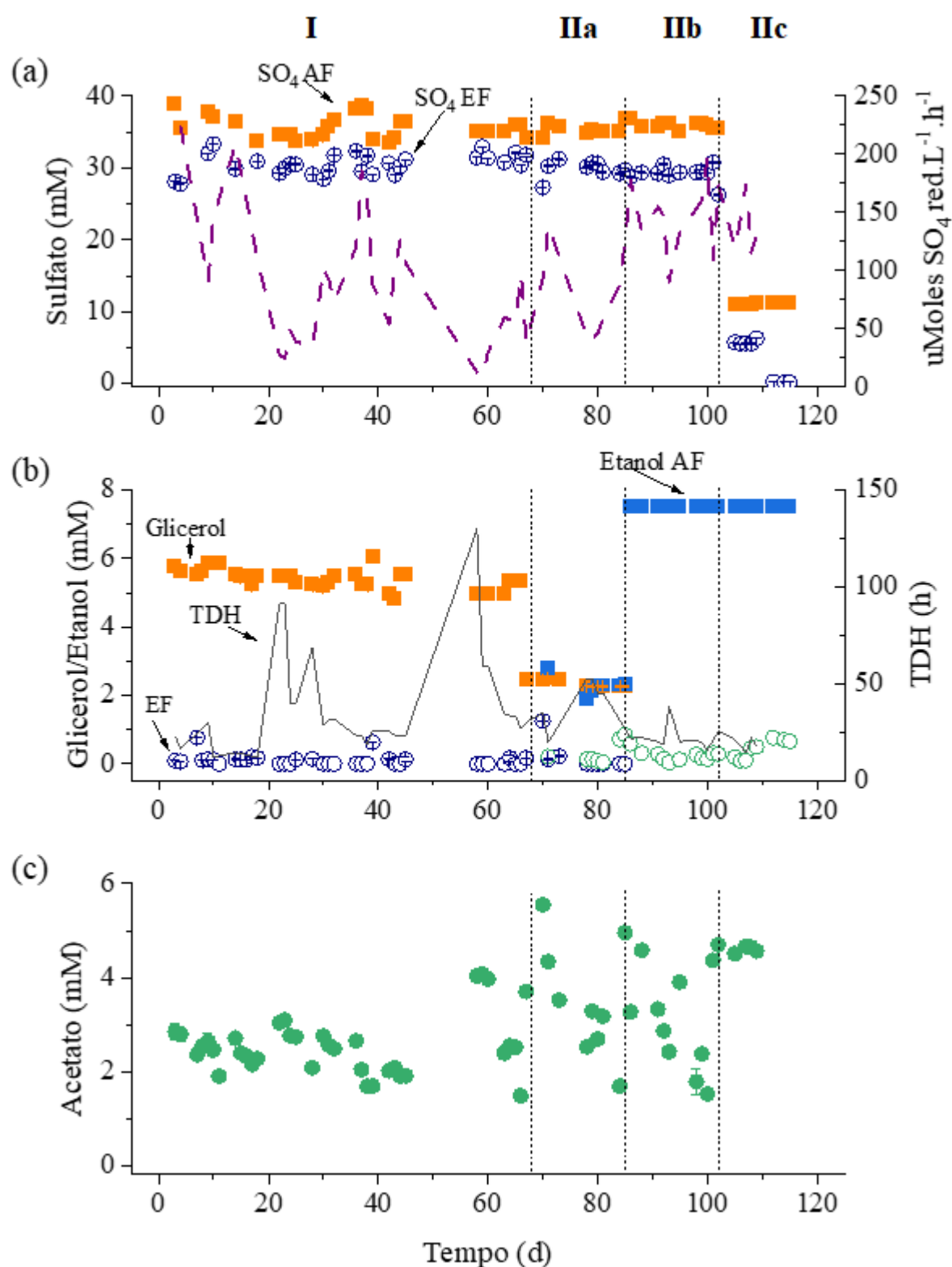


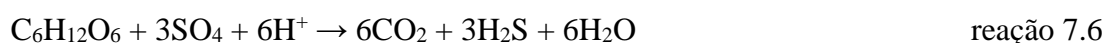
Figura 7. 4- Concentração de sulfato, glicerol/etanol e acetato correspondentes às Fases I e II (a, b e c). (a)- Concentração de sulfato afluyente (■), efluente (○) e velocidade de redução do sulfato (--); (b)- Concentração de glicerol afluyente (■), efluente (○), etanol afluyente (■), efluente (○) e TDH (--); (c)- Concentração efluente de acetato (●).

Do dia 112 ao dia 131 (Fase IIIa), devido à elevada concentração de sacarose adicionada, a concentração de acetato atingiu 20 mM (1180 mg L<sup>-1</sup>), levando à acidificação do meio, o que ocorreu devido à oxidação incompleta das fontes de carbono na Fase IIIa (Figura 7. 5). Como a alimentação esteve condicionada ao pH interno do reator (pH= 5), devido à acidificação do meio e o comprometimento da biomassa (seção 7.3.1.3), o pH ficou abaixo de 5 e a sulfetogênese comprometida.

Devido à esterilização a pressão e calor (autoclave) do meio afluente, a sacarose foi degradada em glicose e frutose (possuem a mesma forma molecular) antes de alimentar o reator (reação 7.5). No efluente, o acetato foi detectado nas concentrações médias de 14,1 ± 5,6 na Fase IIIa, 6,6 ± 1,4 na Fase IIIb e 4,6 ± 0,6 na Fase IIIc. Além do acetato, o residual médio de 1,43 mM de etanol foi detectado no efluente.



De acordo com a reação 7.6, a oxidação completa da frutose e/ou glicose via sulfetogênese necessitaria de 3 mM de sulfato, reduzindo-o a sulfeto e CO<sub>2</sub>. No entanto, o acetato foi detectado em todas as amostras efluentes. A reação que descreve a conversão da glicose/frutose a acetato (via oxidação incompleta) está descrita na reação 7.7. No entanto, não é possível estimar quanto do acetato gerado foi decorrente das diferentes fontes de carbono, impossibilitando também estimar o fluxo de elétrons para a redução do sulfato.



A fonte de carbono utilizada influenciou diretamente na atividade sulfetogênica (Guo et al., 2019). O acúmulo do acetato a partir do início da Fase III pode ter favorecido outras rotas metabólicas, diminuiu a produção de alcalinidade e a concentração de sulfeto (Sahinkaya et al., 2018). Sánchez-Andrea et al. (2014) reportaram que em pH 6,2, a produção de 25 mM de acetato provocou a inibição de 50 % das BRS devido à 0,9 mM estar na forma não dissociada do ácido acético.

Devido a isso, a Fase IIIb teve como objetivo recuperar as BRS aumentando a concentração de sulfato afluente para 35,8 mM, ou seja, impondo pressão de seleção para o desenvolvimento das BRS. Após recuperação da sulfetogênese, na Fase IIIc houve a

substituição do glicerol para o etanol novamente e a partir da Fase IV o aumento gradual da sacarose, frutose e glicose, a fim de verificar o efeito da fonte de carbono na diversidade microbiana.

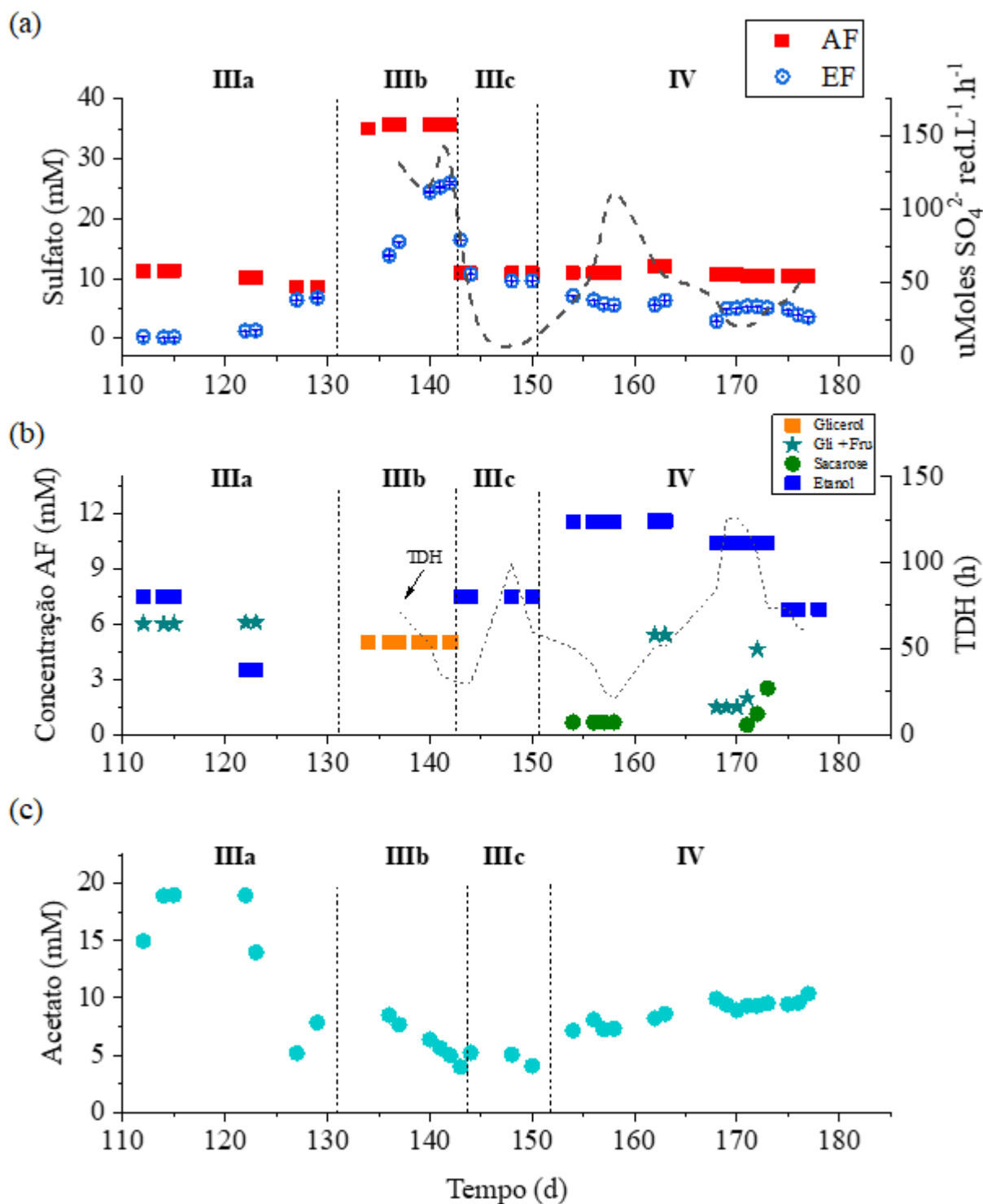


Figura 7. 5- Concentração de sulfato, glicerol, glicose-frutose, sacarose e etanol, e acetato correspondentes às Fases III (a, b e c) e IV. (a)- Concentração de sulfato afluente (■), efluente (○) e velocidade de redução do sulfato (--); (b)- Concentração afluente de glicerol (■), glicose + frutose (☆), sacarose (●) e etanol (■); (c)- Concentração efluente de acetato (●).

Embora a adição brusca da sacarose na Fase IIIa sem adequada adaptação tenha levado à acidificação do meio, não foi verificado efeito negativo desse açúcar na Fase IV, em que  $5,6 \pm 1,0$  mM de sulfato foram reduzidos. No entanto, a velocidade de redução do sulfato média decaiu para  $48 \pm 29$   $\mu\text{Moles. SO}_4^{2-}$  red  $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , elevando o TDH médio para  $71 \pm 34$  h.

A maior velocidade de redução do sulfato e produção de sulfeto foi reportada por Guo et al. (2019) utilizando o acetato de sódio como doador de elétrons, seguido pelo etanol, metanol, glicerol, ácido pirúvico, ácido acético, glicose, sacarose, ácido málico, ácido fórmico, N-propanol, N-butanol, ácido lático, lactato de sódio, ácido propiônico e propionato de sódio. As velocidades de redução de sulfato oscilaram de  $28,20$   $\text{mgS L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , representando a maior velocidade utilizando o acetato de sódio, a  $2,87$   $\text{mgS L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , utilizando propionato de sódio, sendo, a velocidade de redução do último correspondente a 10 % do valor atribuído ao acetato de sódio (Guo et al., 2019). De fato, a velocidade de redução do sulfato média, no presente trabalho, foi menor com glicerol quando comparado ao etanol.

No entanto, a glicose foi reportada como o substrato orgânico com melhor custo-benefício no processo de redução de sulfato e alta produção de sulfeto ( $20$   $\text{mgS L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ou  $0,625$   $\text{mMS L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), com custo médio de  $5,94$  kg de sulfeto.  $\text{\$}^{-1}$ , enquanto a sacarose correspondeu à velocidade de produção de  $14,52$   $\text{mgS L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ou  $0,45$   $\text{mMS L}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Guo et al., 2019).

A velocidade de produção do  $\text{H}_2\text{S}$  foi calculada a partir da precipitação de cobre como sulfeto metálico no sistema *off-line*. A maior produção de  $\text{H}_2\text{S}$  foi verificada na Fase IIa ( $121 \pm 56$   $\mu\text{Moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) e o comportamento foi semelhante nas Fases I, IIb e IIc em que a velocidade média de produção do  $\text{H}_2\text{S}$  foi de aproximadamente  $100$   $\mu\text{Moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Figura 7. 6). Nas Fases III e IV esses valores diminuíram em torno de 40 %, acompanhando a velocidade de redução de sulfato.

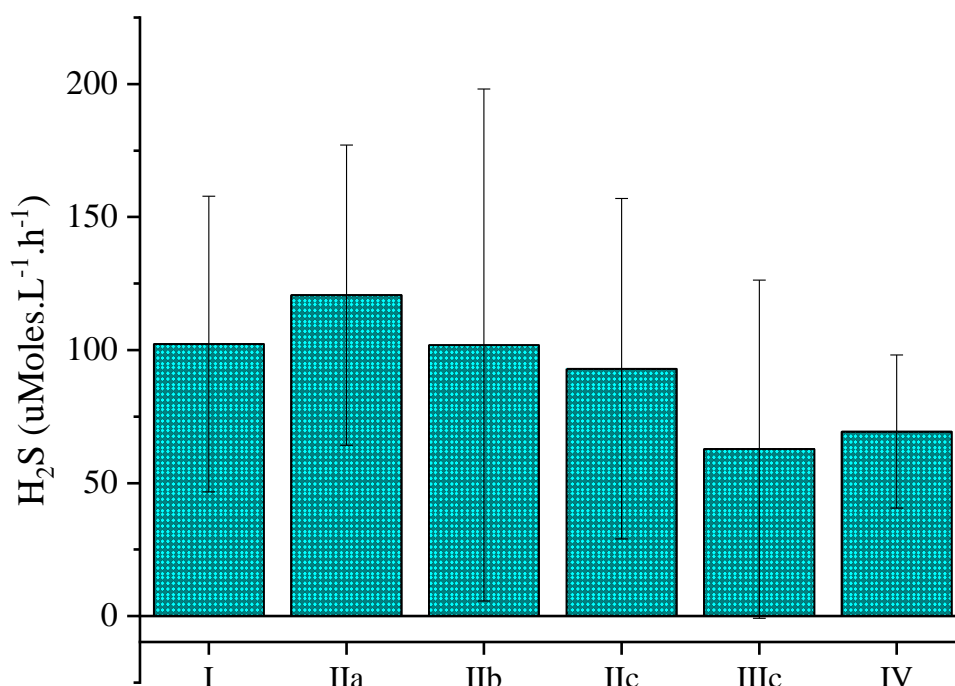


Figura 7. 6- Velocidade de produção de H<sub>2</sub>S em µMoles L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

### 7.3.1 Diversidade taxonômica da comunidade microbiana

Foram sequenciadas 25 amostras referentes a operação de 180 dias do reator. Essas amostras foram sequenciadas em duas bateladas, sendo as 14 primeiras amostras referentes a 100 dias de operação na primeira batelada e as 11 amostras restantes na segunda batelada, em ordem cronológica. Na primeira batelada de sequenciamento foram identificadas 236 unidades taxonômicas operacionais (OTU) a nível de família e gênero. Em alguns casos foi possível identificar a nível de espécies e 17 OTUs não identificados em nenhum nível.

Na segunda batelada de análise, foram identificados 275 OTU, sendo 21 sem identificação. No total, 22.723.060 pb de DNA foram sequenciados, 89.823 sequências com fragmentos de 232pb a 420 pb, com comprimento médio de 252pb.

A abundância relativa (AR) a nível de domínio foi atribuída à *Bacteria* com mais de 99,9 % das leituras. O Domínio *Archaea* representou menos de 0,1 % das leituras, que foram encontradas em apenas 6 amostras, sendo S2, S5, S7, S8 e S9 da Fase I e S3 da Fase II. Apenas dois gêneros foram identificados: *Ferroplasma* e *Thermogymnomonas*, com abundâncias relativas inferiores a 0,1 %.

Os principais filos representantes do Domínio *Bacteria* encontradas nas 25 amostras foram em média: *Firmicutes* (70,7 %), *Bacteroidetes* (22,8 %), *Proteobacteria* (3,9 %) e *Actinobacteria* (2,6 %) em menor abundância *Cyanobacteria* e *Nitrospirae*, representando menos de 0,01 % e não-classificados 0,1 % da AR (Figura 7. 7).

A AR do filo *Bacteroidetes* diminuiu sistematicamente até o dia 31 de operação. A partir de então, o filo *Proteobacteria* começa a aparecer em maior abundância nas amostras, coincidindo com a menor concentração de sulfato adicionado ao meio (a partir da Fase IIc- dia 101). A presença do filo *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* pode estar relacionada à concentração de acetato no efluente e à concentração de sulfato. Devido ao aumento da concentração de sulfato na Fase IIIb (dia 132) para 35,8 mM a AR desses filos diminuiu, mas a alteração na concentração para 10,8 mM de sulfato a partir da Fase IIIc (dia 143) a AR do filo *Proteobacteria* tornou a aumentar.

Maiores concentrações de acetato no efluente, superior a 10 mM durante a Fase IIIa, favoreceram as bactérias fermentativas do filo *Bacteroidetes* (gênero *Paludibacter*). Esse aumento coincide com a diminuição da concentração de sulfato que se deu a partir da Fase IIc (dia 101) e resultou na diminuição da AR do filo *Firmicutes*, onde se encontram as BRS. A adição da sacarose, glicose e frutose beneficiou os filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*.

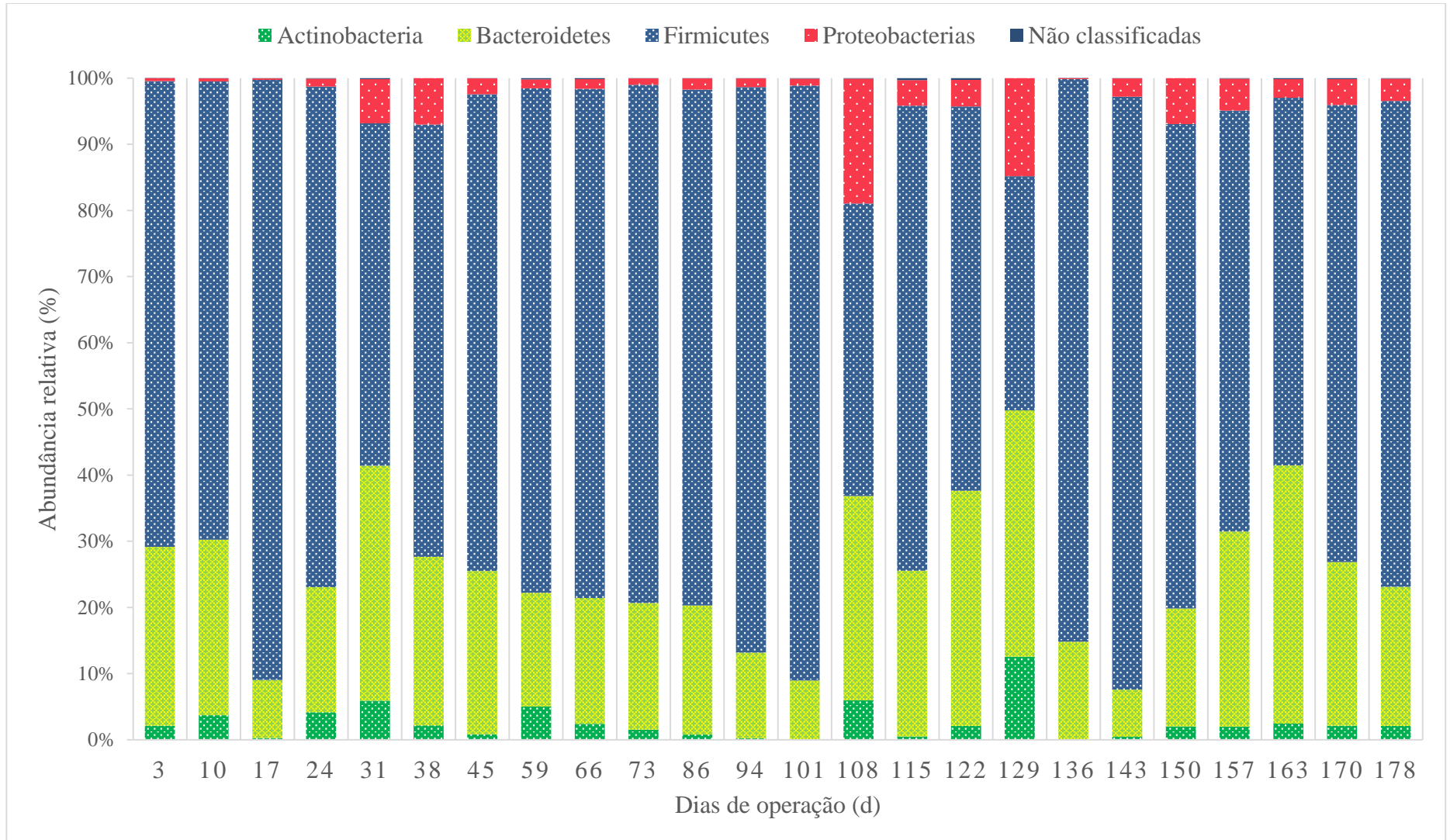


Figura 7.7- AR dos filós identificados na biomassa suspensa do reator.

## 7.3.1.1 Fase I

Na Fase I da operação (66 dias), de acordo com as análises, as amostras S1 a S9 apresentaram forte dominância dos gêneros *Desulfosporosinus* e *Paludibacter* (Tabela 7.8). Da família *Ruminococcaceae*, os gêneros mais abundantes identificados foram *Ethanoligenens* e *Oscillospira*, outros gêneros dessa família e da família *Gracilibacteraceae* não foram identificados.

Tabela 7. 8- Relação das amostras S1 a S9 equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 8 e os número de *reads* classificados em Família e Gêneros.

	<b>Tempo (d)</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>17</b>	<b>24</b>	<b>31</b>	<b>38</b>	<b>45</b>	<b>59</b>	<b>66</b>
<b>Taxonomia</b>	<b>Ref.</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>	<b>S9</b>
<i>Desulfosporosinus</i>	A	4711	3701	9913	3534	2171	2931	5379	284	649
<i>Paludibacter</i>	B	1971	1761	1018	1686	2281	1467	2539	253	222
<i>Ruminococcaceae</i>	C	238	531	256	763	690	330	828	67	80
<i>Cellulomonas</i>	D	145	241	19	360	350	110	73	72	24
<i>Ethanoligenens</i>	E	75	105	64	260	470	114	326	34	46
<i>Gracilibacteraceae</i>	F	61	186	170	2210	253	312	745	744	137
<i>Anaerovorax</i>	G	50	81	38	131	86	100	289	15	26
<i>Acidithiobacillus</i>	H	31	29	24	102	400	65	202	17	7

Com exceção das amostras S4 e S8, os gêneros *Desulfosporosinus* e *Paludibacter* foram os maiores representantes microbianos nas amostras. E na amostra S1, referente ao terceiro dia de operação do reator, os gêneros *Desulfosporosinus* e *Paludibacter* representaram juntas 91 % da abundância relativa total (Figura 7. 8).



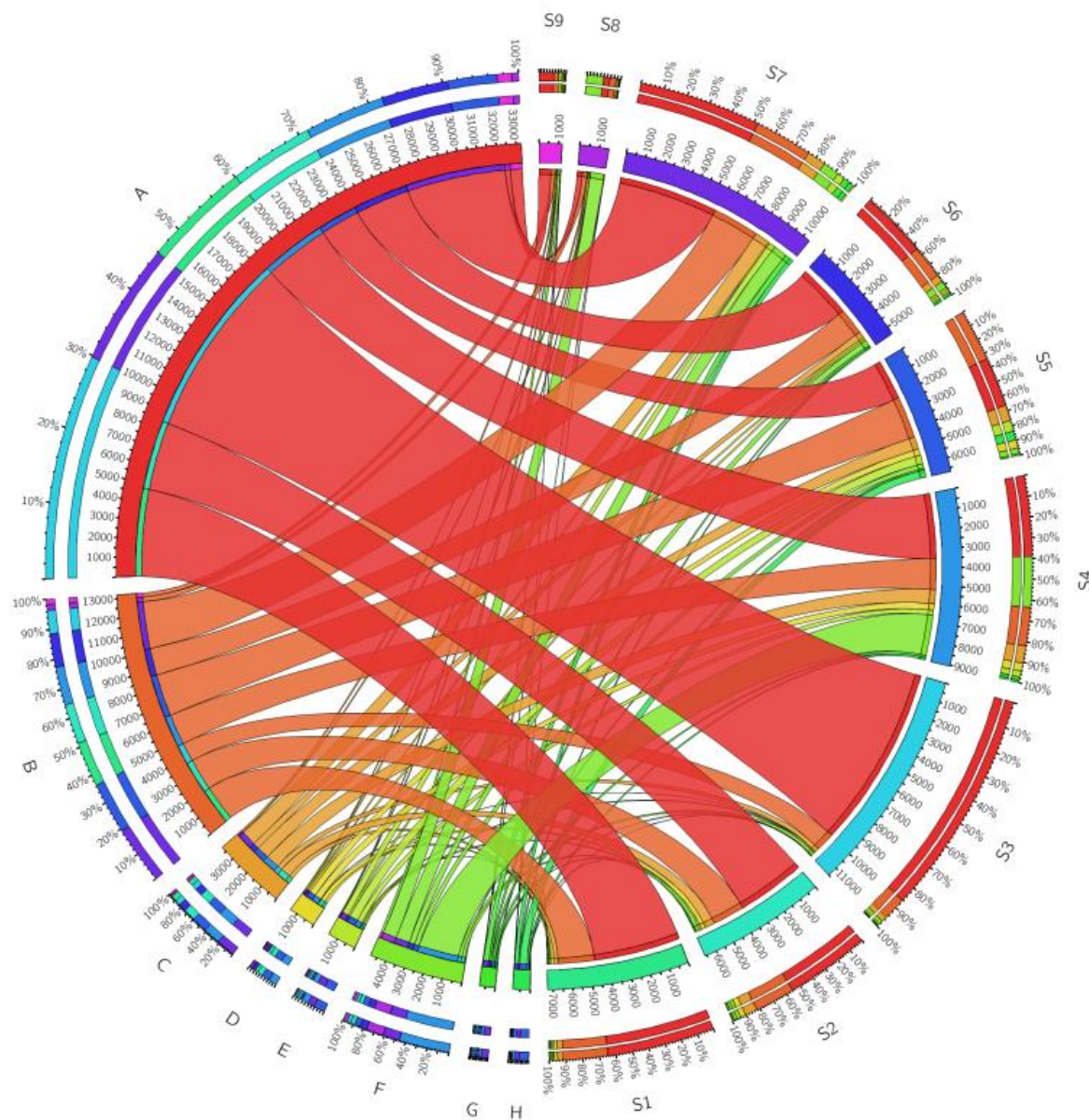


Figura 7. 8- Principais Famílias e Gêneros do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa suspensa do reator na Fase I. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 3 de operação; S2- dia 10; S3- dia 17; S4- dia 24; S5- dia 31; S6- dia 38; S7- dia 45; S8- dia 59, e; S9- dia 66. Com relação à taxonomia: A- *Desulfosporosinus*; B- *Paludibacter*; C- Família *Ruminococcaceae*; D- *Cellulomonas*; E- *Ethanoligenens*; F- Família *Gracilibacteraceae*; G- *Anaerovorax*; H- *Acidithiobacillus*.

O gênero *Desulfosporosinus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Clostridia* e família *Peptococcaceae*. São anaeróbias, redutoras de sulfato, tolerantes a metais e a pH ácido. Esse gênero possui espécies capazes de utilizar além do sulfato, o nitrato, o Fe (III) e o As (V) como aceptor final de elétrons ou por processos fermentativos (Sato et al., 2019). A remoção de selenato, de composição química semelhante ao sulfato, intermediada por *Desulfosporosinus* foi reportada por Liu et al. (2018).

Podem utilizar diversas fontes de carbono de cadeias simples como glicerole algumas espécies oxidam de forma incompleta os compostos orgânicos (Ñancuqueo; Johnson, 2012), lactato (Ikkert et al., 2013), etanol (Karnachuk et al., 2015) e etc, mas também compostos aromáticos (Liu et al., 2004; Pester et al., 2012) e o hidrogênio como doadores de elétrons quando em sintrofismo com bactérias oxidadoras de acetato (Kimura et al., 2006).

Membros do gênero *Desulfosporosinus* estão amplamente relacionados à DAM (Kimura et al., 2006; Karnachuk et al., 2009; Ikkert et al., 2013; Sato et al., 2019), solos naturais e águas sulfurosas (Pester et al., 2012). Já foram reportados também em ambientes extremamente ácidos, como a espécie *Desulfosporosinus acidiphilus*, isolada de uma área de sedimentação de DAM (Alazard et al., 2010).

Espécies do gênero sobrevivem sob condições ambientais extremas de tempo seco, pH ácido e na presença de oxigênio devido a capacidade de formação de esporos, o que lhes confere resistência ambiental (Kimura et al., 2006).

Sánchez-Andrea et al. (2011, 2013) reportaram o sintrofismo entre o gênero *Desulfosporosinus* e *Paludibacter* em amostras de sedimento do Rio Tinto enriquecidas em pH variando de 4 a 6,5. De acordo com Kimura et al. (2006), *Desulfosporosinus acididurans* em sintrofismo com *Acidocella aromática*, que converte o acetato em hidrogênio e CO<sub>2</sub>, pode utilizar o hidrogênio produzido como doador de elétrons para reduzir o sulfato.

A espécie *Desulfosporosinus meridiei*, assim como no presente estudo, predominou nos reatores reportados por Sato et al. (2019) no tratamento passivo da DAM. Ilhan-Sungur et al. (2017) isolaram colônias de *Desulfosporosinus meridiei* e *Clostridia* a partir de torres de refrigeração de hotéis de Istambul para verificar o potencial de corrosão dessas espécies devido à produção de sulfeto.

O gênero *Paludibacter* pertence ao Filo *Bacteroidetes*, classe *Bacteroidia* e família *Porphyromonadaceae*. São bactérias estritamente anaeróbias, células Gram-negativa, não formadoras de esporos e quimiorganotróficas. São fermentativas e utilizam glicose, frutose, xilose, maltose, entre outros açúcares, como fonte de energia e produzem acetato e propionato como os principais subprodutos e não utilizam o sulfato como aceptor final de elétrons (Ueki et al., 2006).

Bactérias do gênero *Paludibacter* foram encontradas em sedimentos da Rio Tinto (Sánchez-Andrea et al., 2013) e no sedimento enriquecido (Sánchez-Andrea et al., 2011) utilizando glicerol, lactato e metanol como fontes de energia e carbono. Estão presentes em condições menos oxidadas, enquanto redutoras de sulfato como *Desulfurella* spp. e *Desulfosporosinus* spp. encontram-se em condições mais reduzidas.

Burgess (2011) relata a possibilidade de que espécies do gênero poderiam reduzir o sulfato para crescimento celular e Liang et al. (2013) acreditam que bactérias do gênero *Paludibacter* tiveram grande influência no bom desempenho da redução de sulfato no reator sulfetogênico operando em pH 4,5.

O gênero também foi identificado representando 28,6 % da comunidade microbiana de um reator sulfetogênico reportado por Guo et al. (2019). Foi o segundo gênero com maior abundância ficando atrás somente do gênero *Desulfurella* que representou 44,4 % da abundância relativa (Guo et al., 2019). Os autores relacionaram a dependência de bactérias fermentativas (como *Paludibacter* e *Anaerofilum*) para o bom desempenho da velocidade de produção de sulfeto reportada.

Na amostra S3, ocorreu uma mudança na biomassa em que a abundância relativa do gênero *Desulfosporosinus*, correspondeu a 86 % do total analisado, nas amostras anteriores, S1 e S2, a abundância desse gênero correspondia a 64 e 55 %, respectivamente. Essa mudança coincide com a diminuição de acetato residual e à menores valores de TDH aplicados à Fase I.

Sendo as espécies identificadas e caracterizadas pertencentes ao gênero *Paludibacter*, a abundância relativa da amostra S1 a S7 (~30 %) pode estar relacionada à uma rota metabólica fermentativa, gerando produtos intermediários que em sintrofismo com BRS auxiliam na redução de sulfato (Sánchez-Andrea et al., 2011), uma vez que estudos reportados por Liang et al. (2013) e Guo et al. (2019) também verificaram grande abundância do gênero em reatores sulfetogênicos.

Próximo ao 20º dia de operação, o TDH aumentou em mais de 100 % e a concentração de acetato oscilou de 2,3 mM para 3,1 mM. O aumento do acetato e do TDH podem ter influenciado na mudança significativa na composição da comunidade bacteriana referente à amostra S4 (dia 24), em que apenas 39 % da abundância relativa correspondia ao gênero *Desulfosporosinus* e o que representava menos de 1 % na amostra S1 (dia 3), após os 20 dias de operação, 24 % da biomassa presente correspondia à família *Gracilibacteraceae*.

A família *Gracilibacteraceae* pertence ao Domínio *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Clostridia* e ordem *Clostridiales*. Espécies da família *Gracilibacteraceae* são anaeróbias obrigatórias quimiorganotróficas, crescem bem sob condições termofílicas ou moderadamente termofílica, requerendo extrato de levedura para seu crescimento (Lee; Wiegel, 2017). Apenas o gênero *Lutispora* pertencente a essa família produz H<sub>2</sub>S, esse gênero foi incluído recentemente à família *Gracilibacteraceae* (Stackebrandt, 2014) que contava com apenas um gênero e uma espécie caracterizada (*Gracilibacter thermotolerans*) (Lee et al., 2006). A espécie

*Gracilibacter thermotolerans* foi isolada a partir do sistema de lagoas para o tratamento de águas ácidas com elevada concentração de ferro e sulfato (Lee et al., 2006).

O acetato, etanol e lactato são os principais produtos finais decorrentes da fermentação de carboidratos e açúcares por *Gracilibacteraceae*. E de acordo com Lee et al. (2006) e Lee e Wiegel, (2017), não há evidências de que utilizem o sulfato, sulfito, tiosulfato ou enxofre elementar como acceptor final de elétrons. Dessa forma, o aumento da abundância relativa correspondendo a quase 1:4 do total da comunidade microbiana pode estar ligada à menor velocidade de reação da sulfetogênese, aumento de bactérias fermentativas, acúmulo de acetato e aumento do TDH (Figura 7. 4).

No 31º dia de operação (S5), a comunidade microbiana do gênero *Paludibacter* superou *Desulfosporosinus* (32 %), representando 34 % da abundância relativa. No período do dia 22 ao dia 30, houve uma redução na velocidade de redução do sulfato, que só aumentou a partir do dia 30. As amostras S6 e S7 representaram o mesmo padrão das amostras iniciais.

Problemas como obstrução das mangueiras foram recorrentes ao longo da operação. Devido à obstrução das mangueiras, o reator não alimentou por 15 dias e esse tempo parado refletiu nas amostras S8 e S9 com menor número de *reads* demonstrando a redução da população microbiana como representado na Figura 7. 8 (Fase I). Na amostra S8, a família *Gracilibacteraceae* representou 50 % da abundância relativa analisada.

Após a desobstrução do sistema de alimentação do reator no dia 59, a amostra S9 apresentou leve aumento na abundância relativa dos gêneros *Desulfosporosinus* e *Paludibacter* e diminuição da família *Gracilibacteraceae*.

Outros gêneros em menor abundância também foram identificados como *Anaerovorax*, *Acidithiobacillus* e *Cellulomonas*. *Acidithiobacillus* são bactérias acidofílicas e um dos gêneros mais encontrados em DAM (Singh et al., 2019). As espécies mais conhecidas são *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* devido à sua importância no processo de biolixiviação (Hallberg; Johnson, 2001). *At. thiooxidans* são bactérias quimiolitautotróficas que utilizam o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e obtém energia a partir da oxidação de enxofre e compostos reduzidos de enxofre (Méndez-García et al., 2015). Já a espécie *At. ferrooxidans* além de oxidar enxofre é também oxidadora do ferro.

#### 7.3.1.2 Fase II

Do dia 66 (Tabela 7.8, amostra S9) para o dia 73 (Tabela 7.9, amostra S1), a população microbiana aumentou consideravelmente, demonstrando uma rápida resposta às condições

impostas. A Fase II proporcionou o aumento da população microbiana quando comparada à Fase I. Além disso, a troca da fonte de carbono glicerol para o etanol favoreceu o aumento da população do gênero *Desulfosporosinus* em relação ao gênero *Paludibacter*, com a abundância relativa variando de 58 % (S1 e S3) para 80 % (S5) quando o etanol foi a única fonte de carbono.

Tabela 7.9- Relação das amostras S1 a S6 da Fase II equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 9 e os número de *reads* classificados em Família e Gêneros.

Taxonomia	Tempo(d) Ref.	Fase IIa		Fase IIb		Fase IIc
		S1	S3	S4	S5	S6
<i>Desulfosporosinus</i>	A	3791	4705	6321	5363	2057
<i>Paludibacter</i>	B	1269	1565	1112	596	2063
<i>Gracilibacteraceae</i>	C	770	660	331	248	45
<i>Ruminococcaceae</i>	D	474	720	514	302	788
<i>Ethanoligenens</i>	E	117	168	172	58	221
<i>Anaerovorax</i>	F	68	75	116	75	23
<i>Cellulomonas</i>	H	49	54	18	5	377
<i>Acidithiobacillus</i>	J	31	121	108	65	142
<i>Acidocella</i>	K	16	10	3	3	1034

A diminuição de 35mM de sulfato para 11mM provocou a diminuição da população do gênero *Desulfosporosinus* e aumento da proporção do gênero *Paludibacter*, representando 30 e 31 %, respectivamente da abundância relativa da amostra S6. Nessa amostra, o aparecimento do gênero *Acidocella* representou 15 % da abundância relativa e foi a maior mudança na biomassa decorrente de mudanças operacionais. Esse aumento expressivo dos gêneros *Paludibacter* e *Acidocella* pode estar relacionado à diminuição da concentração de sulfato, ao aumento da concentração de etanol afluyente, uma vez que *Acidocella* não utiliza o glicerol, mas também pode estar relacionado ao aumento do acetato na Fase IIc, visto que ao longo da Fase IIb, houve a diminuição sistemática do acetato.

O gênero *Acidocella* foi reclassificado e descrito por Kishimoto et al. (1995), caracterizando-o como acidofílicas, aeróbias, quimiorganotróficas e não utilizadoras de glicerol, compostos de enxofre ou ferro como fonte de energia. Espécies do gênero também foram reportadas como heterotróficas, anaeróbias facultativas e utilizadoras de acetato, que associadas a BRS oxidadoras incompletas formam um sintrofismo em que o acetato residual é catabolizado, gerando hidrogênio que é usado como doador de elétrons por BRS (Johnson; Hallberg, 2005; Jones et al., 2013; Nancuqueo et al., 2016; Falagán et al., 2017).

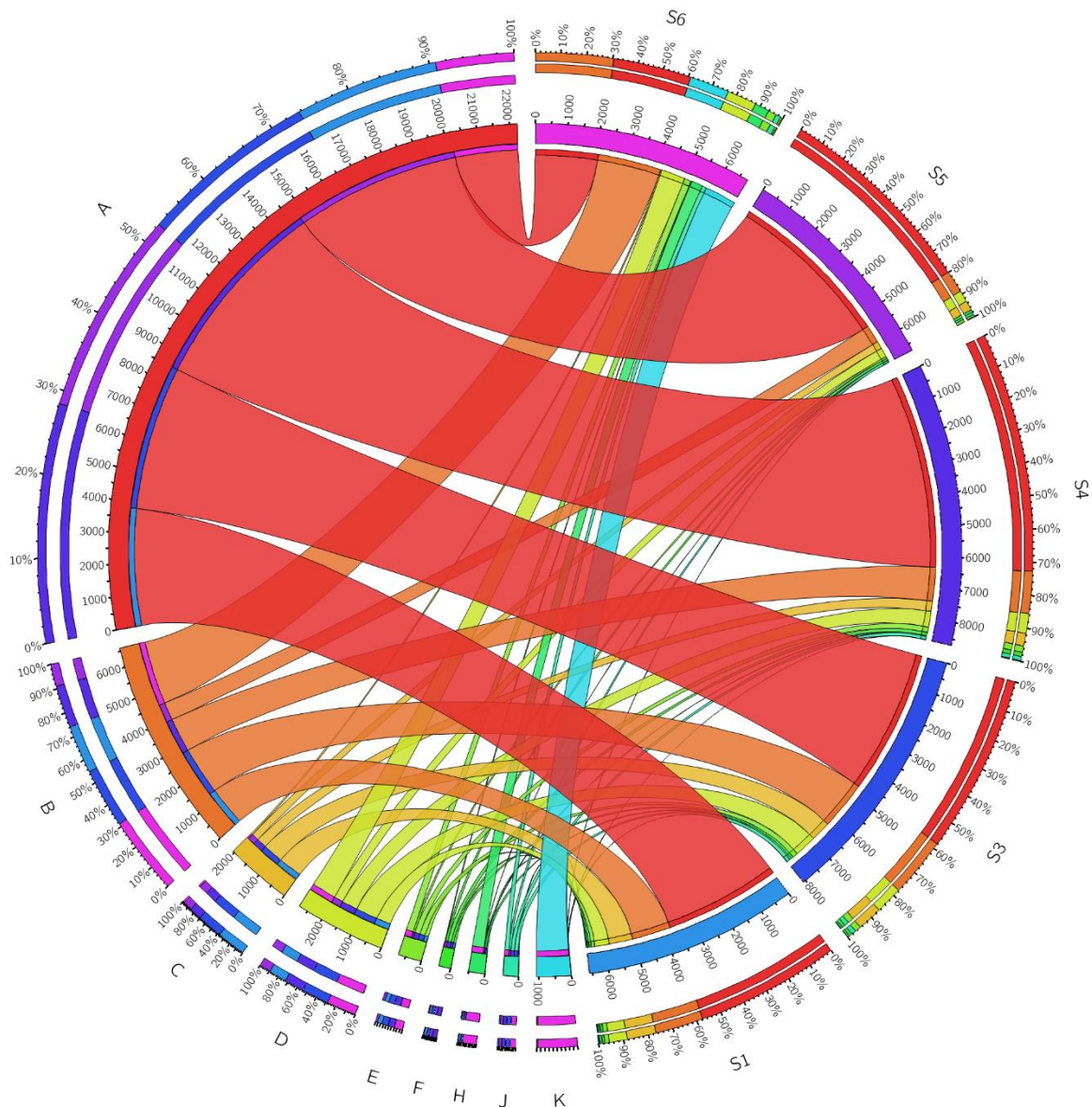


Figura 7. 9- Principais Famílias e Gêneros do Domínio *Bacteria* identificados na biomassa suspensa do reator na Fase II. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 73 de operação; S3- dia 86; S4- dia 94; S5- dia 101, e; S6- dia 108. Com relação à taxonomia: A- *Desulfosporosinus*; B- *Paludibacter*; C- Família *Gracilibacteraceae*; D- Família *Ruminococcaceae*; E- *Ethanoligenens*; F- *Anaerovorax*; H- *Cellulomonas*; J- *Acidithiobacillus*; K- *Acidocella*.

### 7.3.1.3 Fase III

A amostra S1 referente ao dia 108 foi mantida apenas para comparação com a amostra S2 (dia 115) após a mudança de fase com a adição de sacarose (glicose e frutose). Possivelmente a adição de sacarose afetou negativamente evidenciada pela redução no número de *reads* nas

amostras subsequentes (Tabela 7.10) e (Figura 7. 10), mas em especial as BRS representadas pelo gênero *Desulfosporosinus*, que foi o gênero mais dominante nas Fases I e II.

O acúmulo do acetato em até 20 mM na Fase IIIa favoreceram as bactérias fermentativas dos gêneros *Paludibacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Oxobacter* e da família *Gracilibacteraceae*. O aumento dessas bactérias fermentativas evidencia a maior competição pelo substrato e o baixo desempenho das redutoras de sulfato é refletido pela diminuição da abundância relativa de *Desulfosporosinus* e pela baixa redução de sulfato (Figura 7. 5).

Espécies com similaridade de 96 % com *Cellulomonas oligotrofica* Kc5 e 95 % de similaridade com *Clostridium pascui* DSM 10365<sup>T</sup> foram isoladas de um ambiente ácido. No entanto, após período de inoculação e operação, a eliminação de *Cellulomonas* do reator sulfetogênico foi atribuído ao sucesso das bactérias sulfetogênicas (González et al., 2019). E a presença do sintrofismo entre *Clostridium* e *Desulfosporosinus acididurans* favoreceu a sulfetogênese (González et al., 2019). A presença de *Oxobacter*, gênero similar ao *Clostridium* (Lee et al., 2006), também foi relatada por Kaksonen et al. (2006) e Sánchez-Andrea et al. (2014) em reatores sulfetogênicos.

Tabela 7. 10- Relação das amostras S1 a S7 da Fase III equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 10 e os número de *reads* classificados em Família e Gêneros.

Taxonomia	Tempo(d) Ref.	Fase IIIa				Fase IIIb	Fase IIIc	
		108 S1	115 S2	122 S3	129 S4	136 S5	143 S6	150 S7
<i>Cellulomonas</i>	A	377	11	72	477	1	22	100
<i>Desulfosporosinus</i>	B	2057	1671	1622	753	3300	2507	1101
<i>Paludibacter</i>	C	2063	695	1238	1423	610	368	875
<i>Ruminococcaceae</i>	D	788	161	259	543	130	352	479
<i>Ethanoligenens</i>	E	221	73	143	181	30	249	198
<i>Gracilibacteraceae</i>	F	45	86	115	35	54	5	1113
<i>Acidithiobacillus</i>	G	142	41	114	136	6	9	66
<i>Acidocella</i>	H	1034	1	22	396	0	133	273
<i>Oxobacter</i>	I	26	9	9	7	10	967	763
<i>Clostridium</i>	J	15	0	0	1	1	751	35
<i>Anaerovorax</i>	K	0	0	0	0	0	22	92

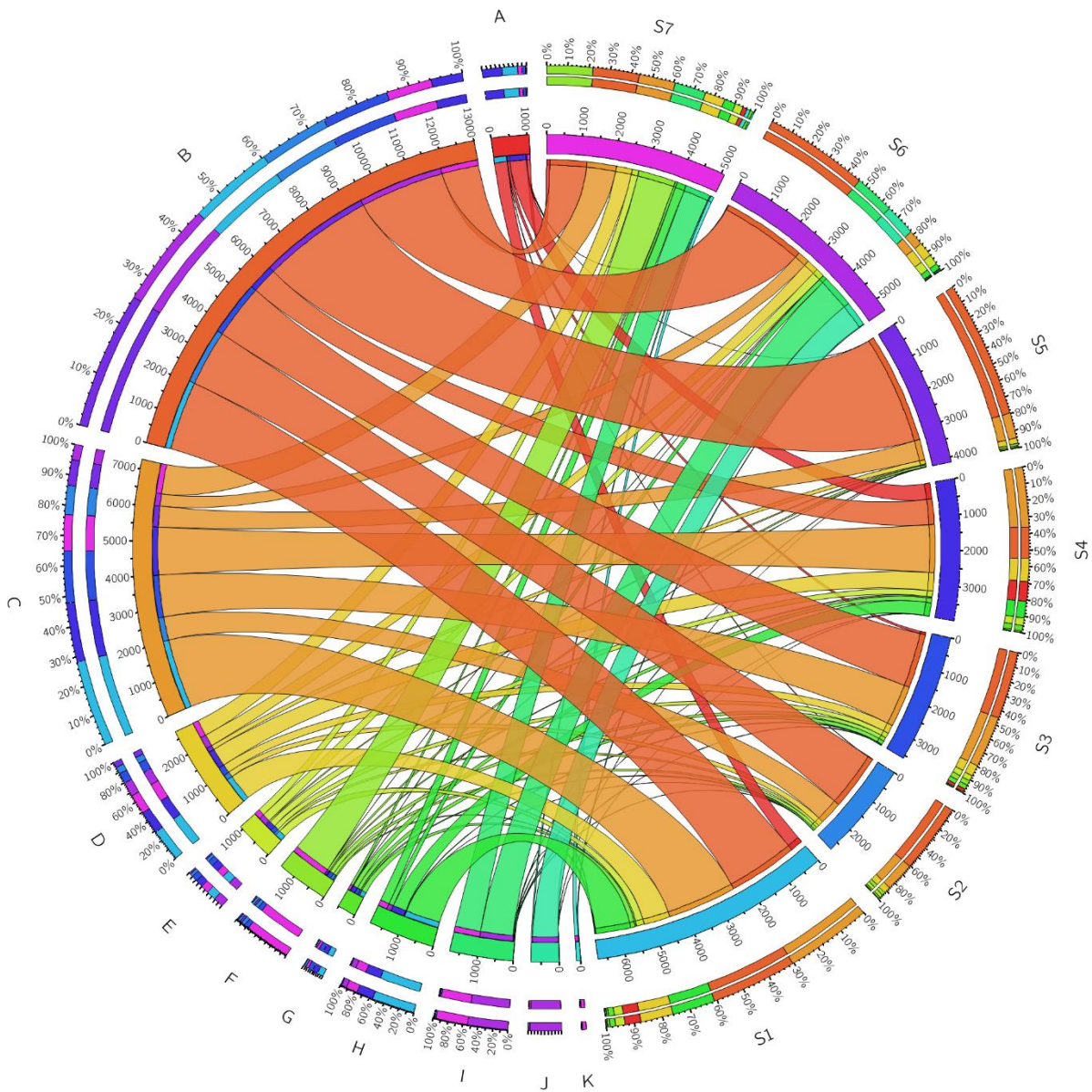


Figura 7. 10- Principais Famílias e Gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa suspensa do reator na Fase III. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 106 de operação; S2- dia 115; S3- dia 122; S4- dia 129; S5- dia 136; S6- dia 143, e; S7- dia 150. Com relação à taxonomia: A- *Cellulomonas*; B- *Desulfosporosinus*; C- *Paludibacter*; D- *Ruminococcaceae*; E- *Ethanoligenens*; F- *Gracilibacteraceae*; G- *Acidithiobacillus*; H- *Acidocella*; I- *Oxobacter*; J- *Clostridium*; K- *Anaerovorax*.



## 7.3.1.4 Fase IV

Na Fase IV, com a re-introdução da sacarose, frutose e glicose, as redutoras de sulfato que correspondiam a 44 % da abundância relativa no início da fase (S1, dia 157), ao final da operação (S4, dia 178) a presença do gênero *Desulfosporosinus* foi de apenas 23,4 %, prevalecendo as fermentativas da família *Ruminococcaceae* (45,7 %), do gênero *Paludibacter* (19,2 %), *Clostridium* (3,4 %), *Gracilibacteraceae* (2,2 %) e *Acidocella* representando 2,1 % da abundância relativa microbiana (Tabela 7.11). Outros gêneros representaram juntas 4 % da abundância relativa total.

Tabela 7. 11- Relação das amostras S1 a S4 da Fase IV equivalentes aos dias de operação, taxonomia com referência na Figura 7. 11 e os número de *reads* classificados em Família e Gêneros.

Taxonomia	Tempo(d) Ref.	Fase IV			
		157 S1	163 S2	170 S3	178 S4
<i>Paludibacter</i>	A	1207	1454	789	626
<i>Desulfosporosinus</i>	B	1847	878	692	765
<i>Ruminococcaceae</i>	C	351	764	608	1167
<i>Ethanoligenens</i>	D	136	493	199	327
<i>Gracilibacteraceae</i>	E	97	205	765	73
<i>Oxobacter</i>	F	196	126	102	49
<i>Cellulomonas</i>	G	80	83	62	40
<i>Acidithiobacillus</i>	H	41	63	85	23
<i>Clostridium</i>	I	66	50	3	111
<i>Acidocella</i>	J	151	41	40	68

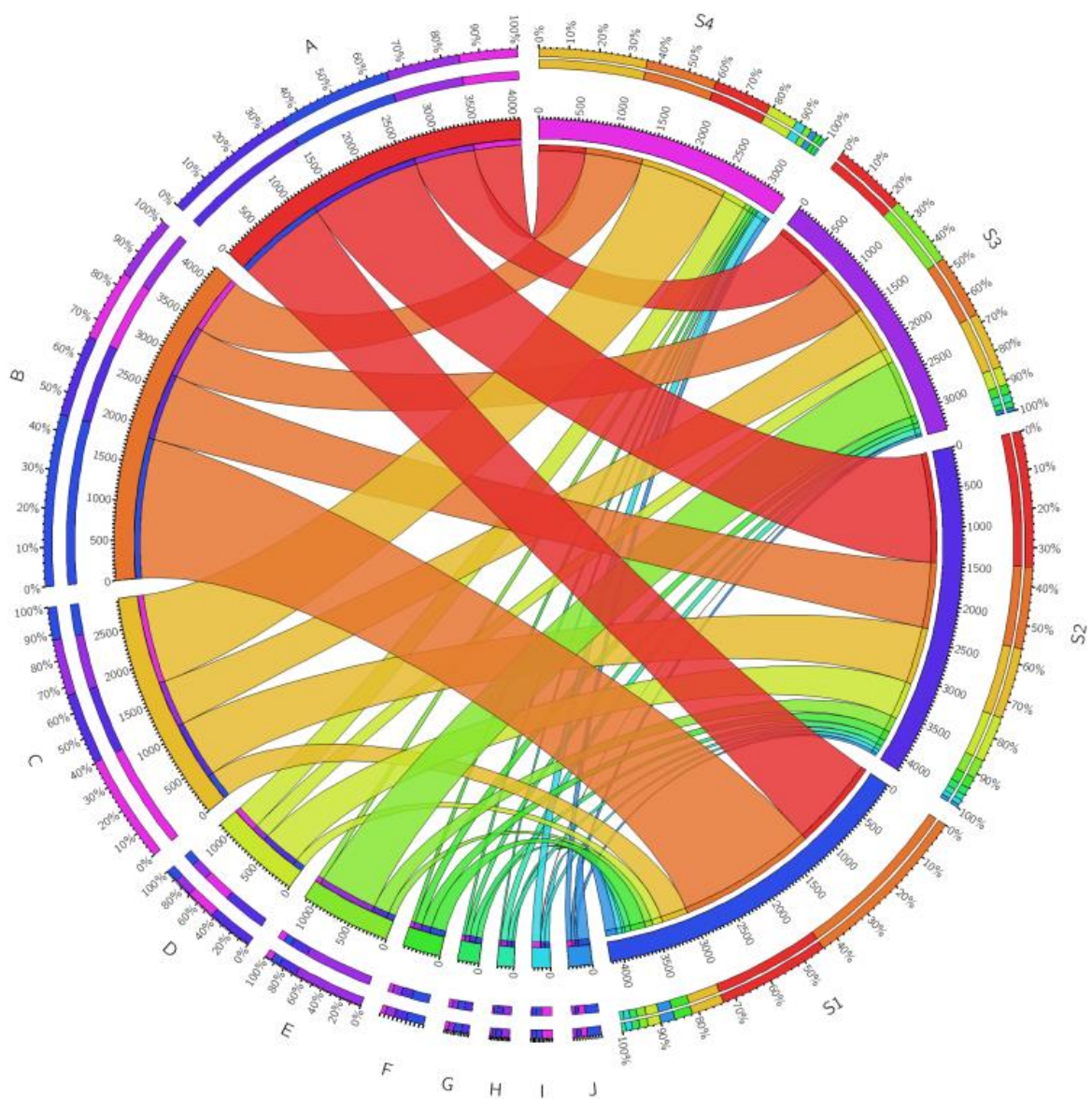


Figura 7. 11- Principais Famílias e Gêneros do Domínio Bacteria identificados na biomassa suspensa do reator na Fase IV. Legenda das amostras: S1- referente ao dia 157 de operação; S2- dia 163; S3- dia 170, e; S4- dia 178. Com relação à taxonomia: A- *Cellulomonas*; B- *Desulfosporosinus*; C- *Paludibacter*; D- *Ruminococcaceae*; E- *Ethanoligenens*; F- *Gracilibacteraceae*; G- *Acidithiobacillus*; H- *Acidocella*; I- *Oxobacter*; J- *Clostridium*.

### 7.3.2 Análise da diversidade microbiana e síntese geral

Os índices de diversidade Shannon e Simpson, Dominância e riqueza Chao1 estão apresentados na Tabela 7.12. Esses índices indicam a baixa diversidade e riqueza microbiana identificadas na biomassa suspensa do reator. Isso porque o inóculo utilizado adveio de um reator Mãe composto de bactérias acidófilas e ácido-tolerantes, que tem por finalidade manter essa comunidade sem a adição de biomassa externa. No entanto, a redução do sulfato e a

oxidação dos substratos ocorreram de forma eficiente e a baixa diversidade microbiológica não comprometeu a sulfetogênese, uma vez que BRS predominaram no sistema.

Tabela 7.12- Índices de diversidade, dominância e riqueza da biomassa microbiana.

	<b>I<sub>i</sub> (3)</b>	<b>I<sub>f</sub> (66)</b>	<b>II<sub>i</sub>(73)</b>	<b>II<sub>f</sub> (108)</b>	<b>III<sub>i</sub> (115)</b>	<b>III<sub>f</sub> (150)</b>	<b>IV<sub>i</sub> (157)</b>	<b>IV<sub>f</sub> (178)</b>
Índice Shannon (H')	1,252	1,678	1,554	2,077	1,448	2,227	1,902	2,218
Simpson (1-D)	0,555	0,674	0,634	0,805	0,596	0,852	0,732	0,826
Dominância (D)	0,445	0,326	0,366	0,195	0,404	0,149	0,268	0,174
Índice Chao1	84,2	40,4	102,9	241,3	74,5	142	101,8	240

Sendo “i”- amostra inicial de cada fase e “f”- amostra final de cada fase

A Tabela 7.13 e Figura 7. 12 apresentam a síntese dos resultados de modo a comparar a variação da comunidade microbiana referente ao início e final de cada fase ao longo de toda a operação do reator.

Tabela 7.13- Relação do número de *reads* classificados nas amostras iniciais e finais de cada fase, em parênteses os dias de operação e taxonomia a nível de Família e Gêneros.

<b>Taxonomia/Fase</b>	<b>I<sub>i</sub> (3)</b>	<b>I<sub>f</sub> (66)</b>	<b>II<sub>i</sub>(73)</b>	<b>II<sub>f</sub> (108)</b>	<b>III<sub>i</sub> (115)</b>	<b>III<sub>f</sub> (150)</b>	<b>IV<sub>i</sub> (157)</b>	<b>IV<sub>f</sub> (178)</b>
<i>Desulfosporosinus</i>	4711	649	3791	2057	1671	1101	1847	765
<i>Paludibacter</i>	1971	222	1269	2063	695	875	1207	626
<i>Ruminococcaceae</i>	238	80	474	788	161	479	351	1167
<i>Cellulomonas</i>	145	24	49	377	11	100	80	40
<i>Ethanoligenens</i>	75	46	117	221	73	198	136	327
<i>Gracilibacteraceae</i>	61	137	770	45	86	1113	97	73
<i>Anaerovorax</i>	50	26	68	23	0	92	25	9
<i>Acidithiobacillus</i>	31	7	31	142	41	66	41	23
<i>Acidocella</i>	0	0	16	1034	1	273	151	68
<i>Oxobacter</i>	53	5	31	26	9	763	196	49
<i>Clostridium</i>	4	1	0	15	0	35	66	111

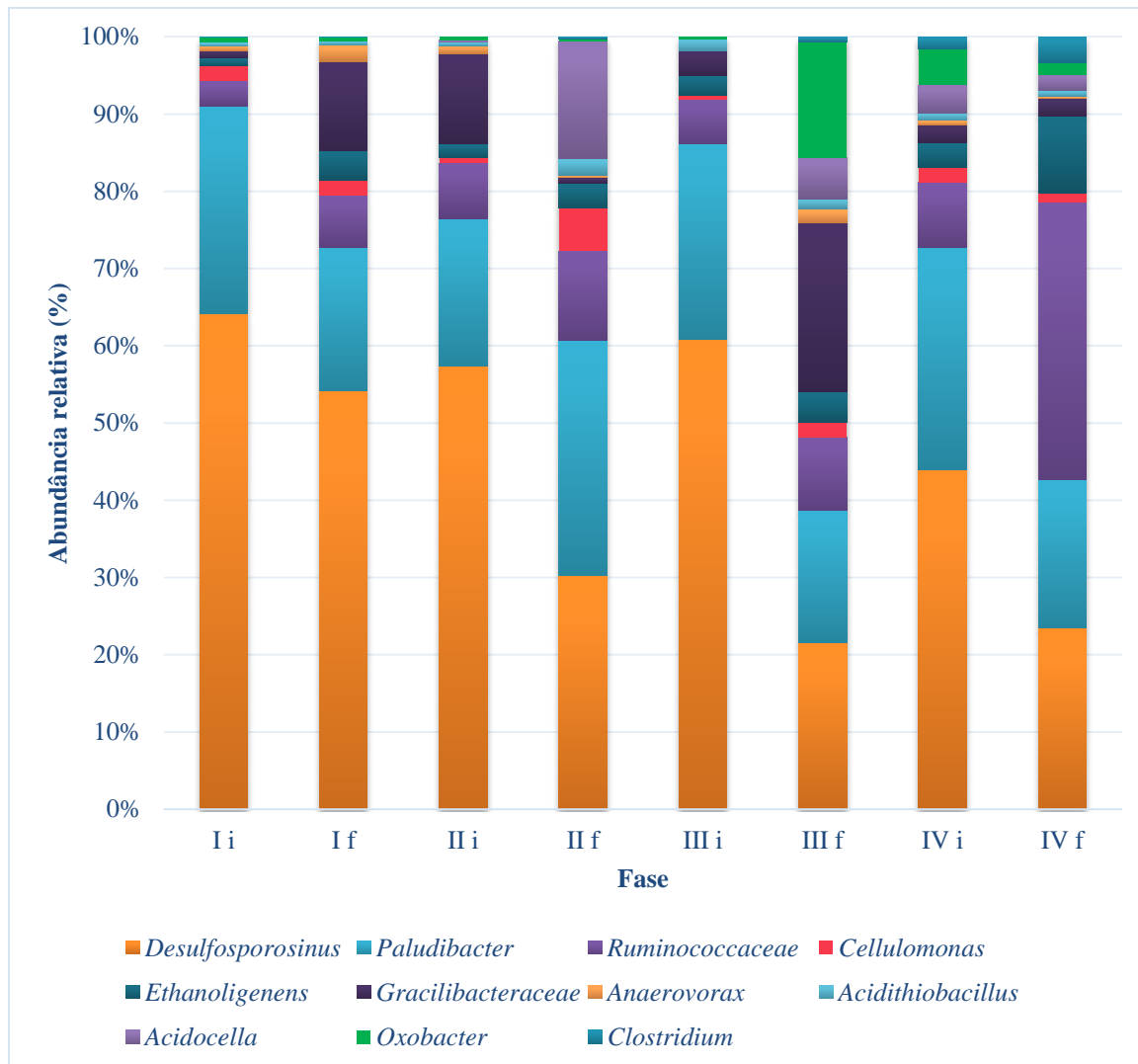


Figura 7. 12- Abundância relativa dos gêneros e famílias identificados na biomassa suspensa do reator considerando o início e final da Fase I, II, III e IV.

No início de cada fase houve a dominância do gênero *Desulfosporosinus*, representando mais de 44 % da abundância relativa. No entanto, com exceção da Fase I, bactérias não-redutoras de sulfato dominaram as amostras finais em cada fase (Figura 7. 12).

Tanto o glicerol quanto o etanol favoreceram a dominância das sulfato-redutoras do gênero *Desulfosporosinus* sobre as espécies fermentativas, representando a abundância relativa média de 50,8 e 59,8 %, respectivamente. Essa dominância pode estar relacionada à concentração de sulfato em excesso aplicada a essas fases (35mM). Quando imposta a redução da concentração de sulfato de 35 mM para aproximadamente 11 mM, passou-se a dominar o gênero *Paludibacter* somado a outras bactérias fermentativas.

A abundância relativa de *Desulfosporosinus* da amostra que representa a Fase I final com apenas 649 *reads* deve-se a problemas operacionais do reator, que antes do ocorrido representavam 5379 *reads* (Tabela 7.8, amostra S7), ou seja, 52 % da abundância relativa total.

No início da Fase II, o gênero *Desulfosporosinus* representava 57,3 % e ao final eram apenas 30,3 %. Embora com menor número de *reads*, na Fase III a abundância relativa de BRS era de 60,8 %, mas ao final apenas 21,6 % representavam o gênero. Após acúmulo de acetato no início da Fase III e diminuição significativa de BRS (Tabela 7.10, amostras S1 a S4), a recuperação das sulfetogênicas só foi possível após o aumento da concentração de sulfato.

Na Fase IV, com o retorno da adição dos açúcares sacarose, frutose e glicose, embora o gênero *Desulfosporosinus* estivesse em maior abundância (44 %), as fermentativas ainda representavam mais de 50 % da população microbiana e ao final da operação, BRS representavam apenas 23,4 %.

#### 7.4 Conclusões

O glicerol como fonte de carbono ocasionou maior estabilidade microbiana com maior abundância de BRS, entretanto, maiores velocidades de redução do sulfato foram atingidas quando o etanol foi a única fonte de carbono.

A adição da sacarose influenciou negativamente na população microbiana mostrando-se como fonte de carbono não promissora para a sulfetogênese. A diminuição da concentração de sulfato de 35 mM para 11 mM favoreceu a população de bactérias fermentativas.

O desequilíbrio da população de BRS completas e incompletas e a presença de bactérias fermentativas provocou o acúmulo de acetato e dessa forma comprometeu o sistema.

Os gêneros *Desulfosporosinus* e *Paludibacter* foram os mais abundantes ao longo da operação. Foi verificada a redução sistemática da abundância relativa da população de sulfato-redutoras e o aumento de bactérias fermentativas com a adição do etanol e sacarose.

## 8. Considerações finais

A configuração do reator DFSBR para o tratamento anaeróbio de DAM em pH moderadamente ácido apresentou bons resultados de remoção de DQO (Tabela 8.1) e Sulfato (Tabela 8.2). A vinhaça e o glicerol possibilitaram o processo sulfetogênico e a neutralização do pH proporcionado pela redução de sulfato foi verificada no efluente tratado.

Tabela 8.1- Remoção de DQO média em cada Fase

Capítulo	I	II	III	IV	V	VI
3	42±10	42±10	65±8	60±9	63±3	56±9
4	58 ± 10	51 ± 6	63 ± 10	61 ± 15	67 ± 12	35 ± 18
5	62 ± 14	56 ± 6	34± 14	24 ± 21	-	-
6	60 ± 14	50 ± 26	71 ± 10	65 ± 22	-	-

Tabela 8.2- Remoção de Sulfato média em cada Fase

Capítulo	I	II	III	IV	V	VI
3	75±9	76±7	91±6	83±15	55±9	63±10
4	80 ± 8	75 ± 6	90 ± 4	99 ± 1	82 ± 11	34 ± 23
5	54 ± 22	67 ± 22	46 ± 20	13 ± 4	-	-
6	46 ± 12	37 ± 20	44 ± 13	34 ± 11	-	-

A parte inferior cônica do reator DFSBR possibilitou a remoção e separação dos metais em solução em um único estágio. Com exceção do Mn, que precipita em condições de pH elevada, os outros metais analisados foram eficientemente removidos no Capítulo 3. Os metais presentes na DAM real, incluindo os ETR foram também removidos devido ao aumento de pH proporcionado pelo processo sulfetogênico.

A utilização da vinhaça como doador de elétrons e fonte de nutrientes respondeu melhor para o tratamento da DAM sintética e, no geral, a eficiência de remoção de DQO foi mais constante ao longo do período operacional. No entanto, o tratamento da DAM real utilizando o glicerol como doador de elétrons foi mais eficiente para a remoção dos metais La, Ce, Nd, Pr, Y e U que foram removidos com eficiência superior a 90%.

A análise da comunidade microbiana em cada uma das operações do DFSBR possibilitou identificar os principais gêneros presentes. Os gêneros *Desulfovibrio* e

*Paludibacter* estiveram em abundância relativa elevada nos 4 trabalhos apresentados, embora em porcentagens diferentes (Tabela 8.3). No entanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre os trabalhos a partir da análise microbiana. A água residuária e o substrato utilizado não definiram comunidades semelhantes.

Tabela 8.3- Comunidade microbiana dos trabalhos apresentados com os principais gêneros identificados.

Capítulo	Gêneros mais abundante
3	<i>Parabacteroides, Sulfurovum, Bacteroides, Geobacter, Clostridium, Paludibacter, Pseudomonas e Desulfovibrio</i>
4	<i>Zymophilus, Pectinatus, Clostridium, Bacteroides, Desulfovibrio, Geotoga, Acidaminococcus e Paludibacter</i>
5	<i>Paludibacter, Clostridium, Treponema, Bacteroides, Acetivibrio, Parabacteroides e Desulfovibrio</i>
6	<i>Treponema, Paludibacter, Thermodesulfobium, Desulfovibrio, Pectinatus, Desulfobacterium, Caldisericum e Zymophilus</i>
7	<i>Desulfosporosinus, Paludibacter, Cellulomonas, Ethanoligenens, e gêneros das famílias Ruminococcaceae e Gracilibacteraceae.</i>

Os gêneros mais abundantes no Capítulo 3 e 5, onde utilizaram a vinhaça como doador de elétrons, não resultaram em comunidade microbiana final semelhantes, assim como não se pôde observar relação entre as águas residuárias tratadas, seja com a DAM sintética ou com a DAM real. Foi possível observar que embora o mesmo tipo de lodo tenha sido utilizado para inocular os reatores no início da operação das pesquisas apresentadas nos Capítulos 5 e 6, a comunidade microbiana final foi diferente, com proporções de bactérias fermentativas e BRS diferentes, sendo as últimas em maior abundância ao final da operação do DFSBR na pesquisa do Capítulo 6. A maior abundância de BRS no sistema refletiu em maior redução de sulfato nessa fase.

No Capítulo 7 foi possível verificar que o substrato utilizado como doador de elétrons teve influência direta na comunidade microbiana, sendo o glicerol e o etanol os doadores de elétrons que contribuíram para o predomínio de BRS no sistema. A sacarose se mostrou ineficiente para a sulfetogênese, favorecendo as bactérias fermentativas e o maior acúmulo de ácido acético no sistema.

## 9. Recomendações para trabalhos futuros

Algumas limitações foram identificadas e algumas recomendações são propostas para trabalhos futuros:

- I. Para o tratamento da DAM em pH moderadamente ácido, recomenda-se a utilização de biomassa com adaptação prévia ao pH desejado e seleção de BRS para adequado tratamento da DAM.
- II. Em caso de DAM sintética, a adição de metais deverá ocorrer de forma gradual de modo a não provocar inibição para os microrganismos.
- III. A adição gradual da DAM real em substituição à sintética foi importante para o bom desempenho do sistema. E o aumento do TDH pode ser uma estratégia para quando o sistema demonstrar sinais de colapso.
- IV. Quando o glicerol for o único doador de elétrons, a adição de solução de nutrientes se faz necessária.
- V. Para o melhor entendimento da comunidade microbiana envolvida no tratamento, amostras da biomassa aderida e suspensa poderiam ser avaliadas separadamente.



## REFERÊNCIAS

- Abdelnour, S.A., Abd El-Hack, M.E., Khafaga, A.F., Noreldin, A.E., Arif, M., Chaudhry, M.T., Losacco, C., Abdeen, A., Abdel-Daim, M.M., 2019. Impacts of rare earth elements on animal health and production: Highlights of cerium and lanthanum. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.270>
- Adorno, M., Hirasawa, J., Varesche, M., 2014. Development and validation of two methods to quantify volatile acids. *Am. J. Anal. Chem.* 5, 406–414. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049>
- Afonso, L. C. Biolixiviação de cobre a partir de rejeito de processo de flotação de calcopirita empregando consórcio de microrganismos. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.3.2018.tde-15012018-153426. Acesso em: 2019-10-18.
- Ahmed, M., Lin, O., Saup, C.M., Wilkins, M.J., Lin, L.S., 2019. Effects of Fe/S ratio on the kinetics and microbial ecology of an Fe(III)-dosed anaerobic wastewater treatment system. *J. Hazard. Mater.* 369, 593–600. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.062>
- Akcil, A., Koldas, S., 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.006>
- Alazard, D., Joseph, M., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J.L., Ollivier, B., 2010. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. *Extremophiles* 14, 305–312. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0309-4>
- Álvarez, M.; Córdoba, S.; Escobar, F.; Fagua, G; Gast, F.; Mendoza, H.; Ospina, M.; Umaña, A. M.; Villareal, H, 2006. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. 2. ed. Bogotá D.C.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.
- Alvarez, M.T., Crespo, C., Mattiasson, B., 2007. Precipitation of Zn ( II ), Cu ( II ) and Pb ( II ) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids 66, 1677–1683. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.065>
- Alves, I, 2018. Estudo da manta de lodo e do efeito das taxas de recirculação e das cargas orgânicas em reatores UASB para produção de metano no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP)
- Amato, A., Becci, A., Birloaga, I., De Michelis, I., Ferella, F., Innocenzi, V., Ippolito, N.M., Pillar Jimenez Gomez, C., Vegliò, F., Beolchini, F., 2019. Sustainability analysis of innovative technologies for the rare earth elements recovery. *Renew. Sustain. Energy Rev.*

106, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.029>

AMB, 2019. Anuário Mineral Brasileiro.

ANM, 2019. Classificação das barragens de mineração brasileiras - Data base Fev/2019. Agência Nac. Mineração - Supt. produção Miner. Gerência segurança barragens mineração 1–7.

ANM, 2019. Extração SIGBM para classificação - atualizada em 23.01.2019.pdf. Disponível em: <<http://www.anm.gov.br/assuntos/barragens/arquivos-barragens/extracao-sigbm-para-classificacao-atualizada-em-23-01.2019/view>> Acesso 01 nov. 2019.

ANP, 2019. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2019 Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5237-anuario-estatistico-2019>> Acesso 01 nov. 2019.

APHA, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. Am. Public Heal. Assoc. Washington, DC.

Armstrong, M., Langrené, N., Petter, R., Chen, W., Petter, C., 2019. Accounting for tailings dam failures in the valuation of mining projects. *Resour. Policy* 63, 101461. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2019.101461>

Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR 10004. Resíduos sólidos – Coletânea de Normas 2, 2004. Rio de Janeiro.

Ayora, C., Macías, F., Torres, E., Lozano, A., Carrero, S., Nieto, J.M., Pérez-López, R., Fernández-Martínez, A., Castillo-Michel, H., 2016. Recovery of Rare Earth Elements and Yttrium from Passive-Remediation Systems of Acid Mine Drainage. *Environ. Sci. Technol.* 50, 8255–8262. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02084>

Bai, H., Kang, Y., Quan, H., Han, Y., Sun, J., Feng, Y., 2013. Treatment of acid mine drainage by sulfate reducing bacteria with iron in bench scale runs. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.070>

Barbosa, L.P., Costa, P.F., Bertolino, S.M., Silva, J.C.C., Guerra-Sá, R., Leão, V.A., Teixeira, M.C., 2014. Nickel, manganese and copper removal by a mixed consortium of sulfate reducing bacteria at a high COD/sulfate ratio. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1592-x>

Bekmezci, O.K., Ucar, D., Kaksonen, A.H., Sahinkaya, E., 2011. Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.087>

Benedetto, S., Almeida, S.K., Ladeira, A.C.Q., Gomes, R.F.V.H.A., 2005. Diagnostico do efluente acidogerado na mina de úranio para subsidiar estudos de remediação biológica,

- in: ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E METALURGIA EXTRATIVA. Natal, pp. 64–68.
- Bertolino, S.M., Melgaço, L.A., Sá, R.G., Leão, V.A., 2014. Comparing lactate and glycerol as a single-electron donor for sulfate reduction in fluidized bed reactors. *Biodegradation*. <https://doi.org/10.1007/s10532-014-9694-1>
- Binnemans, K., Jones, P.T., Blanpain, B., Van Gerven, T., Yang, Y., Walton, A., Buchert, M., 2013. Recycling of rare earths: A critical review. *J. Clean. Prod.* 51, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.12.037>
- Bratkova, S., Koumanova, B., Beschkov, V., 2013. Biological treatment of mining wastewaters by fixed-bed bioreactors at high organic loading. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.177>
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3752-3759.1994>
- Cao, J., Zhang, G., Mao, Z.S., Li, Y., Fang, Z., Yang, C., 2012. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. *Int. J. Miner. Process.* <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2012.02.005>
- Cao, X., Zhou, S., Xie, F., Rong, R., Wu, P., 2019. The distribution of rare earth elements and sources in Maoshitou reservoir affected by acid mine drainage, Southwest China. *J. Geochemical Explor.* 202, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.03.019>
- Caraballo, M.A., Wanty, R.B., Verplanck, P.L., Navarro-Valdivia, L., Ayora, C., Hochella, M.F., 2019. Aluminum mobility in mildly acidic mine drainage: Interactions between hydrobasaluminite, silica and trace metals from the nano to the meso-scale. *Chem. Geol.* 519, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.04.013>
- Castro, H.F., Williams, N.H., Ogram, A., 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 1–9.
- Cato, E.P., Kelley, R.W., Moore, W.E.C., Holdeman, L. V., 1982. *Bacteroides zoogloformans* (Weinberg, Nativelle, and Prevot 1937) corrig., comb. nov.: Emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 271–274. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-3-271>
- Celis-García, M.L.B., Ramírez, F., Revah, S., Razo-Flores, E., Monroy, O., 2004. Sulphide and oxygen inhibition over the anaerobic digestion of organic matter: Influence of microbial immobilization type. *Environ. Technol.* 25, 1265–1275. <https://doi.org/10.1080/09593332508618367>

- CGU – CONTROLADORIA GERAL DA UNIÃO. Portal da Transparência. Disponível em: < <http://www.portaltransparencia.gov.br> >, Acesso em: outubro de 2019.
- Chen, L. xing, Li, J. tian, Chen, Y. ting, Huang, L. nan, Hua, Z. shuang, Hu, M., Shu, W. sheng, 2013. Shifts in microbial community composition and function in the acidification of a lead/zinc mine tailings. *Environ. Microbiol.* 15, 2431–2444. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12114>
- Chen, M., Lu, G., Guo, C., Yang, C., Wu, J., Huang, W., Yee, N., Dang, Z., 2015. Sulfate migration in a river affected by acid mine drainage from the Dabaoshan mining area, South China. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.094>
- Chen, T., Yan, B., Lei, C., Xiao, X., 2014. Pollution control and metal resource recovery for acid mine drainage. *Hydrometallurgy.* <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.04.024>
- Colipai, C., Southam, G., Oyarzún, P., González, D., Díaz, V., Contreras, B., Nancucheo, I., 2018. Synthesis of copper sulfide nanoparticles using biogenic H<sub>2</sub>S produced by a low-pH sulfidogenic bioreactor. *Minerals* 8. <https://doi.org/10.3390/min8020035>
- Cook, G.M., Rainey, F.A., Chen, G., Stackebfulndt, E., Russell, J.B., 1994. *Acidaminococcus fermentans*, 576–578.
- Coral, T., Descostes, M., De Boissezon, H., Bernier-Latmani, R., de Alencastro, L.F., Rossi, P., 2018. Microbial communities associated with uranium in-situ recovery mining process are related to acid mine drainage assemblages. *Sci. Total Environ.* 628–629, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.321>
- Costa, M.C., Santos, E.S., Barros, R.J., Pires, C., Martins, M., 2009. Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.062>
- Crane, R.A., Sapsford, D.J., 2018. Selective formation of copper nanoparticles from acid mine drainage using nanoscale zerovalent iron particles. *J. Hazard. Mater.* 347, 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.014>
- Cravotta, C.A., 2008. Dissolved metals and associated constituents in abandoned coal-mine discharges, Pennsylvania, USA. Part 1: Constituent quantities and correlations. *Appl. Geochemistry* 23, 166–202. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.10.011>
- Cui, M., Jang, M., Cho, S.H., Khim, J., Cannon, F.S., 2012. A continuous pilot-scale system using coal-mine drainage sludge to treat acid mine drainage contaminated with high concentrations of Pb, Zn, and other heavy metals. *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.042>
- Cunha, M.P., Ferraz, R.M., Sancinetti, G.P., Rodriguez, R.P., 2019. Long-term performance of

- a UASB reactor treating acid mine drainage: effects of sulfate loading rate, hydraulic retention time, and COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio. *Biodegradation* 30, 47–58. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9863-8>
- Cunha, M.P., Fuess, L.T., Rodriguez, R.P., Lens, P.N.L., Zaiat, M., 2020. Sulfidogenesis establishment under increasing metal and nutrient concentrations: An effective approach for biotreating sulfate-rich wastewaters using an innovative structured-bed reactor (AnSTBR). *Bioresour. Technol. Reports* 11, 100458. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100458>
- Cunha, R.C.D.A., Costa, A.C.S., Filho, B.M., Casarini, D.C.P., 1987. EFFECTS OF IRRIGATION WITH VINASSE AND THE DYNAMICS OF ITS CONSTITUENTS IN THE SOIL : I - PHYSICAL AND CHEMICAL ASPECTS 19, 155–165.
- Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2007. Anaerobic Degradation of Synthetic Wastewaters at Different Levels of Sulfate and COD / Sulfate Ratios in Horizontal-Flow. *Environ. Eng. Sci.* 24. <https://doi.org/10.1089/ees.2006.0067>
- Das, B.K., Mandal, S.M., Bhattachasrya, J., 2012. Understanding of the biochemical events in a chemo-bioreactor during continuous acid mine drainage treatment. *Environ. Earth Sci.* 66, 607–614. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1268-5>
- Davey, M.E., Wood, W.A., Key, R., Nakamura, K., Stahl, D.A., 1993. Isolation of Three Species of Geotoga and Petrotoga: Two New Genera, Representing a New Lineage in the Bacterial Line of Descent Distantly Related to the “Thermotogales.” *Syst. Appl. Microbiol.* 16, 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80467-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80467-4)
- Deng, D., Lin, L.-S., 2013a. Two-Stage combined treatment of acid mine drainage and municipal wastewater. ©iWA Pubiishing2013 *Water Sci. Technol.* 675. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.653>
- Deng, D., Lin, L.-S., 2013b. Two-Stage combined treatment of acid mine drainage and municipal wastewater. *Water Sci. Technol.* 675, 1000–1007. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.653>
- Deng, D., Lin, L.S., 2017. Continuous sulfidogenic wastewater treatment with iron sulfide sludge oxidation and recycle. *Water Res.* 114, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.048>
- Deng, D., Weidhaas, J.L., Lin, L.S., 2016. Kinetics and microbial ecology of batch sulfidogenic bioreactors for co-treatment of municipal wastewater and acid mine drainage. *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.041>
- Dev, S., Kumar, A., Mukherjee, A., Bhattacharya, J., 2015. Suitability of different growth

- substrates as source of nitrogen for sulfate reducing bacteria. *Biodegradation* 26, 415–430. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9745-2>
- Dias, S.C., 2004. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. *Acta Sci. Biol. Sci.* 26, 373–379. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v26i4.1511>
- Dilallo, R. and Albertison, O.E., 1961. Volatile Acids by Direct Titration. *J. Water Pollut. Control Fed.* 33, 356–365.
- Dobslaw, D., Woiski, C., Winkler, F., Engesser, K., Dobslaw, C., 2018. Prevention of clogging in a polyurethane foam packed biotrickling filter treating emissions of 2-butoxyethanol. *J. Clean. Prod.* 200, 609–621. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.248>
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., Bond, P.L., 2003. Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26296-0>
- Driessen, W.J.B.M., Tielbaard, M.H., Vereijken, T.L.F.M., 1994. Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process. *Water Sci. Technol.* <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0609>
- Edahbi, M., Plante, B., Benzaazoua, M., 2019. Environmental challenges and identification of the knowledge gaps associated with REE mine wastes management. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.228>
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M., Banfield, J.F., 2000. An Archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* (80-. ). 287, 1796–1799. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1796>
- España, J.S., 2007. The behavior of iron and aluminum in acid mine drainage. Speciation, mineralogy, and environmental significance, Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-044452707-3/50009-4>
- Falagán, C., Grail, B.M., Johnson, D.B., 2017a. New approaches for extracting and recovering metals from mine tailings. *Miner. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.10.008>
- Falagán, C., Yusta, I., Sánchez-España, J., Johnson, D.B., 2017b. Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. *Miner. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.09.028>
- Favot, M., Massarutto, A., 2019. Rare-earth elements in the circular economy: The case of yttrium. *J. Environ. Manage.* 240, 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.002>
- Fernández-Cadena, J.C., Ruíz-Fernández, P.S., Fernández-Ronquillo, T.E., Díez, B., Trefault,

- N., Andrade, S., De la Iglesia, R., 2020. Detection of sentinel bacteria in mangrove sediments contaminated with heavy metals. *Mar. Pollut. Bull.* 150, 110701. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110701>
- Frolov, E.N., Kublanov, I. V., Toshchakov, S. V., Samarov, N.I., Novikov, A.A., Lebedinsky, A. V., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Chernyh, N.A., 2017. *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., a thermoacidophilic, sulfate-reducing, chemoautotrophic bacterium from a thermal site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1482–1485. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001745>
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Fuess, L.T., Sayuri, L., Kiyuna, M., Loureiro, M., Zaiat, M., 2016. ScienceDirect Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 8132–8145. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.143>
- Fuess, L.T., Zaiat, M., do Nascimento, C.A.O., 2019. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. *Bioresour. Technol.* 286, 121379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121379>
- Gallegos-Garcia, M., Celis, L.B., Rangel-Méndez, R., Razo-Flores, E., 2009. Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 91–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.22049>
- Giordani, A., Hayashi, E.A., Rodriguez, R.P., Damasceno, L.H.S., Azevedo, H., Brucha, G., 2019. Potential of autochthonous sulfate-reducing microbial communities for treating acid mine drainage in a bench-scale sulfidogenic reactor. *Brazilian J. Chem. Eng.* 36, 733–751. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20170662>
- Godoi, L.A.G., 2018. Down-flow fixed-structured bed anaerobic reactor potencial for acid mine drainage treatment in co-digestion with vinasse. [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-19032019-162327/publico/TESE\\_CORRIGIDA\\_LEANDRO\\_GODOI.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-19032019-162327/publico/TESE_CORRIGIDA_LEANDRO_GODOI.pdf)LEANDRO\_GODOI.pdf
- Godoi, L.A.G., Camiloti, P.R., Bernardes, A.N., Sanchez, B.L.S., Torres, A.P.R., da Conceição Gomes, A., Botta, L.S., 2019. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. *Environ. Sci. Pollut.*

- Res. 26, 29267–29282. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>
- Godoi, L.A.G., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2015. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. *Water Sci. Technol.* <https://doi.org/10.2166/wst.2015.383>
- Godoi, L.A.G., Diniz, C.E., Foresti, E., Damianovic, M.H.R.Z., 2017a. Evaluating and Refining Alkalinity Calculations Due to Sulfide and Bicarbonate Accessed by Titration in Anaerobic Sulfate-Reducing Bioreactors. *Water. Air. Soil Pollut.* 228, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3518-y>
- Godoi, L.A.G., Foresti, E., Damianovic, M.H.R.Z., 2017b. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. *J. Environ. Manage.* 197, 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.027>
- Gonçalves, M.M.M., da Costa, A.C.A., Leite, S.G.F., Sant’Anna Jr, G.L., 2007. Heavy metal removal from synthetic wastewaters in an anaerobic bioreactor using stillage from ethanol distilleries as a carbon source. *Chemosphere* 69, 1815–1820. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.074>
- Gonzalez-Silva, B.M., Briones-Gallardo, R., Razo-Flores, E., Celis, L.B., 2009. Inhibition of sulfate reduction by iron, cadmium and sulfide in granular sludge. *J. Hazard. Mater.* 172, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.022>
- González, D., Liu, Y., Villa Gomez, D., Southam, G., Hedrich, S., Galleguillos, P., Colipai, C., Nancucheo, I., 2019. Performance of a sulfidogenic bioreactor inoculated with indigenous acidic communities for treating an extremely acidic mine water. *Miner. Eng.* 131, 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.11.011>
- Guo, J., Wang, J., Qiu, Y., Sun, J., Jiang, F., 2019. Realizing a high-rate sulfidogenic reactor driven by sulfur-reducing bacteria with organic substrate dosage minimization and cost-effectiveness maximization. *Chemosphere* 236, 124381. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124381>
- Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2001. Biodiversity of Acidophilic Prokaryotes. *Adv. Appl. Microbiol.* 49, 37–84. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(01\)49009-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(01)49009-5)
- Hammack, R.W., Edenborn, H.M., Dvorak, D.H., 1994. Treatment of water from an open-pit copper mine using biogenic sulfide and limestone: A feasibility study. *Water Res.* 28, 2321–2329. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90047-7)
- Hansen, T.A., 1994. Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 165–185. <https://doi.org/10.1007/BF00871638>



- Hao, C., Wei, P., Pei, L., Du, Z., Zhang, Y., Lu, Y., Dong, H., 2017. Significant seasonal variations of microbial community in an acid mine drainage lake in Anhui Province, China. *Environ. Pollut.* 223, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.052>
- Hao, T. wei, Xiang, P. yu, Mackey, H.R., Chi, K., Lu, H., Chui, H. kwong, van Loosdrecht, M.C.M., Chen, G.H., 2014. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.043>
- Harper, K., Oliveira, A.P. De, 2006. DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO EM SOLOS E LODOS DE ESGOTO POR ICP-OES.
- Hatje, V., Pedreira, R.M.A., De Rezende, C.E., Schettini, C.A.F., De Souza, G.C., Marin, D.C., Hackspacher, P.C., 2017. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>
- Hedrich, S., Johnson, D.B., 2014. Remediation and selective recovery of metals from acidic mine waters using novel modular bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es5030367>
- Hessler, T., Harrison, S.T.L., Huddy, R.J., 2018. Stratification of microbial communities throughout a biological sulphate reducing up-flow anaerobic packed bed reactor, revealed through 16S metagenomics. *Res. Microbiol.* 169, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.09.003>
- Hiibel, S.R., Pereyra, L.P., Breazeal, M.V.R., Reisman, D.J., Reardon, K.F., Pruden, A., 2011. Effect of organic substrate on the microbial community structure in pilot-scale sulfate-reducing biochemical reactors treating mine drainage. *Environ. Eng. Sci.* 28, 563–572. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0237>
- Holanda, R., Johnson, D.B., 2020. Research in Microbiology Isolation and characterization of a novel acidophilic zero-valent sulfur- and ferric iron-respiring Firmicute. *Res. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.07.003>
- Holmer, M., Hasler-sheetal, H., 2014. Sulfide intrusion in seagrasses assessed by stable sulfur isotopes — a synthesis of current results. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00064>
- Hou, D., Zhang, P., Zhang, J., Zhou, Y., Yang, Y., Mao, Q., Tsang, D.C.W., Núñez-Delgado, A., Luo, L., 2019. Spatial variation of sediment bacterial community in an acid mine drainage contaminated area and surrounding river basin. *J. Environ. Manage.* 251, 109542. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109542>
- Hu, Y., Jing, Z., Sudo, Y., Niu, Q., Du, J., Wu, J., Li, Y.Y., 2015. Effect of influent COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.019>

- Huang, H., Biswal, B.K., Chen, G.H., Wu, D., 2020. Sulfidogenic anaerobic digestion of sulfate-laden waste activated sludge: Evaluation on reactor performance and dynamics of microbial community. *Bioresour. Technol.* 297. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122396>
- Huang, L.N., Zhou, W.H., Hallberg, K.B., Wan, C.Y., Li, J., Shu, W.S., 2011. Spatial and temporal analysis of the microbial community in the tailings of a Pb-Zn mine generating acidic drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5540–5544. <https://doi.org/10.1128/AEM.02458-10>
- Hurst, C., 2010. China's Rare Earth Elements Industry: What can the west learn? 42.
- Ikkert, O.P., Gerasimchuk, A.L., Bukhtiyarova, P.A., Tuovinen, O.H., Karnachuk, O. V., 2013. Characterization of precipitates formed by H<sub>2</sub>S-producing, Cu-resistant firmicute isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 103, 1221–1234. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9900-x>
- Ilhan-Sungur, E., Ozuolmez, D., Çotuk, A., Cansever, N., Muyzer, G., 2017. Isolation of a sulfide-producing bacterial consortium from cooling-tower water: Evaluation of corrosive effects on galvanized steel. *Anaerobe* 43, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.005>
- Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., Horikoshi, K., 2004. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the E-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1477–1482. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03042-0>
- Isosaari, P., Sillanpää, M., 2017. Use of Sulfate-Reducing and Bioelectrochemical Reactors for Metal Recovery from Mine Water. *Sep. Purif. Rev.* 46, 1–20. <https://doi.org/10.1080/15422119.2016.1156548>
- Jeong, T.Y., Chung, H.K., Yeom, S.H., Choi, S.S., 2009. Analysis of methane production inhibition for treatment of sewage sludge containing sulfate using an anaerobic continuous degradation process. *Korean J. Chem. Eng.* 26, 1319–1322. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0229-0>
- Jiménez-Rodríguez, A.M., Durán-Barrantes, M.M., Borja, R., Sánchez, E., Colmenarejo, M.F., Raposo, F., 2009. Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen sulphide and effluent from anaerobic treatment: Effect of pH. *J. Hazard. Mater.* 165, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.053>
- Jing, Z., Hu, Y., Niu, Q., Liu, Y., Li, Y.Y., Wang, X.C., 2013. UASB performance and electron

- competition between methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in treating sulfate-rich wastewater containing ethanol and acetate. *Bioresour. Technol.* 137, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.137>
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: A review. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.002>
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00114-1)
- Johnson, D.B., Sánchez-Andrea, I., 2019. Dissimilatory reduction of sulfate and zero-valent sulfur at low pH and its significance for bioremediation and metal recovery. *Adv. Microb. Physiol.* 75, 205–231. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.07.002>
- Juvonen, R., Suihko, M.L., 2006. *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 695–702. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63699-0>
- Kadnikov, V. V., Gruzdev, E. V., Ivashenko, D.A., Beletsky, A. V., Mardanov, A. V., Danilova, E. V., Karnachuk, O. V., Ravin, N. V., 2019. Selection of a Microbial Community in the Course of Formation of Acid Mine Drainage. *Microbiol. (Russian Fed.)* 88, 292–299. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030056>
- Kadnikov, V. V., Ivashenko, D.A., Beletsky, A. V., Mardanov, A. V., Danilova, E. V., Pimenov, N. V., Karnachuk, O. V., Ravin, N. V., 2016. Effect of metal concentration on the microbial community in acid mine drainage of a polysulfide ore deposit. *Microbiol. (Russian Fed.)* 85, 745–751. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060126>
- Karnachuk, O. V., Kurganskaya, I.A., Avakyan, M.R., Frank, Y.A., Ikkert, O.P., Filenko, R.A., Danilov, E. V., Pimenov, N. V., 2015. An Acidophilic Desulfosporosinus Isolated from the Oxidized Mining Wastes in the Transbaikal Area. *Mikrobiologiya* 84, 595–605. <https://doi.org/10.1134/S0026261715050112>
- Kefeni, K.K., Msagati, T.A.M., Mamba, B.B., 2017. Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.082>
- Kefeni, K.K., Msagati, T.M., Maree, J.P., Mamba, B.B., 2015. Metals and sulphate removal from acid mine drainage in two steps via ferrite sludge and barium sulphate formation. *Miner. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2015.07.016>
- Kim, J., Koo, S.Y., Kim, J.Y., Lee, E.H., Lee, S.D., Ko, K.S., Ko, D.C., Cho, K.S., 2009. Influence of acid mine drainage on microbial communities in stream and groundwater

- samples at guryong mine, South Korea. *Environ. Geol.* 58, 1567–1574. <https://doi.org/10.1007/s00254-008-1663-8>
- Kimura, S., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2006. Sulfidogenesis in low pH (3.8–4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation* 17, 159–167. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-3050-4>
- Korzhenkov, A.A., Toshchakov, S. V., Bargiela, R., Gibbard, H., Ferrer, M., Teplyuk, A. V., Jones, D.L., Kublanov, I. V., Golyshin, P.N., Golyshina, O. V., 2019. Archaea dominate the microbial community in an ecosystem with low-to-moderate temperature and extreme acidity. *Microbiome* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0623-8>
- Koschorreck, M., 2008. Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 329–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00482.x>
- Lefticariu, L., Klitzing, K.L., Kolker, A., 2020. Rare Earth Elements and Yttrium (REY) in coal mine drainage from the Illinois Basin, USA. *Int. J. Coal Geol.* 217, 103327. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2019.103327>
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, & G., 1998. Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 28, 41–88. <https://doi.org/10.1080/10643389891254160>
- Lewis, A.E., 2010. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.06.010>
- Liamleam, W., Annachhatre, A.P., 2007. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.002>
- Liang, F., Xiao, Y., Zhao, F., 2013. Effect of pH on sulfate removal from wastewater using a bioelectrochemical system. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.021>
- Linnen, R. L.; Samson, I. M.; Williams-Jones, A. E.; Chakhmouradian, A. R., 2014. 13.21 - geochemistry of the rare-earth element, Nb, Ta, Hf, and Zr deposits. In: Holland, H.D.; Turekian, K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*, second ed. Elsevier, Oxford, p. 543–568, 2014.
- Lopes, S.I.C., Capela, M.I., Lens, P.N.L., 2010. Sulfate reduction during the acidification of sucrose at pH 5 under thermophilic (55 °C) conditions. II: Effect of sulfide and COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio. *Bioresour. Technol.* 101, 4278–4284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.010>
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Goodwin, S., 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron

- and other metals. *Arch. Microbiol.* 159, 336–344. <https://doi.org/10.1007/BF00290916>
- Lu, X., Zhen, G., Estrada, A.L., Chen, M., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y.Y., 2015. Operation performance and granule characterization of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating wastewater with starch as the sole carbon source. *Bioresour. Technol.* 180, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.010>
- Lu, X., Zhen, G., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y.Y., 2016. Effect of influent COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios on biodegradation behaviors of starch wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresour. Technol.* 214, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.100>
- Maillacheruvu, K.Y., Parkin, G.F., Peng, C.Y., Oonge, Z.I., Lebduschka, V., Maillacheruvu, K.Y., Parkin, G.F., Peng, C.Y., Kuo, W., Oonge, Z.I., Lebduschka, V., 1993. Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics. *Water Environ. Res.* 65, 100–109.
- Mäkinen, J., Bomberg, M., Salo, M., Arnold, M., Koukkari, P., 2017. Rare earth elements recovery and sulphate removal from phosphogypsum waste waters with sulphate reducing bacteria. *Solid State Phenom.* 262, 573–576. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.573>
- MAPA, 2020. Produção Brasileira de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol. Disponível em:< [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-producao/001PRODUOBRASILEIRADECANADEACARACAREETANOL\\_02102019.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-producao/001PRODUOBRASILEIRADECANADEACARACAREETANOL_02102019.pdf)> Acesso: 9 jan. 2021.
- Méndez-García, C., Peláez, A.I., Mesa, V., Sánchez, J., Golyshina, O. V., Ferrer, M., 2015. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front. Microbiol.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00475>
- Miekeley, N., Coutinho de Jesus, H., Porto da Silveira, C.L., Degueldre, C., 1992. Chemical and physical characterization of suspended particles and colloids in waters from the Osamu Utsumi mine and Morro do Ferro analogue study sites, Poços de Caldas, Brazil. *J. Geochemical Explor.* 45, 409–437. [https://doi.org/10.1016/0375-6742\(92\)90133-S](https://doi.org/10.1016/0375-6742(92)90133-S)
- Miskufova, A., Kochmanova, A., Havlik, T., Horvathova, H., Kuruc, P., 2018. Leaching of yttrium, europium and accompanying elements from phosphor coatings. *Hydrometallurgy* 176, 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.01.010>
- Mohan, D., Chander, S., 2001. Single component and multi-component adsorption of metal ions by activated carbons. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 177, 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00670-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00670-1)

- Monteiro, M.R., Kugelmeier, C.L., Pinheiro, R.S., Batalha, M.O., da Silva César, A., 2018. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 88, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>
- Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T., Hanada, S., 2003. 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* 7, 283–290. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0320-0>
- Mori, K., Yamaguchi, K., Sakiyama, Y., Urabe, T., Suzuki, K.I., 2009. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldisericaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. no. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2894–2898. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010033-0>
- Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Nadaleti, W.C., Lourenço, V.A., Filho, P.B., Santos, G.B. Dos, Przybyla, G., 2020. National potential production of methane and electrical energy from sugarcane vinasse in Brazil: A thermo-economic analysis. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 103422. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103422>
- Naidu, G., Ryu, S., Thiruvengkatachari, R., Choi, Y., Jeong, S., Vigneswaran, S., 2019. A critical review on remediation, reuse, and resource recovery from acid mine drainage. *Environ. Pollut.* 247, 1110–1124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.085>
- Ñancucheo, I; Johnson, D.B., 2014. Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy* 150, 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.04.025>
- Ñancucheo, I., Bitencourt, J.A.P., Sahoo, P.K., Alves, J.O., Siqueira, J.O., Oliveira, G., 2017. Recent Developments for Remediating Acidic Mine Waters Using Sulfidogenic Bacteria. *Biomed Res. Int.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7256582>
- Ñancucheo, I., Hedrich, S., Johnson, A.D.B., 2012. New microbiological strategies that enable the selective recovery and recycling of metals from acid mine drainage and mine process waters. *Mineral. Mag.* 76, 2683–2692. <https://doi.org/10.1180/minmag.2012.076.7.04>
- Ñancucheo, I., Johnson, D.B., 2012. Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00285.x>
- Ñancucheo, I., Rowe, O.F., Hedrich, S., Johnson, D.B., 2016. Solid and liquid media for

- isolating and cultivating acidophilic and acid-tolerant sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw083>
- Nankran, M.A., Bergerman, M., Miranda, A., Oliveira, J., Souza, M., Filho, J.B., Cardoso, W., 2007. Controle Operacional Da Usina Do Sossego 505–512.
- Nascimento, J.C., Cordeiro, H.C., Coral, N.F.A.F., Corrêa, J.A.M., Moreira, S.G.C., Rodrigues, E.M.S., 2014. Caracterização De Resíduos Sólidos Da Barragem De Rejeitos Da Mina Do Sossego (Canaã Dos Carajás-Pa). <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-0753-24161-189062>
- Niz, M.Y.K., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2019. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 22876–22887. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>
- Nordstrom, D.K., 2012. Models, validation, and applied geochemistry: Issues in science, communication, and philosophy. *Appl. Geochemistry* 27, 1899–1919. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.07.007>
- Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., Ptacek, C.J., Blowes, D.W., 2000. Negative pH and extremely acidic mine waters from Iron Mountain, California. *Environ. Sci. Technol.* 34, 254–258. <https://doi.org/10.1021/es990646v>
- O’Flaherty, V., Colleran, E., 1999. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: Process disturbance and remediation. *Bioresour. Technol.* 68, 101–107. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00145-X)
- Okabe, S., Nielsen, P.H., Jones, W.L., Characklis, W.G., 1995. Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res.* 29, 571–578. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00177-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00177-9)
- Oliveira, C.A., Fuess, L.T., Soares, L.A., Damianovic, M.H.R.Z., 2020. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. *Int. J. Hydrogen Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.013>
- Ozuolmez, D., Na, H., Lever, M.A., Kjeldsen, K.U., Jørgensen, B.B., Plugge, C.M., 2015. Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: Teamwork or coexistence? *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00492>
- Park, I., Tabelin, C.B., Jeon, S., Li, X., Seno, K., Ito, M., Hiroyoshi, N., 2019. A review of recent strategies for acid mine drainage prevention and mine tailings recycling. *Chemosphere* 219, 588–606. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.053>
- Parsaee, M., Kiani Deh Kiani, M., Karimi, K., 2019. A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy* 122, 117–125.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>

- Pérez, N., Schwarz, A.O., Barahona, E., Sanhueza, P., Diaz, I., Urrutia, H., 2018. Performance of two differently designed permeable reactive barriers with sulfate and zinc solutions. *Sci. Total Environ.* 642, 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.046>
- Pester, M., Brambilla, E., Alazard, D., Rattei, T., Weinmaier, T., Han, J., Lucas, S., Lapidus, A., Cheng, J.F., Goodwin, L., Pitluck, S., Peters, L., Ovchinnikova, G., Teshima, H., Detter, J.C., Han, C.S., Tapia, R., Land, M.L., Hauser, L., Kyrpides, N.C., Ivanova, N.N., Pagani, I., Huntmann, M., Wei, C.L., Davenport, K.W., Daligault, H., Chain, P.S.G., Chen, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Szeto, E., Mikhailova, N., Pati, A., Wagner, M., Woyke, T., Ollivier, B., Klenk, H.P., Spring, S., Loy, A., 2012. Complete genome sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704T. *J. Bacteriol.* 194, 6300–6301. <https://doi.org/10.1128/JB.01392-12>
- Poinapen, J., Ekama, G., Wentzel, M., 2009. Biological sulphate reduction with primary sewage sludge in an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor – Part 2: Modification of simple wet chemistry analytical procedures to achieve COD and S mass balances. (Print) = *Water SA* 35.
- Postgate, J.R., 1963. Versatile Medium for the Enumeration of Sulfate-Reducing Bacteria 265–267.
- Qian, Z., Tianwei, H., Mackey, H.R., van Loosdrecht, M.C.M., Guanghao, C., 2019. Recent advances in dissimilatory sulfate reduction: From metabolic study to application. *Water Res.* 150, 162–181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.018>
- Qin, W., Jewell, T.N.M., Russell, V. V., Hedlund, B.P., Torre, J.R., Stahl, D.A., 2017. *Candidatus Nitrosocaldus*. *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.* 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01287>
- Qiu, Y.L., Kuang, X.Z., Shi, X.S., Yuan, X.Z., Guo, R.B., 2014. *Paludibacter jiangxiensis* sp. nov., a strictly anaerobic, propionate-producing bacterium isolated from rice paddy field. *Arch. Microbiol.* 196, 149–155. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0951-1>
- Reis, M.A.M., Almeida, J.S., Lemos, P.C., Carrondo, M.J.T., 1992. Effect of Hydrogen Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria 40, 593–600.
- Reis, M.A.M., Lemos, P.C., Almeida, J.S., Carronda, M.J.T., 1990. INFLUENCE OF PRODUCED ACETIC ACID ON GROWTH OF SULFATE REDUCING BACTERIA Vol, *Biotechnology Letters*. *Biotechnol. Lett.* 12, 145–148.



- Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *J. Water Pollut. Control Fed.* 58, 406–411.
- Rodrigues, C., Núñez-Gómez, D., Follmann, H.V.D.M., Silveira, D.D., Nagel-Hassemer, M.E., Lapolli, F.R., Lobo-Recio, M.Á., 2020. Biostimulation of sulfate-reducing bacteria and metallic ions removal from coal mine-impacted water (MIW) using shrimp shell as treatment agent. *J. Hazard. Mater.* 398, 122893. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122893>
- Rodriguez-Blanco, J.D., Vallina, B., Blanco, J.A., Benning, L.G., 2014. The role of REE 3+ in the crystallization of lanthanites. *Mineral. Mag.* 78, 1373–1380. <https://doi.org/10.1180/minmag.2014.078.6.03>
- Rodriguez, R.P., Oliveira, G.H.D., Raimundi, I.M., Zaiat, M., 2012. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 74, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.012>
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W., 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1448-7>
- Rowe, O.F., Sánchez-España, J., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2007. Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environ. Microbiol.* 9, 1761–1771. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01294.x>
- Rüffel, V., Maar, M., Dammbrück, M.N., Hauröder, B., Neu, T.R., Meier, J., 2018. *Thermodesulfoobium* sp. strain 3baa, an acidophilic sulfate reducing bacterium forming biofilms triggered by mineral precipitation. *Environ. Microbiol.* 20, 3717–3731. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14374>
- Sahinkaya, E., Gunes, F.M., Ucar, D., Kaksonen, A.H., 2011. Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.042>
- Sahinkaya, E., Gungor, M., Bayrakdar, A., Yucesoy, Z., Uyanik, S., 2009. Separate recovery of copper and zinc from acid mine drainage using biogenic sulfide. *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.089>
- Sahinkaya, E., Isler, E., Yurtsever, A., Coban, I., 2019. Sulfidogenic treatment of acid mine drainage using anaerobic membrane bioreactor. *J. Water Process Eng.* 31, 100816. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100816>
- Sahinkaya, E., Özkaya, B., Kaksonen, A.H., Puhakka, J.A., 2007. Sulfidogenic fluidized-bed

- treatment of metal-containing wastewater at low and high temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.21195>
- Sahinkaya, E., Yurtsever, A., Isler, E., Coban, I., Aktaş, Ö., 2018. Sulfate reduction and filtration performances of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR). *Chem. Eng. J.* 349, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.001>
- Sakamoto, M., Benno, Y., 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1599–1605. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64192-0>
- Salo, M., Knauf, O., Mäkinen, J., Yang, X., Koukkari, P., 2020. Integrated acid leaching and biological sulfate reduction of phosphogypsum for REE recovery. *Miner. Eng.* 155, 106408. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106408>
- Salo, M., Mäkinen, J., Yang, J., Kurhila, M., Koukkari, P., 2018. Continuous biological sulfate reduction from phosphogypsum waste leachate. *Hydrometallurgy* 180, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.06.020>
- Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R., Sanz, J.L., 2011. Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6085–6093. <https://doi.org/10.1128/AEM.00654-11>
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J.L., Bijmans, M.F.M., Stams, A.J.M., 2014a. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *J. Hazard. Mater.* 269. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.032>
- Sánchez-Andrea, I., Stams, A., Hedrich, S., Nancucheo, I., Johnson, D.B., 2014b. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. *Extremophiles.* <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0701-6>
- Sánchez-Andrea, I., Stams, A.J.M., Amils, R., Sanz, J.L., 2013. Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 672–678. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12066>
- Sánchez-Andrea, I., Stams, A.J.M., Hedrich, S., Nancucheo, I., Johnson, D.B., 2015. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. *Extremophiles.* <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0701-6>
- Sánchez-España, J., Wang, K., Falagán, C., Yusta, I., Burgos, W.D., 2018. Microbially mediated aluminosilicate formation in acidic anaerobic environments: A cell-scale chemical perspective. *Geobiology* 16, 88–103. <https://doi.org/10.1111/gbi.12269>

- Sánchez-España, J., Yusta, I., Burgos, W.D., 2016. Geochemistry of dissolved aluminum at low pH: Hydrobasaluminite formation and interaction with trace metals, silica and microbial cells under anoxic conditions. *Chem. Geol.* 441, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2016.08.004>
- Santos, A.L., Johnson, D.B., 2018. Design and application of a low pH upflow biofilm sulfidogenic bioreactor for recovering transition metals from synthetic waste water at a Brazilian copper mine. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02051>
- Santos, A.L., Johnson, D.B., 2017. The effects of temperature and pH on the kinetics of an acidophilic sulfidogenic bioreactor and indigenous microbial communities. *Hydrometallurgy*. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.07.018>
- Santos, S.C., Liebensteiner, M.G., van Gelder, A.H., Dimitrov, M.R., Almeida, P.F., Quintella, C.M., Stams, A.J.M., Sánchez-Andrea, I., 2018. Bacterial glycerol oxidation coupled to sulfate reduction at neutral and acidic pH. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 64, 1–8. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.02.009>
- Sar, P., Kazy, K., Paul, D., Sarkar, A., 2013. Metal Bioremediation by Thermophilic Microorganisms. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5899-5>
- Sarti, A., Zaiat, M., 2011. Anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater in an anaerobic sequential batch reactor (AnSBR) using butanol as the carbon source. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.009>
- Sato, Y., Hamai, T., Hori, T., Aoyagi, T., Inaba, T., Kobayashi, M., Habe, H., Sakata, T., 2019. *Desulfosporosinus* spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot- and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7783–7793. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10063-2>
- Schleifer, K.H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G., Seidel-Rufer, H., 1990. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: Emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinivorans* gen. nov., . *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 19–27. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-1-19>
- Schlinkert, D., van den Boogaart, K.G., 2015. The development of the market for rare earth elements: Insights from economic theory. *Resour. Policy* 46, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2015.10.010>
- Seo, E.Y., Cheong, Y.W., Yim, G.J., Min, K.W., Geroni, J.N., 2017. Recovery of Fe, Al and Mn in acid coal mine drainage by sequential selective precipitation with control of pH.

Catena. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.07.022>

- Sherlock, E.J., Lawrence, R.W., Poulin, R., 1995. On the neutralization of acid rock drainage by carbonate and silicate minerals. *Environ. Geol.* 25, 43–54. <https://doi.org/10.1007/BF01061829>
- Skirrow, R.G., Huston, D.L., Mernagh, T.P., Thorne, J.P., Dulfer, H., Senior, A.B., 2013. Critical commodities for a high-tech world: Australia's potential to supply global demand.
- Soares, L.A., Borges Silva Rabelo, C.A., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse. *Biomass and Bioenergy* 117, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.07.018>
- Speece, R.E., 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 17, 416A-427A. <https://doi.org/10.1021/es00115a001>
- Srichandan, H., Kumar, R., Kumar, P., 2019. Hydrometallurgy Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: A critical review. *Hydrometallurgy* 189, 105122. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105122>
- Stewart, B.W., Capo, R.C., Hedin, B.C., Hedin, R.S., 2017. Rare earth element resources in coal mine drainage and treatment precipitates in the Appalachian Basin, USA. *Int. J. Coal Geol.* 169, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2016.11.002>
- Streten-Joyce, C., Manning, J., Gibb, K.S., Neilan, B.A., Parry, D.L., 2013a. The chemical composition and bacteria communities in acid and metalliferous drainage from the wet-dry tropics are dependent on season. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.024>
- Streten-Joyce, C., Manning, J., Gibb, K.S., Neilan, B.A., Parry, D.L., 2013b. The chemical composition and bacteria communities in acid and metalliferous drainage from the wet-dry tropics are dependent on season. *Sci. Total Environ.* 443, 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.024>
- Sun, H., Zhao, F., Zhang, M., Li, J., 2012. Behavior of rare earth elements in acid coal mine drainage in Shanxi Province, China. *Environ. Earth Sci.* 67, 205–213. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1497-7>
- Syaichurrozi, I., 2016. Review – Biogas Technology to Treat Bioethanol Vinasse. *Waste Technol.* 4. <https://doi.org/10.12777/wastech.4.1.16-23>
- Tang, K., Baskaran, V., Nemati, M., 2009. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries 44, 73–94. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.12.011>

- Thabet, O.B.D., Fardeau, M.L., Joulian, C., Thomas, P., Hamdi, M., Garcia, J.L., Ollivier, B., 2004. *Clostridium tunisiense* sp. nov., a new proteolytic, sulfur-reducing bacterium isolated from an olive mill wastewater contaminated by phosphogypse. *Anaerobe* 10, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.04.002>
- Tuttle, J.H., Dugan, P.R., Macmillan, C.B., Randles, C.I., 1969. Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. *J. Bacteriol.* 97, 594–602. <https://doi.org/10.1128/jb.97.2.594-602.1969>
- U.S. Geological Survey, 2020. Mineral commodity summaries 2020, U.S Geological Survey. <https://doi.org/10.3133/mcs2020>
- Uçar, D., 2017. Sequential Precipitation of Heavy Metals Using Sulfide-Laden Bioreactor Effluent in a pH Controlled System. *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.* 38, 162–167. <https://doi.org/10.1080/08827508.2017.1281131>
- Ueki, I., Koga, Y., Povalko, N., Akita, Y., Nishioka, J., Yatsuga, S., Fukiyama, R., Matsuishi, T., 2006. Mitochondrial tRNA gene mutations in patients having mitochondrial disease with lactic acidosis. *Mitochondrion* 6, 29–36. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63896-0>
- Utgikar, V.P., Harmon, S.M., Chaudhary, N., Tabak, H.H., Govind, R., Haines, J.R., 2002. Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environ. Toxicol.* 17, 40–48. <https://doi.org/10.1002/tox.10031>
- Utgikar, V.P., Tabak, H.H., Haines, J.R., Govind, R., 2003. Quantification of toxic and inhibitory impact of copper and zinc on mixed cultures of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.10575>
- VALE (2019) Produção e vendas da Vale no 2t19. Disponível em: <[http://www.vale.com/PT/investors/information-market/quarterly-results/ResultadosTrimestrais/PREPORT2T19\\_p%203.pdf](http://www.vale.com/PT/investors/information-market/quarterly-results/ResultadosTrimestrais/PREPORT2T19_p%203.pdf) > Acesso 23 nov. 2019
- Vasquez, Y., Escobar, M.C., Saenz, J.S., Quiceno-Vallejo, M.F., Neculita, C.M., Arbeli, Z., Roldan, F., 2018. Effect of hydraulic retention time on microbial community in biochemical passive reactors during treatment of acid mine drainage. *Bioresour. Technol.* 247, 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.144>
- Vieira, B.F., Couto, P.T., Sancinetti, G.P., Klein, B., van Zyl, D., Rodriguez, R.P., 2016. The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic process in anaerobic reactor. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 51, 793–797. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1181433>
- Villa-Gomez, D.K., Pakshirajan, K., Maestro, R., Mushi, S., Lens, P.N.L., 2015. Effect of process variables on the sulfate reduction process in bioreactors treating metal-containing

- wastewaters: factorial design and response surface analyses. *Biodegradation* 26, 299–311. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9735-4>
- Wilde, E., Collins, M.D., Hippe, H., 1997. *Clostridium pascui* sp. nov., a New Glutamate-Fermenting Sporeformer from a Pasture in Pakistan 164–170.
- Xingyu, L., Zou, G., Wang, X., Zou, L., Wen, J., Ruan, R., Wang, D., 2013. A novel low pH sulfidogenic bioreactor using activated sludge as carbon source to treat acid mine drainage (AMD) and recovery metal sulfides: Pilot scale study. *Miner. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.11.004>
- Yan, X., Luo, X., Zhao, M., 2016. Metagenomic analysis of microbial community in uranium-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 299–310. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7003-5>
- Yilmaz, T., Yucel, A., Cakmak, Y., Uyanik, S., Yurtsever, A., Ucar, D., 2019. Treatment of acidic mine drainage in up-flow sulfidogenic reactor: Metal recovery and the pH neutralization. *J. Water Process Eng.* 32, 100916. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100916>
- Zeng, D., Yin, Q., Du, Q., Wu, G., 2019. System performance and microbial community in ethanol-fed anaerobic reactors acclimated with different organic carbon to sulfate ratios. *Bioresour. Technol.* 278, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.047>
- Zeng, T., Zhang, S., Gao, X., Wang, G., Lens, P.N.L., Xie, S., 2018. Assessment of Bacterial Community Composition of Anaerobic Granular Sludge in Response to Short-Term Uranium Exposure. *Microb. Ecol.* 76, 648–659. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1152-x>
- Zhang, M., Wang, H., 2016. Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. *Miner. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.02.008>
- Zhang, Xiaohui, Tang, S., Wang, M., Sun, W., Xie, Y., Peng, H., Zhong, A., Liu, H., Zhang, Xiaowei, Yu, H., Giesy, J.P., Hecker, M., 2019. Acid mine drainage affects the diversity and metal resistance gene profile of sediment bacterial community along a river. *Chemosphere* 217, 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.210>
- Zhao, F., Cong, Z., Sun, H., Ren, D., 2007. The geochemistry of rare earth elements (REE) in acid mine drainage from the Sitai coal mine, Shanxi Province, North China. *Int. J. Coal Geol.* 70, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2006.01.009>
- Zhou, J., Zhou, X., Li, Y., Xing, J., 2015. Bacterial communities in haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors under different electron donors revealed by 16S rRNA MiSeq

sequencing. *J. Hazard. Mater.* 295, 176–184.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.010>

Zhou, Z.J., Yin, H.Q., Liu, Y., Xie, M., Qiu, G.Z., Liu, X.D., 2010. Diversity of microbial community at acid mine drainages from Dachang metals-rich mine, China. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)* 20, 1097–1103. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(09\)60263-6](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(09)60263-6)

Ziemkiewicz, P., Water, W. V., 2016. Recovery of Rare Earth Elements ( REEs ) from Coal Mine Drainage. *Proc. 37th W. Virginia Surf. Mine Drain. Task Force Symp.* 43–50.