

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

Bárbara Franco Vieira

**TRATAMENTO ANAERÓBIO DE DRENAGEM DE MINA: estratégias de operação
em batelada utilizando os subprodutos glicerol bruto e trub como fontes de
carbono**

Belo Horizonte
2020

Bárbara Franco Vieira

TRATAMENTO ANAERÓBIO DE DRENAGEM DE MINA: estratégias de operação em batelada utilizando os subprodutos glicerol bruto e trub como fontes de carbono

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientador: Gustavo Ferreira Simões

Co-orientadores: Eduardo Coutinho de Paula e Renata Piacentini Rodriguez

Belo Horizonte

2020

V658t

Vieira, Bárbara Franco.

Tratamento anaeróbico de drenagem de mina [recurso eletrônico] : estratégias de operação em batelada utilizando os subprodutos glicerol bruto e trub como fontes de carbono / Bárbara Franco Vieira.- 2020.
1 recurso online (x, 115 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Gustavo Ferreira Simões.

Coorientadores: Eduardo Coutinho de Paula, Renata Piacentini Rodriguez.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 99-115.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Meio ambiente - Teses.
3. Minas - Drenagem - Teses. 4. Biorremediação - Teses. 5. Glicerina - Teses. 6. Sulfatos - Teses. I. Simões, Gustavo Ferreira. II. Paula, Eduardo Coutinho de. III. Rodriguez, Renata Piacentini. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. V. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte – BRASIL

Telefax: 55 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br

<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tratamento Anaeróbio de Drenagem De Mina: Estratégias De Operação
Em Batelada Utilizando Os Subprodutos Glicerol Bruto e Trub
Como Fontes de Carbono

BÁRBARA FRANCO VIEIRA

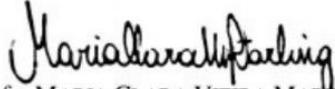
Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:


Prof. GUSTAVO FERREIRA SIMÕES - Orientador


Prof. EDUARDO COUTINHO DE PAULA - Co-Orientador


Profa. RENATA PIACENTINI RODRIGUEZ - Co-Orientadora


Prof. MARCOS VON SPERLING


Profa. MARIA CLARA VIEIRA MARTINS STARLING


Prof. MARCELO ZAIAT


Profa. MARCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH


Profª Sonaly Cristina Rezende Borges de Lima
Coordenadora

Versão Final aprovada por


Prof. Gustavo Ferreira Simões
Orientador

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Receptividade, entusiasmo, confiança, empatia e encorajamento foi o que encontrei junto do Gustavo Ferreira Simões e do Eduardo Coutinho de Paula. Independente dos títulos, todos foram os meus orientadores e amigos, e eu sou profundamente grata a eles. Foi uma honra trabalhar com vocês! É oportuno aqui frisar o carinho e admiração que tenho por Renata Piacentini Rodriguez e sua competência. Foi um deleite que a vida tenha proporcionado e você aceito este reencontro acadêmico. O contato com vocês sempre foi um refrigerio, e assim quero ser com meus alunos. O meu momento não favoreceu um encontro de almas com outros professores que também tiveram grande importância na minha formação, mas por quem preservo admiração e respeito.

Além dos professores, precisamos de favores e aprendemos com pessoas que, felizmente, cruzam nossos caminhos, especialmente nossos laboratórios. Nesta empreitada foram dentre tantos colaboradores, Yasmim Fonseca, André Ferreira, Oscar Herrera, Klebdy Dayana Suarez, Aline Paranhos, Juliana Kawanishi, Marcos Martins Silva, Alessandra Martins, Elayne Machado, Raymundo Ray, Sandrine Araujo, Professor Dr. Gunther Brucha, Professor Dr. Mateus Amaral, Professor Dr. Bruno Baeta e Professor Dr. Rogelio Brandão. Eu gostaria de mencionar de modo especial a Professora Dra. Sonaly Borges de Lima, pois ela representa o fato de que humanidade é parceira do profissionalismo.

A nossa existência não é nem de longe técnica, inanimada e “Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.” (1 Coríntios 13:1). O amor de Deus e a extensão de seus braços através dos meus pais, Elizabeti Franco e Horácio Vieira da Costa, me sustentaram até aqui. Mãe, você é meu exemplo de força e seu carinho me sustém. Pai, obrigada por ter partido tendo orgulho de mim. Eu também sempre tive orgulho de você e entendo a sua luta. Minha família, em especial meu tio Roberto Elias Franco, também foram facilitadores dessa jornada. Minha mãe, minha vó Natália Franco e minha irmã Bruna Franco foram minhas intercessoras em oração. Alguns amigos em especial tiveram importância nesta fase da minha vida. Como sempre, Eliziane Almeida, obrigada pelo aprazível companheirismo. A Ingrid Castro que se tornou minha resolvedora oficial de problemas. A deliciosa admiração com que sempre olharam meus objetivos e esforços foi muito importante pra mim. Esta dedicação em me ajudar e olhar com amor, também recebi do Jorge Anastácio, da Gabriela Werner, do João Almeida, do João Paulo Braga, Warllen Torres e da Richeli Claro. E meu Império de amor, Dri! Minha prima Ester Franco além de ser uma inspiração, em alguns momentos desses anos teve um diálogo definitivo comigo, assim como foi com Kali Franco.

O Serviço de psicologia aplicada da UFMG (SPA) foi definitivo para minhas superações. Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e aos laboratórios de Biotecnologia da UNIFAL e o Laboratório de química tecnológica e ambiental da UFOP pela parceria.

Grata, Bárbara Franco Vieira.

RESUMO

A drenagem de mina (DM) é um efluente rico em sulfato, metais e metaloides. Esta pesquisa utilizou DM real em reatores em bateladas sequenciais com tempo de detenção hidráulica de 168 h e atmosfera micro-aeróbia para avaliar a eficiência dos seguintes doadores de elétrons: trub, resíduo de cervejaria e glicerol bruto (GB), subproduto da produção de biodiesel. A avaliação foi realizada em conjunto com os doadores de elétrons etanol e glicerol puro (GP) como parâmetros positivos. Nesta etapa, foi aplicado um procedimento de adaptação no qual o inóculo foi exposto a concentrações gradativamente maiores de substrato em cada batelada até atingir a relação DQO/SO₄²⁻ de 3 ao final de 4 meses. Concluiu-se que não houve diferença de eficiência na remoção de sulfato entre os 4 tipos de substratos (89,1-92,3%), mas houve acidificação nos efluentes do tratamento com GP, GB e trub (pH abaixo de 4,9), enquanto com etanol o pH foi de 6. A biomassa obtida ao final deste procedimento com cada substrato foram comparados por sequenciamento de alto rendimento entre si, com o inóculo em que foi adicionado apenas DM sem adição de fonte de carbono e com o inóculo inicial. Os resultados mostraram que no sistema em que foi aplicada apenas DM houve aumento na abundância relativa de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e *Archaeas*, enquanto houve diminuição na abundância de bactérias oxidantes de enxofre (BOE). Houve diminuição na abundância de *Archaeas* com GP, GB e, principalmente, com trub. Com estes substratos os grupos BRS e BOE também foram desfavorecidos. Com etanol houve favorecimento das BRS, porém as BOE e *Archaeas* também foram favorecidas. Uma segunda etapa foi desenvolvida utilizando-se inóculo armazenado na presença de DM por 30 dias. Foi aplicado o fornecimento fracionado da fonte de carbono (FFFC), no qual a quantidade de substrato referente à relação DQO/SO₄²⁻ de 3 foi dividida em porções iguais adicionadas a cada 24 h. O GB foi fracionado em 6 porções e o efluente obtido ao final de 144 h de batelada apresentou pH neutro (6,83), atingindo 94,15% de remoção de sulfato. A adição de trub em 6 porções foi insuficiente para evitar a acidificação do sistema (pH 4,26), interrompendo a remoção de sulfato em 39,65%. Quando a mesma quantidade de trub foi aplicada em menores porções ao longo de 7 dias, foi obtido um efluente final com pH de 7,01 e a remoção de sulfato foi de 88,49%. Foram testadas duas opções de pós-tratamento para destinação da DQO residual encontrada no efluente da etapa sulfetogênica. O potencial para geração de metano foi comprovado para os efluentes do tratamento com trub e com GB. O acúmulo de moléculas de valor agregado também foi averiguado, constatando-se potencial de produção, principalmente, dos ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico no sistema com trub, e de ácido fórmico, acético, propiônico e butírico no sistema com GB. Ambos os subprodutos avaliados se mostraram promissores para um co-tratamento com DM mediante o modo operacional com FFFC proposto nesta pesquisa, com possibilidade de obtenção de moléculas de valor agregado produzidas pelo sistema anaeróbio de degradação das fontes de carbono.

Palavras-chave: drenagem de mina, biorremediação, glicerol bruto, resíduo de cervejaria, co-tratamento, redução de sulfato.

ABSTRACT

Mine drainage (MD) is an effluent rich in sulfate, metals, and metalloids that can compromise aquatic life in the receiving water bodies. This research used real DM in reactors in sequential batches with hydraulic detention time of 168 h and micro-aerobic atmosphere to evaluate the efficiency of the following electron donors: trub, brewery residue, and crude glycerol (GB), a by-product of biodiesel production. The evaluation was performed with ethanol and pure glycerol (PG) as positive electron donors parameters. In this step, an adaptation procedure was applied in which the inoculum was exposed to gradually higher concentrations of the substrate in each batch until reaching the COD/SO₄²⁻ ratio of 3 at the end of 4 months. It was concluded that there was no difference in the efficiency in the removal of sulfate between the 4 types of substrates (89.1-92.3%), but there was acidification in the effluents of the treatment with PG, CG and trub (below 4.9) while with ethanol the effluent pH was 6. The sludge obtained at the end of this procedure with each substrate was compared by high-throughput sequencing with each other, with the sludge where only MD was added without adding a carbon source and also with the inoculum initial. The results showed that in the system where only MD was applied there was an increase in the relative abundance of sulfate-reducing bacteria (SRB) and *Archaeas*, while there was a decrease in the abundance of sulfur oxidizing bacteria (SOB). There was a decrease in the abundance of *Archaeas* with PG, CG, and mainly with trub. With these substrates, the SRB and SOB groups were also disadvantaged. With ethanol SRB were favored, but SOB and *Archaeas* were also favored. A second stage was developed using an inoculum which was stored with MD for 30 days. The fractional supply of carbon source (FSCS) was applied, where the amount of substrate referring to the COD/SO₄²⁻ ratio of 3 was divided into equal portions added every 24 h. The GB was divided into 6 portions and the effluent obtained after 144 h of batching showed a neutral pH (6.83), reaching 94.15% of sulfate removal. The addition of trub in 6 portions was insufficient to avoid acidification of the system (effluent pH 4.26), interrupting the removal of sulfate in 39.65%. When the same amount of trub was applied in smaller portions over 7 days, a final effluent with a pH of 7.01 was obtained and the removal of sulfate was 88.49%. Two post-treatment options for the the destination of the residual COD in the effluent of the sulfidogenic phase were tested. The potential for methane generation was proven for the effluents from treatment with trub and CG, being greater for the former. The accumulation of added-value molecules was also investigated. The potential to produce mainly acetic, propionic, isobutyric, and butyric acids was confirmed in the trub system, and formic, acetic, propionic, and butyric acids in the CG system. Both evaluated by-products showed promise for a co-treatment with MD through the operational mode with FSCS proposed in this research, with the possibility of obtaining added value molecules produced by the anaerobic system of degradation of carbon sources.

Keywords: mine drainage, bioremediation, crude glycerol, brewery residue, co-treatment, sulfate reduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Interação dos ciclos de arsênio e enxofre como forma de imobilização destes elementos. Fonte: Adaptado de Rodriguez-Freire <i>et al.</i> (2014).....	25
Figura 1.1 – Representação esquemática do método de pesquisa. Fonte: da autora.....	44
Figura 1.2 - Elementos utilizados nos sistemas de tratamento. 1: DM; 2: Trub; 3: Inóculo e 4: GB. Fonte: da autora.....	45
Figura 1.3 - Componentes presentes nos sistemas avaliados na primeira etapa. Fonte: da autora.....	44
Figura 1.4 - Reatores da etapa de produção de biogás sendo submetidos ao sistema de troca de atmosfera. Fonte: da autora.....	51
Figura 1.2 - Etapas da degradação anaeróbia necessárias para cada um dos substratos utilizados. Fonte: Chernicharo (2016) adaptado.....	60
Figura 1.2 - Consumo e uso da DQO em vias metabólicas de redução de sulfato. Fonte: da autora.....	63
Figura 1.3 - Teste Tukey com 95% de confiança. Fonte: da autora.....	65
Figura 5.4 - Biodiversidade e abundância relativa dos grupos BRS, BOE, <i>Archaeas</i> no lodo de cada um dos sistemas. Fonte: da autora.....	69
Figura 5.5 - Abundância relativa dos 20 gêneros melhor representados em pelo menos um dos tipos de sistemas. Fonte: da autora.....	74
Figura 1.6 - Abundância relativa dos gêneros de BRS mais abundantes em pelo menos um dos tipos de sistemas. Fonte: da autora.....	81
Figura 1.7 - Concentração de sulfato ao longo do tempo mediante as relações DQO/SO ₄ ²⁻ 1; 2,5 e 5, com os substratos GB e Trub. Fonte: da autora.....	92
Figura 1.8 - Porcentagem de remoção de sulfato e DQO e proporção de DQO utilizada na redução de sulfato com os inóculos Cru e Acl sob as relações DQO/SO ₄ ²⁻ de 3 (a) e 0,8 (b). Fonte: da autora.....	96
Figura 1.9 - Remoção de sulfato e DQO e porcentagem de DQO utilizada na redução de sulfato com inóculo Acl sob as relações DQO/SO ₄ ²⁻ de 0,8; 1,6, 3 e 5. Fonte: da autora.....	101
Figura 1.10 - Efeitos na remoção de sulfato e no pH promovidos pela adição de GB a cada 24 h. Fonte: da autora.....	105
Figura 1.11 - Efeitos da adição fracionada de trub na remoção de sulfato e no pH ao longo do tempo quando 1380,47 mg de DQO de trub é adicionado em 6 porções iguais e quando a mesma quantidade é adicionada em 7 porções iguais. Fonte: da autora.....	106
Figura 1.12 - Efeitos da forma como o substrato é adicionado na quantidade de DQO consumida e direcionada para a sulfetogênese (quantidade total de substrato referente a relação DQO/SO ₄ ²⁻ de 3). Fonte: da autora.....	107
Figura 1.13 - Geração de alcalinidade e eficiência na remoção de sulfato de acordo com cada relação DQO/SO ₄ ²⁻ nos sistemas que apresentavam pH efluente acima de 5,8. O asterisco (*) é usado para identificar os sistemas nos quais o substrato foi adicionado de modo fracionado. Fonte: da autora.....	108

Figura 1.14 - Remoção de poluentes da DM com GB e com trub com fracionamento da adição de sulfato. Fonte: da autora.....110

Figura 1.3 - Acúmulo de metano a partir da DQO presente nos efluentes do tratamento sulfetogênico em relação aos parâmetros controle endógeno e com ácido propiônico como doador de elétrons. Condição I: efluente da etapa sulfetogênica alimentada com trub, II: efluente da etapa sulfetogênica alimentada com GB, III: ácido propiônico, Controle endógeno: sem fornecimento de substrato. Fonte: da autora.....114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Parâmetros operacionais ideais e de tolerância para as BRS.....	27
Tabela 1.2 - Variações no TDH em reatores de remoção biológica de sulfato.....	28
Tabela 1.3 - Condições e resultados de aplicações de GP como fonte de carbono no tratamento biológico de DM.....	36
Tabela 1.4 - Condições e resultados de aplicações de GB como fonte de carbono na redução de sulfato.....	37
Tabela 1.5 - Composição de resíduos de cervejaria (m/m).....	40
Tabela 4.1 - Volume de substrato utilizado com cada tipo de doador de elétrons em cada uma das relações DQO/SO ₄ ²⁻ aplicadas e os volumes reacionais e de <i>headspace</i> resultantes.....	46
Tabela 1.2 - Condições experimentais dos reatores utilizados na Etapa II.....	48
Tabela 1.3 - Condições experimentais utilizadas na Etapa III.....	49
Tabela 1.4 - Condições experimentais do teste de produção de metano.....	52
Tabela 4.5 - Índices de Diversidade e Riqueza.....	55
Tabela 1.3 - Características dos substratos.....	57
Tabela 1.4 - Composição da DM, cujo Lote 1 foi utilizado nas Etapas I e II e o Lote 2 nas Etapas III e IV (mg.L ⁻¹).....	57
Tabela 1.5 - Características dos inóculos utilizados em cada etapa - STV (mg.L ⁻¹).....	57
Tabela 1.6 - Remoção de sulfato e pH efluente obtidos com as relações DQO/SO ₄ ²⁻ de 2 e 3 com os diferentes tipos de substrato avaliado.....	59
Tabela 1.7 - Rendimento energético de diferentes etapas da degradação anaeróbia. Fonte: adaptado de Chernicharo (2016).....	62
Tabela 1.6 - Eficiência na remoção de metais e metaloides em porcentagem (%).....	67
Tabela 1.7 - Gêneros de <i>Archaeas</i> com abundância relativa acima de 0,02% em pelo menos um dos sistemas. Fonte: da autora.....	72
Tabela 1.8 - Abundância relativa de gêneros fermentadores com resistência à presença de DM e sensibilidade à presença de trub.....	75
Tabela 1.9 - Moléculas usadas como doador de elétrons pelas principais BRS presentes nos sistemas.....	83
Tabela 1.10 - Gêneros atuantes no ciclo do enxofre no sentido da sulfetogênese. Fonte: da autora.....	84
Tabela 1.11 - Gêneros atuantes no ciclo do enxofre no sentido da sulfetogênese que não estavam presentes no inóculo inicial acrescentados ao lodo por algum dos efluentes. Fonte: da autora.....	86
Tabela 1.12 - Eficiência de remoção de sulfato e pH efluente sob as diferentes relações DQO/SO ₄ ²⁻	89
Tabela 1.13 - Características da mistura de DM com os respectivos subprodutos utilizando-se a relação DQO/SO ₄ ²⁻ de 3.....	95
Tabela 5.14: Classificação da eficiência na remoção de sulfato de acordo com o teste de Scott-Knott para as variáveis das condições de tratamento, tipo de inóculo, tipo de substrato e relação DQO/SO ₄ ²⁻	100
Tabela 5.15: Classificação da eficiência na remoção de sulfato de acordo com o teste de Scott-Knott para as variáveis das condições de tratamento, tipo de substrato e relação DQO/SO ₄ ²⁻ . O p-valor estimado foi igual a 8.1444e-08 (Pr(>F)).....	102
Tabela 1.16 - Alterações no efluentes provocadas pela etapa metanogênica.....	113
Tabela 1.17 - Ácidos orgânicos acumulados no efluente da etapa sulfetogênica realizada com quantidade de substrato referente à relação DQO/SO ₄ ²⁻ de 3.....	118

Tabela 1.18 - Ácidos orgânicos acumulados no efluente da metanogênese.....121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DM	- Drenagem de mina
DAM	- Drenagem ácida de mina
GB	- Glicerol bruto
GP	- Glicerol puro
DQO	- Demanda química de oxigênio
FFFC	- Fornecimento fracionado da fonte de carbono
AGV	- Ácidos graxos voláteis
BRS	- Bactérias redutoras de sulfato
ACCC	- Ácidos carboxílicos de cadeia curta
ACCM	- Ácidos carboxílicos de cadeia média
AGCL	- Ácidos graxos de cadeia longa
GEE	- Gases de efeito estufa
FEAM	- Fundação Estadual do Meio Ambiente
SATC	- Indústria Carbonífera de Santa Catarina
CPRM	- Serviço Geológico do Brasil
TDH	- Tempo de Detenção Hidráulica
Acl	- Aclimatado
ST	- Sólidos totais
SVT	- Sólidos voláteis totais
STF	- Sólidos totais fixos
UASB	- <i>Up-flow anaerobic sludge blanket</i>
DARB	- <i>Dissimilatory As reducing bacteria</i>
BOE	- Bactérias oxidantes de enxofre
UTO	- Unidade taxonômica operacional
PHA	- Poli-hidroxicarboxilatos
NGS	- <i>Next-generation sequencing</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	Drenagem de Mina.....	19
3.2	Tratamento convencional e o tratamento biológico com bactérias redutoras de sulfato	21
3.2.1	Fatores intervenientes no metabolismo das BRS	26
3.2.2	Co-tratamento utilizando BRS: DM e diferentes fontes de carbono	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Caracterização dos substratos, inóculo e DM	44
4.2	Procedimentos experimentais de adaptação lenta	45
4.2.1	Procedimento experimental I: Avaliação dos substratos trub e GB como doadores de elétrons para remoção de sulfato	45
4.2.2	Procedimento experimental II: avaliação da relação DQO/SO ₄ ²⁻	47
4.3	Procedimentos experimentais de rápida adaptação	48
4.3.1	Procedimento experimental III: avaliação da adaptação do inóculo à DM e diferentes relações DQO/SO ₄ ²⁻	48
4.3.2	Procedimento experimental IV: adição fracionada de substrato	50
4.3.3	Polimento do efluente da etapa sulfetogênica com produção de biogás.....	50
4.4	Análises.....	52
4.5	Quantificação da eficiência de remoção e destino da DQO	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1	Caracterização dos substratos, inóculo e DM	56
5.2	Efeitos dos diferentes doadores de elétrons nos sistemas de adaptação lenta	58
5.2.1	Eficiência dos subprodutos trub e GB como doadores de elétrons na remoção de sulfato e DQO	58
5.2.2	Eficiência na remoção de metais e metaloides dos sistemas com GB e trub na relação DQO/SO ₄ ²⁻ de 3	66
5.3	Aspectos gerais da comunidade microbiana do inóculo inicial e do lodo proveniente dos sistemas sem fonte de carbono e com cada tipo de doador de elétrons.....	68
5.4	Efeitos da relação DQO/SO ₄ ²⁻ nos sistemas de adaptação lenta	88
5.5	Diminuição do período de adaptação do inóculo à sulfetogênese e geração de efluente com características favoráveis ao processo metanogênico.....	93
5.5.1	Características da mistura de DM com GB e com trub	94
5.5.2	Efeitos da adaptação do inóculo com DM sem substrato	95
5.5.3	Efeitos da relação DQO/SO ₄ ²⁻ e tipo de substrato utilizando inóculo adaptado com DM 100	
5.5.4	Fracionamento da adição de substrato como estratégia operacional: efeitos na eficiência do tratamento e alcalinidade do efluente	104
5.5.5	Remoção de metais e metaloides mediante o modo de operação com fracionamento no suprimento do substrato	109
5.6	Pós-tratamento com geração de metano.....	112

5.6.1	AGV formados e consumidos	116
6	CONCLUSÕES.....	122
	REFERÊNCIAS	124

1 INTRODUÇÃO

O enxofre está dentre os elementos mais abundantes da Terra, distribuído especialmente como sulfato de cálcio (CaSO_4), conhecido como gesso, sulfetos metálicos, enxofre elementar na crosta terrestre e como sulfato (SO_4^{2-}) em ambiente marinho (LIN *et al.*, 2018). Algumas atividades antrópicas provocam interferências no ciclo do enxofre com poluição de águas por lançamento de efluentes contendo altas concentrações de sulfato, como a indústria de papel e celulose, óleo sulfonado, peróxido orgânico, materiais fotográficos, mineração, têxteis e explosivos (SILVA *et al.*, 2011). A poluição por enxofre pode levar a impactos como chuva ácida, corrosão de concreto e aço, maus odores, lixiviação de metais e metaloides. O subproduto que mais contribui com a poluição por enxofre em termos de volume, é a Drenagem de Mina (DM), também conhecida como “*rock drainage*”. A DM resulta de processos químicos e biológicos naturais que são intensificados em ambientes onde há fragmentação de rochas sulfetadas ou onde são estocadas pilhas de rejeitos de mineração contendo sulfeto (RODRIGUEZ, 2010).

Existe uma forma de classificação para diferentes tipos de DM de acordo com a concentração de sulfato e o pH, na qual drenagem ácida de mina são os casos com valores entre 10 a 1.000.000 mg.L^{-1} de sulfato e pH entre 1 e 6, drenagem neutra de mina entre 1 e 1000 mg.L^{-1} e pH entre 6 e 9 e drenagem salina de mina com concentração de sulfato variando de 1000 a 40.000 mg.L^{-1} e pH entre 6 e 9 (PRICE, 2009). No entanto, a composição da DM pode variar em relação ao mesmo local em diferentes períodos ou em relação a áreas próximas em ordem de grandeza significativas (SILVAS *et al.*, 2011).

Os tratamentos mais utilizados são os de natureza físico-química, mediante aeração e adição de reagentes alcalinos, os quais apresentam elevado custo, limitada eficiência e geração de subprodutos de difícil disposição (JOHNSON; HALLBERG, 2005). Uma alternativa para o tratamento destes efluentes é a biorremediação usando bactérias redutoras de sulfato (BRS), um grupo bastante diversificado de microrganismos capazes de utilizar o sulfato comoceptor final de elétrons. Na DM não é encontrada uma fonte de carbono, o que faz necessária a adição de um doador de elétrons para redução do sulfato. O sulfeto de hidrogênio produzido pode reagir com os elementos potencialmente tóxicos, usualmente metais com estados de oxidação +2, tais como Zn, Fe, Cu, Ni e Cd, precipitando-os na forma de sulfetos metálicos, os quais possuem baixa solubilidade em uma ampla faixa de pH (CHOUDHARY; SHEORAN, 2012). Atualmente a maioria das pesquisas ainda utiliza como fonte de carbono moléculas puras que

envolvem custo de produção e obtenção. Entre as moléculas mais utilizadas tem-se o etanol (RODRIGUEZ *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2020) e o glicerol puro (GP) (BERTOLINO *et al.*, 2014; FALAGÁN *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2014; SANTOS; JOHNSON, 2018; COSTA *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2018). O tratamento biológico com BRS é tecnicamente eficiente para remoção dos poluentes da DM, no entanto, limitado pelo custo na aquisição da fonte de carbono (BERTOLINO *et al.*, 2012).

Em ambientes com disponibilidade de substratos orgânicos complexos, produtos da decomposição de moléculas de alta massa molar promovida por espécies hidrolíticas, acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas, são usados como fonte de elétrons pelas BRS. A capacidade das BRS de metabolizar uma grande variedade de doadores de elétrons tem sido explorada por pesquisas que objetivam o aumento da sustentabilidade do tratamento biológico utilizando subprodutos ou resíduos de outros processos como fonte de carbono (HAO *et al.*, 2014; MOCKAITIS *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2011; MOODLEY *et al.*, 2017; KEFENI *et al.*, 2017; JAMIL, CLARKE, 2013; BONIOLO, 2016; PLACE *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2019). Além do fornecimento de elétrons, alguns subprodutos industriais podem proporcionar aporte de macro e micronutrientes para o consórcio microbiano.

Dentre os subprodutos que apresentam potencial para serem aplicados à digestão anaeróbia tem-se o trub, resíduo da fabricação de cerveja, e o glicerol bruto (GB), subproduto da produção de biodiesel. Diante do grande crescimento na produção mundial de biodiesel, cresce a preocupação com o destino do GB produzido. Do montante de biodiesel produzido, são gerados de 10 a 20% do volume de GB, o qual pode ter de 30-50% de impurezas (QUISPE *et al.*, 2013). Entre os processos de aplicação do glicerol já investigados, tem-se os que envolvem sua degradação por consórcios de microrganismos anaeróbios para a produção de biogás (ALBUQUERQUE, 2014; ANDRIAMANOHIARISOAMANANA *et al.*, 2018) e como fonte de carbono em processos de redução de sulfato. Entre as pesquisas que investigaram o uso do GB como fonte de carbono para redução de sulfato, tem-se as que partiram de efluentes com baixa concentração de sulfato (ZAMZOW *et al.*, 2007; MORA *et al.*, 2018), outra foi executada em campo de petróleo (SANTOS *et al.*, 2015) e outra aplicada junto aos rejeitos sólidos para redução da liberação dos poluentes de DM (BEHROOZ *et al.*, 2012).

Os resíduos da produção de cerveja também compõem um amplo campo de pesquisa. A preocupação em proporcionar valorização para estes subprodutos aumenta visto que a produção

de cerveja também é crescente. Normalmente as cervejarias misturam todos os resíduos líquidos, incluindo a água de lavagem dos tanques, proporcionando um volume de 3 a 20 unidades de águas residuárias por unidade de cerveja produzida. A DQO deste efluente costuma se estabelecer entre 2000 a 6000mg.L⁻¹. O trub proveniente do tanque de ebulição e fermentação corresponde a apenas 3% deste volume, porém com 97% da carga orgânica – 0,126±0,015 gDQO.L⁻¹, representando uma proporção substancial do custo de tratamento do resíduo de cervejaria (HULTBERG; BOLDIN, 2019).

Há registros da ocorrência de degradação anaeróbia de trub (PERIMENIS *et al.*, 2018) e de trub com GB (OLIVEIRA *et al.*, 2018). A produção de biogás a partir de trub foi avaliada em comparação com resíduos de polpa de fruta (maçã, pêra e tâmara) após a extração do suco, e a maior eficiência foi obtida com trub. O trub é proveniente de processos de cocção, o que favorece a diminuição da cristalinidade e aumento da área superficial de açúcares, os quais correspondem a 57,4% dos sólidos totais deste subproduto (PERIMENIS *et al.*, 2018). Isto pode explicar o potencial do trub como substrato do consórcio anaeróbio usado para produção de metano (CH₄), assim como pode ser um indicativo de que o consórcio anaeróbio pode promover redução de sulfato a partir da oxidação das moléculas disponíveis no trub.

Ambos os subprodutos mencionados apresentam elevada demanda química de oxigênio (DQO) e moléculas de elevada massa molar. Este perfil proporciona a tendência de que, aplicados à degradação anaeróbia, levem ao acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV), ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e hidrogênio (H₂), resultando em acidificação e falha do reator (OLIVEIRA *et al.*, 2018). As pesquisas que envolveram estes substratos usaram estratégias como adição de aditivos alcalinos, diluição ou mistura com outros substratos para evitar a acidificação dos sistemas.

Neste trabalho, o trub e o GB foram avaliados como fonte de carbono no tratamento biológico de DM em reatores em batelada. Esta configuração permite o tratamento de efluentes gerados intermitentemente, como pode ocorrer com a DM, e facilita o controle da duração do tempo de ciclo o que pode ser útil para adequação às flutuações que podem ocorrer na concentração de sulfato da DM. Os substratos foram comparados entre si em relação à eficiência como doadores de elétrons na redução biológica de sulfato e em relação ao GP e ao etanol. A composição microbiológica do inóculo exposto à DM com cada um destes 4 doadores de elétrons, do inóculo exposto somente à DM e do inóculo inicial foram comparados entre si. Foi avaliado um modo

de operação simples que evitasse a acidificação do sistema sem a necessidade de uso de reagentes, no qual os próprios subprodutos agissem complementarmente em um co-tratamento sustentável. O efluente do tratamento sulfetogênico foi avaliado quanto à sua aplicação para produção de biogás ou acúmulo de moléculas de valor agregado.

O presente documento foi organizado em 6 seções. As seções 1 e 2 trazem, respectivamente, a Introdução e os Objetivos do estudo. A seção 3 apresenta a Revisão de Literatura, no qual a DM e o tratamento biológico com BRS são apresentados, tal como é discutida a possibilidade de co-tratamento com subprodutos como doadores de elétrons. Os Materiais e Métodos são apresentados na seção 4, no qual são descritos os dois procedimentos que visavam especialmente à remoção dos poluentes da DM. Os procedimentos se diferenciam entre si especialmente pelo modo de adaptação do inóculo e de adição do substrato. A seção 5 discorre sobre os Resultados obtidos, no qual os subitens de 5.1 a 5.4 dizem respeito ao primeiro tipo de procedimento. Nele, o inóculo foi lentamente apresentado a concentrações crescentes de substrato, o que será chamado neste trabalho de adaptação lenta. O subitem 5.5 mostra os resultados de um procedimento em que o inóculo é armazenado em contato com a DM. No subitem 5.6 são apresentados os resultados do pós-tratamento, desenvolvido para proporcionar um destino adequado à DQO residual. As principais conclusões são listadas na seção 6, assim como as recomendações para trabalhos futuros. A relação das referências bibliográficas utilizadas é apresentada na última seção.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral deste projeto foi definir estratégias de adaptação e operação em batelada para tratamento biológico de Drenagem de Mina (DM) real utilizando os subprodutos trub e glicerol bruto como fontes de doadores de elétrons.

2.2 *Objetivos específicos*

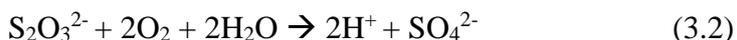
O desenvolvimento de estratégias de adaptação e operação do tratamento de DM com trub e com GB se deu por meio da investigação dos efeitos destes substratos na eficiência de remoção de poluentes e das características do inóculo, os quais são elencados nos seguintes objetivos:

- Comparar os subprodutos trub e GB com etanol e GP como doadores de elétrons no tratamento biológico de DM em reatores em batelada;
- Avaliar os efeitos da DM e de cada substrato sobre o inóculo;
- Promover um modo de operação reduzir o tempo de partida dos reatores;
- Propor um método de operação em batelada nos quais o sistema anaeróbio não seja limitado por acúmulo de intermediários metabólicos;
- Avaliar a concentração de carboxilatos no efluente da etapa sulfetogênica;
- Avaliar o pós-tratamento do efluente da etapa sulfetogênica com produção de metano.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Drenagem de Mina

A Drenagem de Mina (DM) tem origem a partir de atividades mineradoras que expõem e aumentam a superfície de contato de minérios associados à sulfetos à presença de água, oxigênio e microrganismos quimiolitotróficos. A primeira etapa que origina a DM consiste na oxidação de pirita (Fe_2S) ou outros sulfetos metálicos a tiosulfato (reação 3.1). Espécies de Bactérias e *Archaeas* oxidam o tiosulfato ou outras moléculas inorgânicas de enxofre e enxofre elementar com produção de sulfato (reação 3.2).



Os prótons H^+ produzidos são responsáveis pelo abaixamento de pH, que faz com que a drenagem solubilize elementos potencialmente tóxicos contidos no solo e nas rochas agravando o problema na qualidade da água, nos ecossistemas aquáticos, além da contaminação de aquíferos (MATOS *et al.*, 2018). Porém, nem todas as DM são ácidas. Minerais de carbonato e fosfato, como calcita [CaCO_3] e hidroxilapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] também podem estar presentes nos resíduos de mineração (LANGMAN *et al.*, 2019). Estes minerais são geradores de alcalinidade, o que pode conferir aumento de pH. Uma drenagem de mina pode ter desde uma composição neutra, salina ou ácida, o pH pode variar entre menor que 1 até maior que 9 (PRICE *et al.*, 2009). Mesmo em pH elevado, íons metálicos reduzidos como Fe^{2+} e Mn^{2+} podem permanecer em solução (MILLER *et al.*, 2010).

Os elementos potencialmente tóxicos mais comuns encontrados na DM são As, Pb, Al, Cd, Zn, Cu e Cr (HAN *et al.*, 2017). O ferro costuma ser o metal mais abundante e comumente encontrado na DM. No Brasil, o metaloide arsênio (As) é um problema em potencial por ser abundante no extrato geológico de algumas regiões, com destaque em Minas Gerais. As fontes mais comuns de arsênio são o trissulfeto de arsênio (As_2S_3), realgar (AsS) e arsenopirita

(FeAsS), muitas vezes associados a metais de interesse comercial como prata, ouro e cobre. O padrão geológico do minério fonte de extração de ouro é marcado pela forte presença de arsenopirita em diversas minas brasileiras como em Crixas (GO), Morro de Ouro em Paracatu (MG), Ouro Preto (MG) e na Fazenda Brasileiro (BA). O rejeito proveniente da mineração nestes locais é rico em arsênio, demandando atenção e tratamento adequado dos mesmos (DESCHAMPS *et al.*, 2002; BORBA *et al.*, 2004).

A velocidade de geração, liberação, mobilidade e atenuação da drenagem ácida de mina são processos complexos governados por uma combinação de fatores físicos, químicos e biológicos como pH, temperatura, presença de oxigênio e água, atividade química do Fe^{3+} , superfície de contato dos sulfetos metálicos ou presença de microrganismos, tipos de *commodity*, método de depósito e processamento. A composição e pH da DM varia também de acordo com os estratos geológicos das áreas de mineração. Os ambientes receptores podem ainda alterar as características originais da descarga da mina mediante uma combinação de processos físicos, químicos e biológicos (PRICE *et al.*, 2009).

Além da composição química do mineral sulfetado, há também a influência da composição biológica dos resíduos da mineração na rota e velocidade de oxidação que pode aumentar de 4 a 50 vezes (JOHNSON; HALLBERG, 2005). Alguns microrganismos quimiolitotróficos acidófilos catalisam a geração de DM pela geração do íon férrico ou bactérias como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* e *Leptospirillum ferriphilum* que oxidam o enxofre elementar em sulfato (KEFENI *et al.*, 2017). *Thiobacillus*, *Metallogenium* e *Sulfolobus*, *Sphaerotilus natans* e *Gallionella ferrugínea* também podem atuar como catalisadoras (UMRANIA, 2003).

Quanto à distribuição deste passivo ambiental no mundo, podem ser encontrados relatos de ocorrência de DM tanto em países de grande tradição mineradora como Canadá, EUA, África do Sul, Austrália, Chile, Peru e Brasil (PRICE *et al.*, 2009; MELLO, 2006), quanto em países com diminuta atividade mineral ou atividade mineral associada a épocas passadas como Suécia, Espanha, Alemanha, Portugal (GUSTAFSSON *et al.*, 1999; ESPAÑA *et al.*, 2005; WISOTZKY; LENK, 2006), bem como de países asiáticos como Índia e Coreia do Sul (CHOUDHARY; SHEORAN, 2011; SHIM *et al.*, 2015).

No Brasil, os relatos de DM são mais recentes e o levantamento da ocorrência é incompleto já que muitas se encontram em minas desativadas e abandonadas, dificultando o controle. A

Fundação Estadual de Meio Ambiente (FEAM, 2016) mapeou e construiu um cadastro com 400 minas paralisadas e abandonadas no estado de Minas Gerais. O levantamento é parcial e manifesta que o número não corresponde à totalidade. Santa Catarina é provavelmente o estado com maior ocorrência de DM e um dos poucos para os quais dados oficiais estão disponíveis. Um levantamento realizado pela Associação Beneficente da Indústria Carbonífera de Santa Catarina – SATC, em parceria com o Serviço Geológico do Brasil – CPRM, mostrou que existem 809 minas abandonadas, sendo que 192 destas geram drenagem ácida (SILVAS *et al.*, 2011).

A DM é composta por poluentes que oferecem riscos direta e indiretamente aos ecossistemas e à saúde humana e tem ampla ocorrência em todo o mundo. Até o meio do século passado não havia legislação, conseqüentemente, fiscalização dos impactos ambientais e à saúde humana trazidos pela atividade mineradora. Rejeitos de baixo valor agregado e estéreis eram descartados sem critério (NASCIMENTO, 1998). Tais fatores trazem grande significância às pesquisas que tratam da prevenção, controle e tratamento da DM. Embora a prevenção da geração de drenagem de mina seja prioritária, em muitos casos, a drenagem é inevitavelmente gerada, visto que a prevenção não foi inserida no planejamento da mineração e uma vez que a mesma é gerada ela precisa de tratamento.

3.2 Tratamento convencional e o tratamento biológico com bactérias redutoras de sulfato

Atualmente o principal mecanismo de tratamento utilizado é baseado em processos físicos e químicos, mediante aeração para oxidação do íon ferroso ou adição de reagentes alcalinos para neutralização de acidez e precipitação de íons metálicos da solução aquosa. Este mecanismo de tratamento gera subprodutos de difícil disposição e com limitada eficiência quanto à remoção de poluentes solúveis (KEFENI *et al.*, 2017). Os aditivos químicos como os hidróxidos utilizados para neutralização encarecem o tratamento físico-químico da DM (JOHNSON; HALLBERG, 2005). O lodo metálico gerado no tratamento passivo com reagentes químicos, como hidróxido de sódio ou cal, é altamente volumoso e solúvel, podendo assim retornar ao ambiente se não for disposto adequadamente (SIMATE; NDLOVU, 2014). Este tratamento proporciona a precipitação de elementos trivalentes. Para precipitação eficiente de metais divalentes é necessário que o sistema de tratamento químico atinja valores de pH entre 8 e 10.

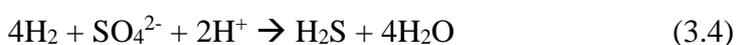
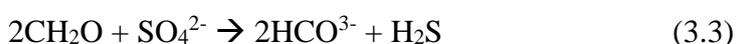
Além disso, recursos metálicos potencialmente úteis e valiosos não podem ser recuperados após a remediação química (NANCUCHEO; JOHNSON, 2014).

Na natureza existem microrganismos que atuam no ciclo do enxofre. O íon sulfeto pode ser incorporado a aminoácidos e enzimas, oxidados por bactérias quimiolitotróficas. O sulfato pode ser utilizado como nutriente, ou reduzido dissimilativamente para obtenção de energia (LENS; KUENEN, 2001). O tratamento biológico de DM ocorre mediante redução dissimilativa de sulfato por bactérias redutoras de sulfato (BRS). O método não demanda adição contínua de insumos neutralizantes e um dos seus grandes potenciais está na possibilidade de utilização de materiais orgânicos disponíveis no meio ambiente, inclusive podendo ser aplicado como co-tratamento de resíduos orgânicos (KEFENI *et al.*, 2017). O potencial do tratamento biológico da DM em reatores anaeróbios envolvendo BRS é historicamente registrado na literatura (HERLIHY; MILLS, 1985). Este método é considerado como promissor para DM pelo potencial de remover o sulfato dissolvido simultaneamente à geração de alcalinidade, precipitação e recuperação de metais. Se comparado ao tratamento químico em reatores sob pressão e sob agitação, o tratamento biológico é mais econômico por usar pressão e temperatura ambientes e tanques de agitação convencionais (JAMIL; CLARKE, 2013). Por apresentarem *start-up* lentos, é usual que os biorreatores sulfetogênicos recebam inicialmente DM diluída, como estratégia para acelerar a adaptação da biomassa. Gradativamente a diluição é diminuída até que toda a vazão que alimenta o reator seja composta de DM (SKOUSEN *et al.*, 2017).

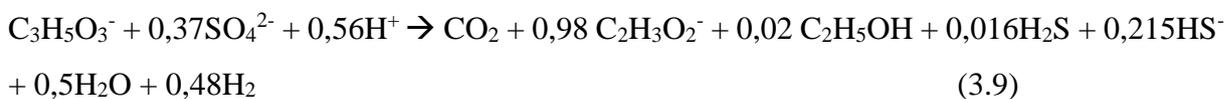
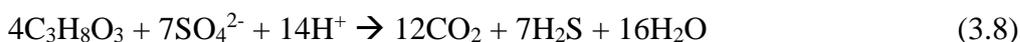
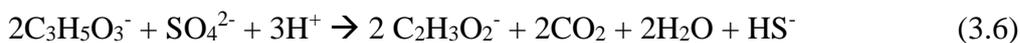
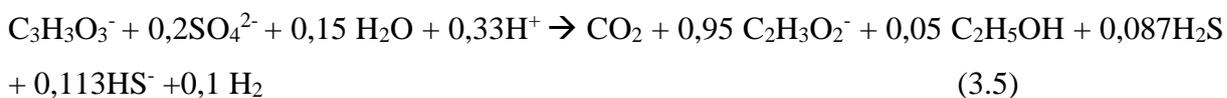
O consórcio anaeróbio é bastante diversificado, composto de Bactérias e *Archaeas*, divididas quanto ao metabolismo entre hidrolíticas, fermentativas, acidogênicas, acetogênicas, metanogênicas e sulfetogênicas (HWANG *et al.*, 2018). Embora as espécies metanogênicas sejam competidoras das BRS pelos mesmos tipos de substratos, este grupo é importante para manutenção de uma pressão parcial de H₂ adequada para atuação do consórcio. Este papel tem importância ainda maior quando o sistema conta com excesso de doador de elétrons e substratos contendo moléculas de alta massa molar para evitar o acúmulo de ácidos orgânicos (CHERNICHARO, 2016).

As BRS são as espécies sulfetogênicas que possuem a capacidade de usar sulfato como aceptor final de elétrons, oxidando produtos metabólicos das demais espécies do consórcio. As Reações 3.3 e 3.4 exemplificam a redução de sulfato realizadas com metanol e H₂ como doadores de elétrons respectivamente. Sete linhagens filogenéticas compõem o grupo das BRS, cinco delas

pertencentes ao Domínio Bactérias e dois pertencentes ao Domínio *Archaea*. A maioria das espécies de BRS estão distribuídas entre 23 gêneros da família δ -Proteobacteria (MUYSER; STAMS, 2008). São exemplos de BRS *Desulfotomaculum carboxydivorans*, *Desulfotomaculum solfataricum*, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Desulfotomaculum australicum*, *Desulfotomaculum thermoacetoxidans*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter* (HAO *et al.*, 2014), *Desulfovibrio fructosovorans*-HAQ2 e *Desulfovibrio piger*-HAQ6 (HUSSAIN; QAZI, 2016) e *Desulfotomaculum acetoxidans* (PAPIRIO *et al.*, 2013).

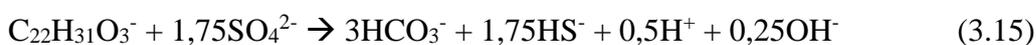
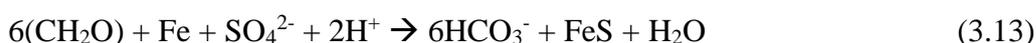
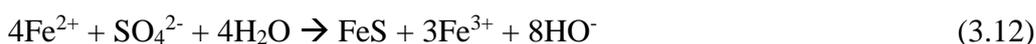


De modo geral o tratamento de DM com redução de sulfato promove elevação do pH mediante liberação de íons HCO^{3-} somado ao consumo de prótons durante a redução de sulfato (FALAGÁN *et al.*, 2017). O aumento de pH ocorre via redução de sulfato com oxidação de algumas moléculas com consumo de H^+ , exemplificado pelas Reações 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9 (MENERT *et al.*, 2004). Quando o sistema age em pH acima de 5, parte do sulfeto produzido encontra-se na forma dissociada, o qual age como receptor de prótons em solução (reação 3.10) (GODOI *et al.*, 2017).





As BRS possuem capacidade de metabolizar uma grande variedade de doadores de elétrons, desde H_2 , ácidos carboxílicos, álcoois, açúcares, compostos aromáticos, monóxido de carbono, metano (reação 3.11) (HAO *et al.*, 2014) e aminoácidos (QATIBI *et al.*, 1991). O ferro metálico também pode ser doador de elétrons para redução de sulfato com cinética mais acelerada do que utilizando H_2 (reações 3.12 e 3.13) (DINH *et al.*, 2004). Outras reações da digestão anaeróbia pelas BRS são apresentadas pelas reações 3.14 a 3.16 (MENERT *et al.*, 2004).



O sulfeto, H_2S (g), produzido na redução de sulfato tem afinidade química com alguns cátions metálicos, usualmente metais com estados de oxidação +2, tais como Zn, Fe, Cu, Ni e Cd, precipitando-os na forma de sulfetos metálicos (Equação 3.17), os quais possuem baixa solubilidade em uma ampla faixa de pH (CHOUDHARY; SHEORAN, 2012). Alguns metais e metaloides podem ser reduzidos por espécies presentes no consórcio microbiano anaeróbio utilizando uma fonte de elétrons. A redução destes elementos proporciona estados de oxidação que possibilitam precipitação como sulfetos metálicos. Por exemplo, o Fe^{3+} pode ser reduzido por *Geobacter* (MOLLAEI *et al.*, 2017) e o As^{5+} pelas “*Dissimilatory As reducing bacteria*” (DARB) (RODRIGUEZ-FREIRE *et al.*, 2015). A precipitação de sulfetos metálicos torna os metais e metaloides biologicamente indisponíveis, eliminando sua ação tóxica (RODRIGUEZ-FREIRE *et al.*, 2015). A Figura 3.1 descreve o ciclo biogeoquímico de formação de sulfetos

minerais de arsênio, aqui representado pelo As_2S_3 . Algumas espécies apresentam capacidade de utilizarem SO_4^{2-} e As^{5+} como receptores de elétrons, como *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 (AHMANN *et al.*, 1994), a *Desulfomicrobium sp.* str. Ben-RB e a *Desulfovibrio sp.* str. Ben-RA (MACY *et al.*, 2000)

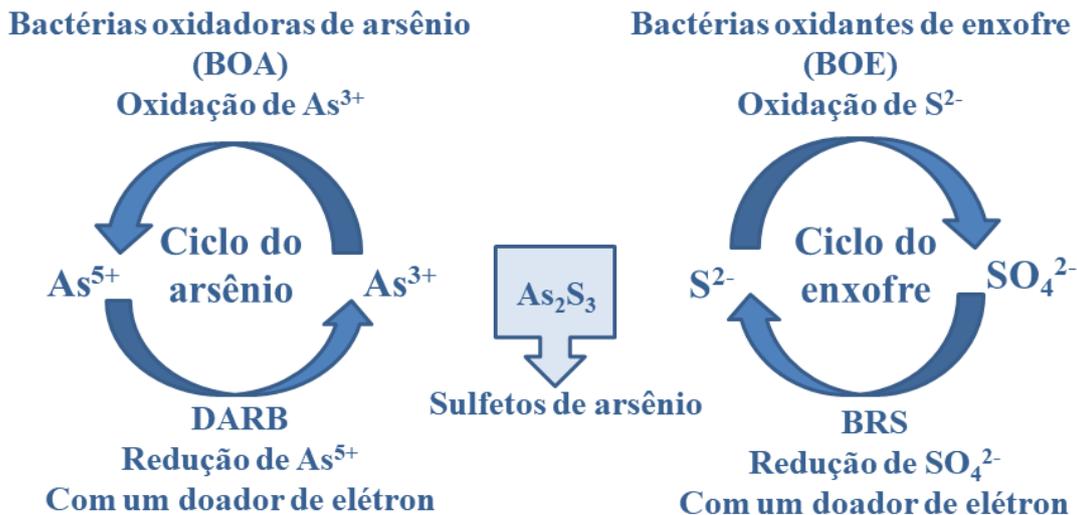


Figura 3.1 - Interação dos ciclos de arsênio e enxofre como forma de imobilização destes elementos. Fonte: Adaptado de Rodriguez-Freire *et al.* (2014).

Parte da alcalinidade produzida nas reações de redução de sulfato é consumida pelas reações de precipitação de alguns sulfetos metálicos devido à formação de prótons. A precipitação dos sulfetos metálicos também exerce o controle de odor e corrosão pelo sulfeto de hidrogênio (KEFENI *et al.*, 2017). A formação dos sulfetos metálicos depende da concentração de íons metálicos, íons sulfeto, potencial de oxirredução e principalmente do pH (NANCUCHEO; JOHNSON, 2014). O controle destes fatores pode ser manipulado para precipitação seletiva visando recuperação dos metais de interesse (HEDRICH; JOHNSON, 2014).

O fato de se tratar de um grupo bastante heterogêneo, confere a capacidade de adaptação das BRS a condições bastante distintas. Culturas deste consórcio foram isoladas de diferentes ambientes, como psicrófilos, hipertermófilos, em baixas concentrações de cloreto de sódio (NaCl), hipersalinos e sedimentos marinhos (DOLLA *et al.*, 2006; HAO *et al.*, 2014). A capacidade deste consórcio de atuar em diferentes meios devido diversidade de espécies e

possíveis rotas metabólicas revelam potencial para ser explorado segundo diferentes objetivos. O tratamento biológico de DM não precisa ficar então restrito a sistemas que fazem uso de doadores de elétrons puros, sendo aplicáveis à co-tratamento com subprodutos de natureza oposta, ricos em matéria orgânica. Para explorar esta capacidade, os fatores que exercem influência no metabolismo das BRS devem ser conhecidos, conforme será discutido na sessão 3.2.1.

3.2.1 Fatores intervenientes no metabolismo das BRS

Um conjunto de variáveis no meio influenciam na remoção de sulfato. Dev *et al.* (2017) fizeram um estudo em que foram classificadas algumas variáveis aplicadas à reatores anaeróbios de leito fixo quanto a sua relevância para a eficiência da sulfetogênese. Nesta avaliação o pH foi considerado o fator mais influente, seguido do volume de substrato em relação ao volume de DM, concentração de sulfato, o Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) e, por último, a DQO. No estudo foi utilizada DM de mina de carvão e a melhor combinação destas variáveis foi pH 7, 20% (v/v), 1500 mg.L⁻¹ de sulfato, 48 h de TDH e 2300 mg.L⁻¹ de DQO. A influência do oxigênio dissolvido não foi considerada na avaliação de Dev *et al.* (2017). A temperatura influencia na diversidade de espécies do consórcio e na solubilidade de compostos tóxicos, como H₂S, que apresenta menor solubilidade em altas temperaturas (JAMIL, CLARKE, 2013). Não existe um consenso sobre as condições ideais para o tratamento e a tolerância do consórcio na literatura. Ainda assim, é válido o conhecimento e avaliação do que já foi afirmado sobre o efeito das variáveis sobre diferentes tratamentos de DM com BRS realizados, os quais são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Parâmetros operacionais ideais e de tolerância para as BRS.

	Ideal	Tolerância
Temperatura (°C)	28 a 32 ¹ ; 35 ¹³	-5 a 75 ¹
DQO/SO ₄ ²⁻	Oxidação priorizada	0,6 a 1,2 ¹
	Redução de sulfato priorizada	2,4 a 4,8 ¹
	Tratamento completo	1,5 ² ; 1 ^{5, 6, 14} ; 3 ⁷ ; 7 ¹³
TDH (h)	20-30 ¹ ; 15 ⁵ ; 16 ¹⁴	5,1h ¹⁰ - 360 ⁹
pH	6,8-7,2 ^{8e12} ; 4 ⁵ ; 8,5 ¹³	2,5-3 ^{2;11} , 5 ¹⁰

DQO: demanda química de oxigênio; TDH: tempo de detenção hidráulica; ¹Hao *et al.* (2014); ²Dev *et al.* (2017); ³Silva *et al.* (2002); ⁴Hu *et al.* (2015); ⁵Vieira *et al.* (2016); ⁶Rodriguez (2010); ⁷ Matos *et al.* (2018); ⁸Hussain; Qazi (2016); ⁹Martins *et al.* (2010); ¹⁰Jamil; Clarke (2013); ¹¹Bertolino *et al.* (2014); ¹²Nagpal *et al.* (2000); ¹³Mora *et al.* (2018); ¹⁴Cunha *et al.* (2020).

O estabelecimento de condições adequadas ou que permitam maximizar a eficiência na remoção de sulfato é dificultado pela diversidade de variações que podem ocorrer no sistema. O inóculo anaeróbico é composto por grande diversidade de espécies e cada condição pode favorecer diferentes grupos e rotas metabólicas. A composição das DMs varia grandemente e para cada tipo de substrato condições distintas devem ser adotadas. Ainda assim, o estabelecimento do que já foi registrado é útil para que seja considerado nos ajustes de um modo de operação segundo os recursos (técnicos e materiais) disponíveis e objetivos.

3.2.1.1 Oxigênio dissolvido

Apesar de ser um grupo estritamente anaeróbico, as BRS apresentam alguma resistência ao oxigênio, podendo ser encontradas ativas em condições temporariamente aeróbias, criando estratégias como o deslocamento dos organismos para regiões anóxicas, criação de microambientes anóxicos mediante a granulação e sistemas enzimáticos que fazem a redução e eliminação do oxigênio dissolvido. Na pesquisa de Vieira *et al.* (2016) por exemplo, apesar de não haver aeração, o reator passava por condições periódicas de aeração nas trocas de efluente tratado por nova DM, além de não apresentar vedação completa, foi capaz de manter uma

eficiência satisfatória na redução de sulfato. Mora *et al.* (2018) concluiu que a presença de oxigênio tornou a sulfetogênese mais lenta, porém de forma geral houve favorecimento da sulfetogênese em detrimento da metanogênese. A conclusão ocorreu mediante a diminuição da produção de biogás, que indica inibição da acetogênese e ou metanogênese, enquanto a sulfetogênese continuou em vigor.

3.2.1.2 Tempo de detenção hidráulica (TDH)

Não existe consenso acerca do TDH, variando inclusive entre pesquisas com o mesmo substrato ou substratos de recalcitrância correlata. Os valores podem ser consultados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Variações no TDH em reatores de remoção biológica de sulfato.

TDH (h)	Substrato	Reator	Referência
5,1	Etanol	Leito fluidizado	Nagpal <i>et al.</i> (2000)
15	Etanol	Batelada	Vieira <i>et al.</i> (2016)
16	Etanol	Leito fluidizado	Cunha <i>et al.</i> (2020)
10	Lactato	Leito fluidizado	Bertolino <i>et al.</i> (2012)
240	Glicerol	Leito estruturado	Matos <i>et al.</i> (2018)
48	Extrato resíduo marinho	Leito fixo	Dev <i>et al.</i> (2017)
16	Vinhaça	Leito fixo-estruturado e fluxo descendente	Nogueira <i>et al.</i> (2019)

O TDH ideal varia conforme o substrato, configuração operacional e de mistura, matriz imobilizadora e objetivo do tratamento (HAO *et al.*, 2014). Culturas puras demandam maiores valores de TDH na degradação de substratos complexos, conforme aplicado por Hussain e Qazi (2016). É possível que o aumento na concentração de sulfato permita que mais sulfato seja reduzido ao longo do tempo. Na pesquisa de Cunha *et al.* (2020), um aumento na concentração de sulfato de 500 para 2250 mg.L⁻¹ permitiu um aumento na eficiência de remoção de sulfato e a diminuição do TDH de 24 para 16h. Isso deve se dar pelo favorecimento das BRS na

competição com as metanogênicas. Porém, com substrato complexo, em 16h Nogueira *et al.* (2019) promoveram tratamento de DM com 1000 mg.L⁻¹ de sulfato. O tempo de degradação do substrato em moléculas acessíveis às BRS deve ser considerado juntamente com a concentração de sulfato na definição do TDH.

3.2.1.3 Relação entre doador e receptor de elétrons

Na oxidação da matéria orgânica com redução de sulfato, a cada molécula de íon sulfato, 8 elétrons são transferidos. Sendo a capacidade de uma molécula de O₂ de receber 4 elétrons, 2 mol de O₂ equivalem a 1 mol de SO₄²⁻ em termos de transferência de elétrons. Isso confere uma proporção de 0,67g de O₂ para cada grama de SO₄²⁻. Sendo assim, em uma mistura com relação DQO/SO₄²⁻ de 0,67 na qual toda a matéria orgânica fosse oxidada, teoricamente proporcionaria elétrons suficientes para redução completa do sulfato presente de acordo com a equação da redução anaeróbia de sulfato (Reação 3.18) (LENS *et al.*, 1998). Porém, na prática existe muita divergência quanto a proporção entre o doador de elétrons e a concentração de sulfato ideal para o tratamento de águas ricas em sulfato.



Para tratamento utilizando resíduos e efluentes como fonte de elétrons, a quantidade de substrato fornecida estará relacionada além da concentração de C, também com a de N e P. Dev *et al.* (2017), atuando com extrato de resíduo marinho, concluem que quando pequenas quantidades de substrato são utilizadas, a quantidade de nutriente fornecida pode ser insuficiente para a manutenção do consórcio microbiano. Por outro lado, quando o substrato é adicionando em excesso, pode haver acúmulo de ácidos orgânicos e amônia, prejudicando a eficiência do tratamento. Por este motivo, a relação nutricional deve ser revisada para cada tipo de sistema a ser utilizado, quanto ao reator, inóculo, efluente como fonte de elétrons e o efluente que contém o receptor de elétrons.

A relação estequiométrica para redução de sulfato é de 0,67, no entanto, Rodriguez (2010) e Vieira *et al.* (2016), observaram que o excesso de elétrons pode favorecer o tratamento de DM. A quantidade de DQO consumida é maior do que a quantidade necessária para redução de

sulfato obtida. Na pesquisa de Vieira *et al.* (2016), a disponibilidade de doador de elétrons era o fator limitante da redução de sulfato, com interrupção da remoção de sulfato com o consumo completo da DQO sob relação DQO/SO₄²⁻ de 1. O excesso de elétrons que foi consumido pode ter sido destinado à produção de H₂ e metano. A redução de alguns íons metálicos de ferro, zinco e arsênio também pode ser uma rota metabólica de consumo de matéria orgânica. Devido a diversidade da composição química da DM e do consórcio microbiano, vias metabólicas não sulfetogênicas de oxidação do substrato podem ocorrer. Nem todas elas são desfavoráveis ao tratamento, e por isso a maioria das pesquisas realizadas e aqui apresentadas (DEV *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2020; MATOS *et al.*, 2018; MORA *et al.*, 2018) atuam em relações DQO/SO₄²⁻ acima da relação estequiométrica de redução de sulfato.

Outros fatores também podem influenciar na definição da relação DQO/SO₄²⁻ utilizada no tratamento. Menores valores podem ser mantidos com objetivo de minimizar a geração de metano (CORBETT, 2001). A relação DQO/SO₄²⁻ também pode modificar os efeitos de inibição de alguns tóxicos. Matos *et al.* (2018) ressaltaram que os efeitos inibidores de íons como As^{III} são maiores em menores relações DQO/SO₄²⁻. A relação DQO/SO₄²⁻ ideal também depende da fonte de carbono. A presença de substâncias recalcitrantes no substrato pode levar a conclusões errôneas acerca do efeito da relação DQO/SO₄²⁻, caso ele seja medido em TDH inferior ao necessário para degradação destas moléculas em moléculas disponíveis para as BRS. Ao utilizar substratos ricos em moléculas de elevada massa molar, além de utilizar maiores relações DQO/SO₄²⁻, pois nem toda DQO estará disponível à redução de sulfato, é necessário promover estratégias para evitar acúmulo de ácidos orgânicos intermediários e H₂, e considerar a necessidade de polimento para a possível DQO residual ocorrida no efluente.

3.2.1.4 pH

O pH influencia fortemente na atividade microbiana - crescimento, competição e diversidade, espécies orgânicas dissolvidas, tal como a solubilidade dos sulfetos metálicos. Sob baixo pH, a concentração de prótons, ácidos orgânicos e sulfeto afetam a redução de sulfato. Em baixo pH os microrganismos desviam energia disponível para o crescimento, no bombeamento ativo de prótons para fora da célula (SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Quanto aos ácidos orgânicos, 50% do lactato por exemplo, em pH 3 encontra-se na forma ácida e o ácido láctico pode se difundir nas células, implicando também em perda energética no bombeamento de prótons. Em pH inferior

a 4,75, a forma dominante do acetato é o ácido acético, altamente tóxico para a maioria dos microrganismos, incluindo os acidófilos. Foi obtido 50% de inibição de crescimento em uma cultura BRS mista em pH 6,2, com 0,9 mmol.L⁻¹ de ácido acético não dissociado com concentração total de 25 mmol.L⁻¹ (REIS *et al.*, 1990). Porém, acetato pode ser consumido mediante atividade metanogênica.

O sulfeto em pH baixo se encontra na forma H₂S, a forma que tem passagem pela membrana celular, sendo então inibidora. O sulfeto pode se combinar com ferro, citocromo ou compostos contendo metais, afetando suas funcionalidades no metabolismo. As espécies metanogênicas podem ser mais afetadas pela maior quantidade de H₂S do que as BRS (OMIL *et al.*, 1996). O pH também influencia na forma com que metais estejam em solução, podendo influenciar inclusive na sua toxicidade. As concentrações em mg.L⁻¹ de Cu, Cd, Ni, Zn, Cr, Pb e Hg a partir das quais ocorre toxicidade para as BRS são respectivamente: 2; 4; 10; 13; 60; 75; 74 (JAMIL; CLARKE, 2013).

Em contraponto às desvantagens do baixo pH, a energia livre de Gibbs da redução de sulfato em baixos pHs é maior, permitindo assim a reprodução das células nesta condição. Outros mecanismos como expulsão de vesículas contendo H⁺ e o aproveitamento da força motriz do deslocamento de prótons para produção de ATP podem ocorrer (SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Existem espécies de todos os grupos que realizam as diferentes etapas da digestão anaeróbia que podem resistir ao baixo pH, incluindo metanogênicas e sulfetogênicas, e serem favorecidas por ele. Ou seja, a seleção de espécies adaptadas a baixos valores de pH e a manutenção da digestão anaeróbia nesta condição é plausível (SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

3.2.2 Co-tratamento utilizando BRS: DM e diferentes fontes de carbono

A escolha do doador de elétrons é dependente do objetivo da aplicação do sistema e das variáveis mais importantes em cada caso, dentre elas a disponibilidade, o custo, a maior ou menor geração de acetato, a existência de competição com as *Archaeas* metanogênicas e a geração de alcalinidade. Além disso, o processo é diretamente influenciado pelo tipo de reator, tipo de inóculo, concentração de sulfato e de elementos potencialmente tóxicos, temperatura de operação, pH e TDH (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

Inicialmente a maior parte das pesquisas envolvendo tratamento biológico da DM envolveram o uso de meio sintético e doador de elétrons puro e com valor de mercado, dentre os que se destacam H₂, lactato, propionato, acetato, glicerol e etanol. Diferentes fontes de carbono são sugeridas dependendo do objetivo, como lactato e propionato para alta produção de biomassa, produção de energia e geração de alcalinidade. Porém, como o consórcio BRS é muito diverso, diferentes substâncias podem servir como respectivo doador de elétron para cada metabolismo particular e uma mistura de doadores de elétrons é recomendada para o crescimento do consórcio de BRS em que o resíduo metabólico de uma espécie se torna substrato de outra (NECULITA *et al.*, 2008). A capacidade das culturas mistas anaeróbias na degradação de substratos complexos é explorada também para produção de metano e carboxilatos (PERIMENIS *et al.*, 2018).

Diante da capacidade das BRS em oxidar uma grande variedade de substratos, a associação com outros grupos microbianos para utilização de doadores de elétrons mistos passou a ser encarada como possibilidade de tratamento simultâneo de drenagens ricas em sulfato e metais com resíduos orgânicos, proporcionando até mesmo maiores eficiências de remoção de sulfato e metais (MUHAMMAD *et al.*, 2015).

Quando a concentração de sulfato é suficiente, as BRS não interrompem a geração de sulfeto devido à competição pela fonte de carbono, ainda que em altos valores de DQO. Inclusive, a decomposição de longas cadeias de carboidratos e outras moléculas de alta massa molar promovida por sintrofia entre espécies hidrolíticas, acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas acetoclásticas favorece as BRS em ambiente com variedade de substrato orgânico (JAMIL; CLARKE, 2013).

Muitos efluentes orgânicos e DM possuem perfis opostos e complementares do ponto de vista de possíveis sistemas de tratamento combinados para ambos (STROSNIDER *et al.*, 2013). Em relação aos tratamentos convencionais de resíduos orgânicos, o uso de DM pode reduzir a produção de lodo e geração de gases de efeito estufa, além de oferecer um receptor de elétrons que dispensa energia com aeração (SMYNTEK *et al.*, 2018). O uso de resíduos orgânicos como doador de elétrons para tratar DM elimina o custo de produção ou compra de fontes de carbono puras. Além do custo financeiro, elimina-se o custo ambiental referente ao recurso natural usado como matéria prima e a geração de poluentes no processo de fabricação.

No caso do co-tratamento, os efluentes contendo matéria orgânica diluem a DM, minimizando toxicidade e possíveis choques de cargas causadas pela composição da DM. Resíduos ricos em celulose, como casca de nozes e aparas de madeira, também auxiliam no controle da compactação da biomassa e, conseqüentemente, de curtos-circuitos, por favorecer a permeabilidade (SKOUSEN *et al.*, 2017). Dentre os custos do tratamento biológico de DM, destaca-se o aporte de nutrientes necessário à atividade microbiana (SANTOS; JOHNSON, 2018). No co-tratamento com efluentes orgânicos essa demanda pode ser suprida com elementos que geralmente são considerados nesses meios como poluentes devido à alta concentração (DEV *et al.*, 2017).

Os resíduos orgânicos também proporcionam a condição redox adequada às bactérias anaeróbias facultativas que degradam os materiais orgânicos recalcitrantes em formas mais lábeis para uso pelas BRS (WENDT-POTTHOFF; NEU, 1998). Quando fornecida uma gama de matéria orgânica com diferentes níveis de degradabilidade, o fornecimento de carbono é estendido a longo prazo. Dentre fontes imediatas de carbono e matéria orgânica complexa recalcitrante, diferentes microrganismos são favorecidos, selecionando, por exemplo, microrganismos que reduzem sulfato, Fe^{3+} ou As^{5+} , com diferentes prioridades dadas pela termodinâmica ou mecanismos de imunidade contra toxicidade, orientando a formação de diferentes produtos (MATOS *et al.*, 2018). A fonte de carbono parcialmente degradada supre a demanda essencial do biotratamento passivo (REISMAN *et al.*, 2003).

Iniciar o tratamento biológico por bioativação do consórcio microbiano com uma fonte de carbono simples e facilmente degradável como lactato e em seguida substituí-la por fonte de carbono mista foi recomendado por Beaulieu *et al.* (2000) para melhorar a eficiência da redução de sulfato. Carbono celulósico que não é degradado por culturas puras pode ser utilizado em consórcios microbianos que são capazes de degradar substratos complexos de modo sintrófico (HUSSAIN; QAZI, 2016 e GIBERT *et al.*, 2004). O co-tratamento de DM com resíduos orgânicos é promissor. A escolha do substrato doador de elétrons é bastante peculiar a cada caso, quanto a composição da DM, a logística do encontro entre os efluentes que irão contribuir com os doadores e os receptores de elétrons, e o objetivo principal do tratamento.

3.2.2.1 Tratamento biológico de DM com glicerol bruto

O uso de biodiesel em substituição aos combustíveis fósseis é crescente, especialmente na Alemanha, EUA, França, Brasil e países asiáticos (ALBUQUERQUE, 2014). Para cada unidade de biodiesel sintetizado, é produzido de 10-20% de glicerol impuro como subproduto (QUISPE *et al.*, 2013). Em média, 10% da massa de açúcar utilizada, são gerados de glicerol. O glicerol pode causar graves impactos ambientais se descartado sem tratamento adequado. Além de subproduto da geração de biodiesel, o glicerol é gerado na fabricação de sabão e outros produtos de limpeza. Embora existam aplicações para o glicerol, não tem ocorrido destinação definida pelas plantas produtoras, e assim, com maior disponibilidade do que aplicações, o glicerol bruto é considerado resíduo (ALBUQUERQUE, 2014). Abre-se um amplo campo de pesquisa para aumentar as possibilidades de uso deste produto, especialmente na geração de energia (QUISPE *et al.*, 2013), como da produção de biogás (ANDRIAMANOHIARISOAMANANA *et al.*, 2018), H₂ (KUMAR *et al.*, 2015), etanol, conversão em lipídios e subsequentemente em biodiesel (ZHANG *et al.*, 2016).

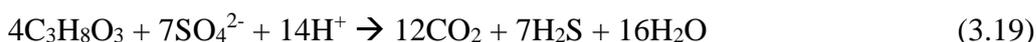
A mistura de glicerol bruto proveniente da indústria de biodiesel consiste em glicerol acrescido de impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual (ALBUQUERQUE, 2014), metanol e ácidos graxos livres (MORA *et al.*, 2018). O teor de glicerol no subproduto varia de acordo com a matéria prima. Segundo Chou e Su (2019), o GB pode ser composto de 50 a 60% de glicerol, 12 a 16% de álcalis, especialmente na forma de sabões e hidróxidos alcalinos, 15 a 18% de ésteres metílicos, 8 a 12% de metanol, 2 a 3% de água e outros componentes. Proveniente da produção com sementes de mostarda, o teor de glicerol é de 62% de média, com óleo de soja 67,8% do subproduto. O glicerol desmetilado apresenta maior proporção de glicerol (70-88%) e menor de metanol (<1%) em relação ao glicerol metilado com valores de 50-70% e 10-20%, respectivamente (QUISPE *et al.*, 2013). O GB usado por Albuquerque (2014) apresentou em g.L⁻¹, 634,86 de glicerol, 612,1 de lipídios, 23,2 de proteínas e 11,4 de carboidratos.

O glicerol já foi amplamente investigado como doador de elétrons na redução de sulfato como tratamento de DM (BERTOLINO *et al.*, 2012; SANTOS; JOHNSON, 2018; MATOS *et al.*, 2018; FALAGÁN *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2014). O potencial do glicerol para esta aplicação é confirmado perante inúmeras variações do sistema. Entretanto, raramente o glicerol bruto, abundante subproduto da crescente indústria de biodiesel é aplicado nas pesquisas. A complexidade da porção não glicerol desta mistura pode conferir interferências

no sistema de tratamento, as quais permanecem como lacunas de conhecimento sobre seu uso junto às BRS. As pesquisas que utilizam o glicerol bruto na redução de sulfato, que serão detalhadas a seguir (ZAMZOW *et al.*, 2007; MORA *et al.*, 2018; SANTOS; JOHNSON, 2018; SANTOS *et al.*, 2015; BEHROOZ *et al.*, 2012), fornecem dados importantes sobre a atuação deste consórcio microbiano, porém não se aplicam às condições de tratamento de DM por terem outros objetivos.

Algumas moléculas orgânicas presentes no GB podem promover inibição do consórcio microbiano, como aldeídos, acroleína e formaldeído, assim como metais e sais, que podem estar presentes. Porém, como o glicerol possui DQO elevada, 1122,80 g.L⁻¹ (ALBUQUERQUE, 2014), a diluição promovida com a DM para as relações DQO/SO₄²⁻ utilizadas no tratamento biológico pode tornar as concentrações destas substâncias insuficientes para inibição.

O consórcio microbiano anaeróbico contém espécies que podem fermentar o glicerol, bem como BRS que o utilizam como doador de elétrons na redução de sulfato. No meio contendo sulfato, as redutoras de sulfato devem dominar o consórcio. Mediante balanço de massa, a redução de sulfato com completa oxidação do glicerol a CO₂ (Reação 3.19) deve seguir a proporção 4:7 (glicerol:sulfato - mmol.L⁻¹:mmol.L⁻¹) enquanto a oxidação incompleta a acetato e CO₂ (Reação 3.20) ocorre na proporção 4:3 (SANTOS; JOHNSON, 2018).



O glicerol também pode ser convertido indiretamente a propionato e acetato via 1,3-propanodiol. Também pode ocorrer degradação do glicerol pela espécie *Desulfovibrio carbinolicus* à 3-hidroxi-propionato e pela *Desulfovibrio fructosovorans* diretamente a acetato (BERTOLINO *et al.*, 2012). A degradação de glicerol em pH 7 gera acetato e em pH 4, além de acetato, lactato e 1,3-propanodiol. A taxa de crescimento de bactérias degradantes de acetato é baixa, já que este é um doador de elétrons pobre fornecendo um $\Delta G = -48 \text{ KJ.mol}^{-1}$ (SANTOS *et al.*, 2017). Os autores sugerem que mais esforços sejam aplicados em selecionar espécies redutoras de sulfato que degradem os produtos intermediários para degradação completa em

CO₂. Por outro lado, a recuperação de AGV de efluentes de processos anaeróbios pode ser uma solução de polimento do mesmo (EREGOWDA *et al.*, 2018).

Na pesquisa de Qatibi *et al.* (1991) 1,3-propanodiol é produzido em pH neutro, juntamente com propionato e acetato. A produção de 1,3-propanodiol é inferior em relação à degradação de glicerol na ausência de sulfato, mas sua degradação é maior. A degradação de 1,3-propanodiol demanda um aceptor de elétrons ou atividade sintrófica com metanogênicas hidrogenotróficas. O grupo de BRS apresenta espécies fermentativas que consomem 1,3-propanodiol.

Um panorama acerca de configurações em que o GP já foi aplicado, sendo os intermediários metabólicos acumulados e o potencial deste doador de elétrons apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Condições e resultados de aplicações de GP como fonte de carbono no tratamento biológico de DM.

Remoção sulfato	DQO (mg/L)	Sulfato (mg/L)	pH	Temp. (°C)	Reator	TDH (h)	AVG acumulados (mmol/L)	Referência
90%	4034	2016	6,5	25-28	Leito fluidizado	15	11 acetato e 3,3 butirato	BERTOLINO <i>et al.</i> (2014)
26%	460	254	5	35	Batelada agitada 50rpm leito fixo	50	1 acetato	SANTOS, JOHNSON <i>et al.</i> (2018)*
74,8%	6000	2000	5	34	Frascos em batelada	240	NM	MATOS <i>et al.</i> (2018)**
98%	1381	201	3	30	Ascendente de leito fixo	125	2,6 ácido acético	NANCUCHEO, JOHNSON (2014)
60%	2762	672	2,8	30	Agitação 50rpm	600	3,1 ac. acético e 1,6 glicerol	

NM: não monitorado; DQO: demanda química de oxigênio; TDH: tempo de detenção hidráulica; *97% de precipitação de 7,5 mmol/L de Cu. DM parcialmente clarificada esterilizada; **baixa pressão de oxigênio.

Bertolino *et al.* (2012) comparam o uso de glicerol com lactato como fontes de carbono no tratamento biológico de DM. O grupo foi o primeiro a encontrar butirato como matéria orgânica residual no efluente final. Todos os estudos citados que mencionam a formação de AGV a partir da degradação do glicerol apontam para possibilidade de agregação de valor ao efluente final do tratamento de DM com glicerol caso ocorra seus acúmulos. Os AGV tem sido considerados fonte potencial de carbono renovável devido à sua ampla aplicação industrial (EREGOWDA *et al.*, 2018).

O glicerol bruto foi bem menos investigado como doador de elétrons na redução de sulfato e de modo que não é suficiente para esclarecer completamente as condições de seu uso no tratamento de DM. As condições em que esta aplicação ocorreu são apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Condições e resultados de aplicações de GB como fonte de carbono na redução de sulfato.

Remoção sulfato	DQO (mg.L ⁻¹)	Sulfato (mg.L ⁻¹)	pH	Temp. °C	Reator	TDH (h)	Oxigênio dissolvido	Referência
55%	NM	900	7	*	Colunas de fluxo descendente	13	NM	ZAMZOW <i>et al.</i> , (2007)**
NM	3600	3600	4	30	Bateladas em frascos	720	Anaeróbio	SANTOS, JOHNSON, (2018)**
NM	3600	3600	7	30	Bateladas em frascos	240	Anaeróbio	(2018)**
5,06 mg/L.h ⁻¹	1540	220	8,5	35	UASB	10	Micro-Aeróbio	MORA <i>et al.</i> , (2018)

*ambiente (inverno Estados Unidos); **a adição de nutrientes e vitaminas.

Os resultados mostram que existem vantagens quanto ao uso do GB em relação ao GP que podem ser exploradas no tratamento de efluentes ricos em sulfato. No entanto, o uso de GB para este fim ainda apresenta particularidades que demandam investigação. A pesquisa de Santos *et al.* (2015) mostrou após o período de aclimação com *start-up* lento, que a

sulfetogênese com glicerol bruto foi similar ao tempo com GP, porém este estudo prévio foi realizado em um poço de petróleo, sistema distinto do tratamento de DM. Apesar da relação com DM, a pesquisa de Behrooz e Borden (2012) foi sobre prevenção, aplicando o glicerol bruto junto aos rejeitos sólidos da mineração.

Na pesquisa de Zamzow *et al.* (2007), foi constatado que quando o inóculo está aclimatado à fonte de carbono, ele usa os intermediários metabólicos da degradação do glicerol mais completamente do que o fazem com o acetato produzido com a oxidação do etanol. Porém para generalizar as informações quanto à aplicação ao tratamento de DM, uma maior concentração de sulfato afluyente deve ser avaliada, visto que 900 mg.L^{-1} não reflete a condição da maioria das DM. Os AGV acumulados a partir da degradação do GB foram avaliados apenas na pesquisa de Santos e Johnson (2018), e foi constatado que mediante o pH afluyente de 4 com 720 h de TDH foi acumulado acetato, lactato e 1,3-propanodiol. Mediante pH 7 e 240 h de TDH houve glicerol e acetado do efluyente. Ou seja, alterações no pH afluyente e TDH podem ser avaliadas para manipulação da produção de carboxilatos de interesse ou que estejam afetando a atuação do consórcio microbiano.

Em relação à quantidade de DQO destinada à sulfetogênese, o glicerol bruto foi selecionado como a fonte carbono mais adequada em relação ao acetato, soro de queijo, dejetos de suínos e vinhaça (MORA *et al.*, 2018). A diversidade microbiana provavelmente mudou e levou ao desenvolvimento de mais bactérias fermentativas capazes de hidrolisar o glicerol bruto mais rapidamente. A relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ com glicerol foi de 1,68, sendo que 49,3% destinaram-se à metanogênese. Essa pesquisa também foi realizada com baixas concentrações de sulfato (220 mg.L^{-1}).

O glicerol é um bom doador de elétrons para redução de sulfato. Considerando a grande e crescente produção e problemática ambiental envolvida com o GB, sua aplicação no tratamento é relevante. Mais informações sobre o uso deste subproduto aplicado com DM real devem ser levantadas em especial pela grande complexidade dos dois efluentes.

3.2.2.2 Co-tratamento biológico de DM e resíduos da indústria cervejeira

Não foram encontrados registros da avaliação dos resíduos de cervejaria como fonte de carbono para redução de sulfato. Para cada 1.000t de cerveja produzida, entre 137 e 173t de resíduos

podem ser gerados na forma de restos de grãos da trituração, trub da produção de mosto e resíduos de levedura (PERIMENIS *et al.*, 2018). O trub é um resíduo formado pelas fases líquida e sólida, contendo proteínas desnaturadas, açúcares dissolvidos, carboidratos hidrolisados parcialmente, polifenóis, Ca^{2+} (MATHIAS *et al.*, 2014). Normalmente as cervejarias misturam todos os resíduos líquidos, incluindo a água de lavagem dos tanques proporcionando um volume de 3 a 20 unidades de águas residuárias por unidade de cerveja produzida. A DQO deste efluente costuma se estabelecer entre 2000 a 6000 mg.L^{-1} . O trub provém do tanque de ebulição e fermentação e, apesar de corresponder à apenas 3% desse volume, é responsável por 97% da carga orgânica, representando uma proporção substancial do custo de tratamento do efluente de cervejaria (HULTBERG; BOLDIN, 2019).

O gerenciamento de resíduos na indústria cervejeira representa um setor de custo substancial, de modo especial nas micro-cervejarias, que se encontram em larga expansão na última década. Nas indústrias em que há tratamento de efluentes, geralmente o processo se dá por sedimentação e vias aeróbias com alta demanda energética, muitas vezes acarretando o não cumprimento dos padrões de qualidade estabelecidos e gerando grandes quantidades de lodo de baixo valor com dispendioso descarte (HULTBERG; BODIN, 2019).

Diante deste cenário tem-se um campo de pesquisa com objetivo de proporcionar aplicações úteis e que valorizem os resíduos da produção cervejeira. Mediante a alta biodegradabilidade dos restos de grãos da trituração, trub da produção de mosto e resíduos de levedura (HULTBERG; BODIN, 2019), processos biológicos anaeróbios têm sido estudados para produção de produtos de valor econômico como metano, carboxilatos e biohidrogênio a partir da digestão destes resíduos (PERIMENIS *et al.*, 2018).

Perimenis *et al.* (2018) avaliaram metanogênese e acidogênese a partir de resíduos agroindustriais. A comparação se deu entre os 3 resíduos da cervejaria, trub, levedura e grãos usados e também em relação ao resíduo de pêra, maçã e tâmara utilizadas para fabricação de geléias. O trub revelou maior potencial de metano, bem como as maiores concentrações de ácidos graxos voláteis totais durante a conversão acidogênica, principalmente ácido acético, butírico e capróico. A menor produção de ácido acético em relação aos demais AGV foi com trub, o qual apresentou a maior produção de ácido capróico (45%).

A maior produção de metano pelo trub pode ser explicada pela alta concentração de açúcares e menor concentração de hemicelulose (Tabela 3.5). O trub é proveniente de processos de cocção,

o que favorece a diminuição da cristalinidade, aumento da área superficial e liberação de açúcares (PERIMENIS *et al.*, 2018).

Tabela 3.5- Composição de resíduos de cervejaria (m/m).

	Trub	Grãos gastos	Levedura utilizada
DQO gDQO/gMF	0,294	0,289	0,316
Celulose %ST	8,2	1,0	19,4
Hemicelulose %ST	5,6	14,7	28,8
Lignina %ST	8	0,3	4,2
Açúcar %ST	57,4	38,6	12,4
Proteínas %ST	15	35,9	18
Lipídio %ST	3	3,9	10
Cinzas %ST	2,5	5,6	5

MF: matéria fresca. ST: sólidos totais.

Segundo Perimenis *et al.* (2018), a cinética da conversão metanogênica foi rápida devido à presença de substâncias prontamente digeríveis suficientes para serem convertidas (PERIMENIS *et al.*, 2018). A porção celulósica da composição pode funcionar no controle da compactação da biomassa, como descreve Skousen *et al.* (2017) acerca do que ocorre com cascas e aparas de madeira minimizando curtos-circuitos.

Enquanto celulose e hemicelulose podem ser convertidas em metano e dióxido de carbono, a lignina apresenta alta massa molar, não é hidrolisável, e apresenta grande complexidade e heterogeneidade. Isso faz com que sua biodegradação inicial deva ser oxidativa e inespecífica e mediada por um sistema extracelular. Pode ocorrer biodegradação aeróbia da lignina com ação de enzimas ligninolíticas que podem biodegradar xenobióticos recalcitrantes, como dioxinas, devido às amplas especificidades de substrato dessas enzimas, porém pouco se sabe sobre a degradação anaeróbia da lignina. Isso ocorre porque as enzimas extracelulares necessárias para a despolimerização da lignina precisam de oxigênio molecular, e sua oxidação não seria prevista em condições anaeróbicas. No entanto, a degradação de lignina já foi obtida em sob condições de redução de sulfato (KO *et al.*, 2009). Além de ser um componente do efluente de cervejaria, a lignina é o polímero natural mais abundante fonte de carbono do mundo, e sua degradação anaeróbia é de interesse para estabilização de resíduos sólidos

urbanos, no tratamento de resíduos da indústria de celulose, como um inibidor na fermentação do bioetanol e no desenvolvimento de uma compreensão mais clara do ciclo global do carbono.

Essas características do substrato remetem ao potencial do mesmo para redução de sulfato quando na presença deste aceptor de elétrons, considerando que as BRS competem com as metanogênicas pelos mesmos substratos. Portanto, a pesquisa sobre sua aplicação em reatores anaeróbios de tratamento biológico de DM com BRS mostra-se pertinente. Entre os fatos que revelam pertinência para esta investigação, tem-se a possibilidade de formação de moléculas orgânicas de valor econômico a partir da oxidação incompleta da fonte de carbono. Caso haja resíduo de DQO no tratamento de DM na forma de ácido capróico, este pode ser separado e aproveitado como produto de valor comercial. O ácido capróico tem um maior número de carbonos e é mais facilmente separado da água do que ácido acético e butírico. Trata-se de um AGV com alto valor econômico devido às suas possíveis aplicações finas (PERIMENIS *et al.*, 2018).

3.2.2.3 Possíveis aplicações da DQO residual proveniente da etapa sulfetogênica

É possível que intermediários metabólicos da oxidação dos subprodutos utilizados como doadores de elétrons sejam acumulados, apresentando um residual de matéria orgânica que demande planejamento de uso para que não se torne um passivo ambiental. Os ácidos orgânicos produzidos pela oxidação anaeróbia incompleta podem ser utilizados de maneira economicamente favorável ao tratamento. Estudos recentes apresentam AGV como fonte potencial de carbono renovável devido à sua ampla aplicação industrial (EREGOWDA *et al.*, 2018). Os ácidos carboxílicos são matéria prima para produtos químicos finos, aromas e polímeros (REYES *et al.*, 2020). Acetato é mencionado como um dos produtos químicos mais importantes do mundo, devido sua aplicabilidade na indústria alimentícia, farmacêutica e de polímeros e seu uso como precursor de combustíveis e produtos químicos (JONES *et al.*, 2017).

A síntese e recuperação de AGV de resíduos e produtos de fermentação tem sido considerada uma solução potencial para a remoção de DQO de efluentes em importantes pesquisas (SINGHANIA *et al.*, 2013; LONGO *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017; EREGOWDA *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2020; REYES *et al.*, 2020). A produção de carboxilatos a partir de resíduos e efluentes ricos em matéria orgânica por via biológica é considerada extremamente pertinente tanto do ponto vista ambiental quanto econômico (LIU *et al.*, 2014). Além de se

configurar em um destino adequado para efluentes com DQO biodegradável, a produção anaeróbia de carboxilatos é vantajosa por substituir a produção destes a partir de derivados petroquímicos ou processos que requerem grandes quantidades de energia ou produtos químicos. Estas são atualmente as vias de produção de carboxilatos mais utilizadas (REYES *et al.*, 2020). A oxidação ou carboxilação de precursores químicos do processamento do petróleo promove emissão de gases de efeito estufa (GEE). A exemplo disso, a emissão de GEE ao longo do ciclo de vida do ácido acético quando produzido por incineração sem recuperação de energia é de 3,3 toneladas de CO_{2eq} por tonelada de ácido produzido (MORAIS *et al.*, 2020).

Os ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC) provenientes da etapa de fermentação acidogênica da digestão anaeróbia (ácido acético – C2, propiônico – C3, butírico – C4 e valérico – C5) e álcoois (etanol, 1,3-propanodiol, butanol, entre outros) são amplamente aplicados na produção de vernizes, tintas, perfumes, desinfetantes, tensoativos, auxiliares têxteis, medicamentos e produtos alimentícios. Os ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM) - caprílico (C6), enântico (C7) e caprílico (C8) apresentam maiores vantagens econômicas em relação aos ACCC. Mais hidrofóbicos, os ACCM são mais facilmente extraídos do meio reacional, e apresentam finalidades mais nobres na indústria, utilizados como aditivos alimentares, precursores para produção de biodiesel e na produção de bioplásticos e como agente antimicrobiano, (DE SOUSA E SILVA *et al.*, 2020 e MORAIS *et al.*, 2020). O valor de mercado da tonelada de ACCC é aproximadamente US \$ 400-2500, enquanto a tonelada do ACCM custa US \$ 2000-2500. Ambos apresentam maior valor de mercado que o metano (US \$ 200-600 por tonelada) (MORAIS *et al.*, 2020).

O glicerol é precursor de produtos químicos importantes como propanodióis, propanóis e etilenoglicol, por meio de oxidação, desidratação, hidrogenólise, vaporização, carboxilação, acetalização, esterificação e cloração. O 1,3-propanodiol, um produto com aplicações em indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticas entre outras, foi produzido a partir de GB (SAMUDRALA, *et al.*, 2018; SAMUDRALA, 2019). Santos *et al.* (2017) obtiveram da oxidação do glicerol durante a sulfetogênese, acetato, lactato e 1,3-propanodiol e Qatibi *et al.* (1991) também obtiveram acetato e 1,3-propanodiol além de propionato. Partindo de 2016 mg.L⁻¹ DQO de glicerol, Bertolino *et al.* (2012) obteve um acúmulo de 11 e 3.3 mmol.L⁻¹ de acetato e butirato, respectivamente. Correlação semelhante é obtida por Santos; Johnson (2018) obtendo 1 mmol.L⁻¹ de acetato a partir de 254 mg.L⁻¹ DQO de glicerol. Propionato, acetato e butirato também foram produzidos a partir de GB na pesquisa de Coelho *et al.* (2020), além de

ácido valérico, isso-valérico e capróico. Em relação a outros resíduos agroindustriais, a digestão anaeróbia de trub proporcionou maior acúmulo de AGV (PERIMENIS *et al.*, 2018). A produção de carboxilatos a partir da degradação anaeróbia de GB e de trub é esperada e a recuperação destes elementos do efluente do tratamento de DM pode ser uma alternativa como estratégia de pós-tratamento e destino adequado para a DQO residual.

Além da recuperação de ácidos carboxílicos a partir da degradação anaeróbia de trub e GB, a produção de biogás a partir destes subprodutos também pode ser alcançada (ALBUQUERQUE, 2014 e PERIMENIS *et al.*, 2018). Tem-se que os metabólicos intermediários acumulados no efluente do tratamento biológico anaeróbio de DM com esses substratos também podem ser direcionados a uma etapa de pós-tratamento com produção de metano ou recuperação de ácidos carboxílicos. Além de mitigar os impactos ambientais da destinação de efluentes com DQO residual, estas estratégias de pós-tratamento para o efluente da etapa sulfetogênica do tratamento de DM com subprodutos industriais reduz a dependência do setor petroquímico na produção energética e de ácidos carboxílicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os objetivos descritos foram elencados a partir do estudo que situa o estágio de desenvolvimento científico em que o tema se encontra, como foi apresentado na Seção 3. Na presente Seção, serão descritos os procedimentos laboratoriais (simplificados no fluxograma da Figura 4.1) realizados para cumprimento dos objetivos apresentados. A etapa experimental se centralizou em duas estratégias de operação da etapa sulfetogênica, que diferiram entre si pelo modo de adaptação do inóculo e fornecimento de substrato. Todos os procedimentos foram realizados em bateladas sequenciais, entre as quais houve reposição da fase líquida e manutenção da fase sólida (lodo). Estas etapas foram precedidas pelo estudo dos componentes do sistema e seguidas da avaliação de possibilidades de pós-tratamento, também em batelada.

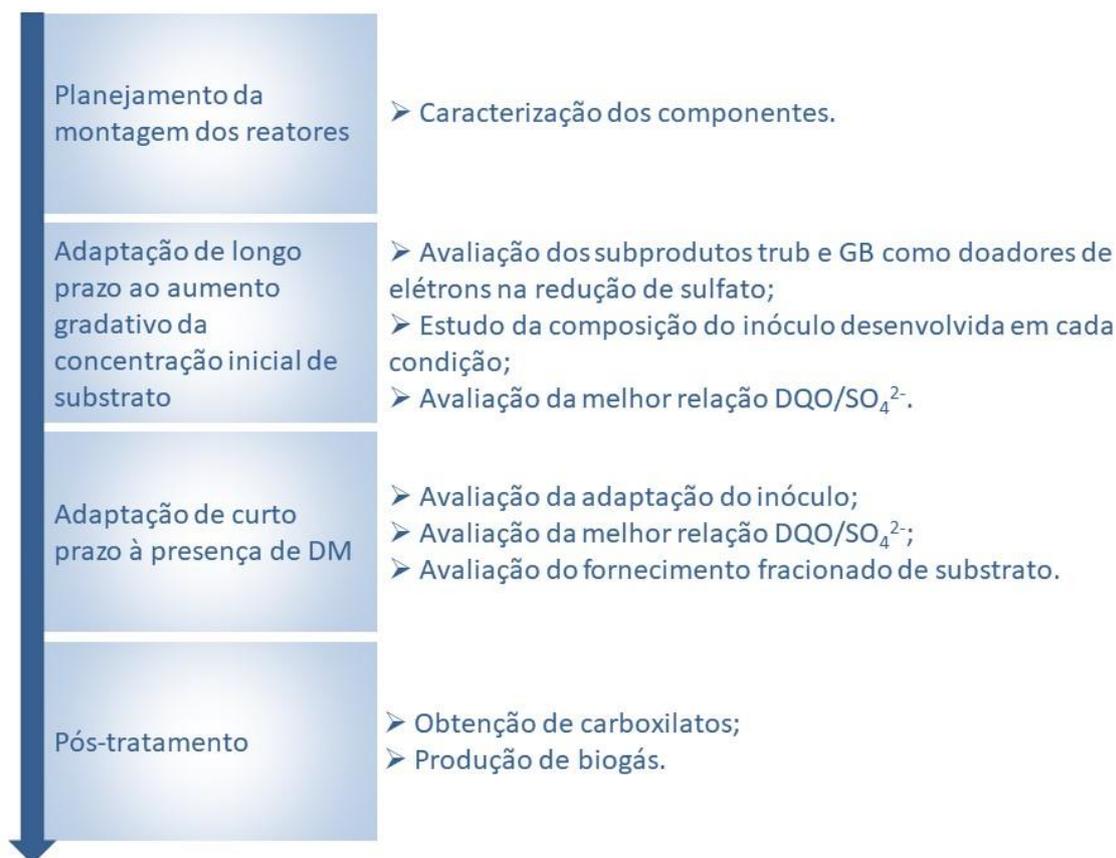


Figura 4.1 – Representação esquemática do método de pesquisa. Fonte: da autora.

4.1 Caracterização dos substratos, inóculo e DM

A DM utilizada foi proveniente de uma mineradora de ouro do município de Nova Lima – MG, Brasil. O trub utilizado foi advindo da cervejaria artesanal Ouropretana, localizada no distrito de Cachoeira do Campo em Ouro Preto – MG, Brasil. A origem do glicerol bruto utilizado foi a indústria de biodiesel Biominas, no município de Itaúna-MG, Brasil. O inóculo contendo BRS foi proveniente do Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da Universidade Federal de Minas Gerais. Ele era utilizado em reator metanogênico de fluxo ascendente tratando esgoto doméstico. Todos os elementos inseridos no sistema de tratamento estão apresentados na Figura 4.2.



Figura 4.2 - Elementos utilizados nos sistemas de tratamento. 1: DM; 2: Trub; 3: Inóculo e 4: GB. Fonte: da autora.

Para a projeção da montagem dos frascos em batelada, foram estudados os componentes da mistura. Foram realizados os testes de sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SVT) e sólidos totais fixos (STF) do inóculo, e a DQO de cada tipo de substrato do estudo, Trub, GP, GB e Etanol. A DM foi avaliada quanto a presença de sulfato, Ag, Al, Au, Co, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Ti, Zn, As, Cd, Pb, Fe e Sb. As características dos elementos utilizados foram consideradas neste trabalho como resultados, portanto a concentração de sulfato, metais e metaloides como a DQO dos substratos são apresentadas na Seção 5.

4.2 Procedimentos experimentais de adaptação lenta

4.2.1 Procedimento experimental I: Avaliação dos substratos trub e GB como doadores de elétrons para remoção de sulfato

Na primeira etapa, os substratos Glicerol bruto e Trub foram testados quanto à capacidade de agirem como doadores de elétrons na redução biológica de sulfato em relação aos controles positivos Glicerol Puro e Etanol e a um controle negativo no qual não foi adicionada fonte de carbono. Foram aplicadas 5 condições em triplicata (15 reatores) ilustradas na Figura 4.3. Os reatores foram operados por 120 dias com bateladas sequenciais em quatro etapas cíclicas: enchimento (adição da fase líquida – mistura de DM com substrato), reação (168 h),

sedimentação (30 minutos) e descarga da fase líquida com manutenção da fase sólida (lodo) nos reatores. Apenas o doador de elétrons variou entre as condições e todas as demais variáveis foram padronizadas em cada um dos reatores.

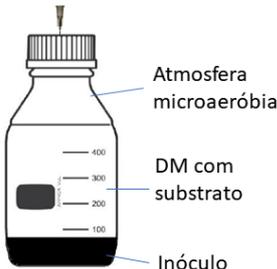
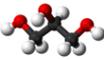
		Componentes do sistema		
		Doador de elétrons	Receptor de elétrons	Inóculo
	Condição I	Glicerol bruto		Consórcio anaeróbio proveniente de reator metanogênico contendo BRS 
	Condição II	Trub		
	Controle III	Etanol		
	Controle IV	Glicerol puro		
	Controle endógeno V	Sem substrato		

Figura 4.3 - Componentes presentes nos sistemas avaliados na primeira etapa. Fonte: da autora.

Em cada reator foram adicionados 100 mL de inóculo e 300 mL de DM (15,11 mgSVT.L⁻¹). A partir deste volume de DM, para montagem dos frascos nas relações DQO/SO₄²⁻ de 2 e 3 a concentração de sulfato foi mantida constante e foi alterada a quantidade de substrato aplicado, cujos volumes utilizados são mostrados na Tabela 4.1. Os frascos foram submetidos a condições controladas em incubadora de bancada (Shaker Solab), no escuro a 30 °C e 100 rpm, em bateladas sequenciais de 168 horas cada. Foi utilizada uma atmosfera microaeróbia por meio da utilização de uma agulha 0,7 x 30 mm mantida na tampa dos frascos. A atmosfera foi mantida assim para melhor reprodução do tratamento em escala industrial, sendo esperadas baixas concentrações de oxigênio nessas condições (PEDIZZI *et al.*, 2016).

Tabela 4.1 - Volume de substrato utilizado com cada tipo de doador de elétrons em cada uma das relações DQO/SO₄²⁻ aplicadas e os volumes reacionais e de *headspace* resultantes.

Volume (mL)	Etanol	GP	GB	Trub
-------------	--------	----	----	------

DQO/SO ₄ ²⁻ de 2	Substrato	1,1	0,7	1,4	10,5
	Volume reacional	401,1	400,7	401,4	410,5
	<i>Headspace</i>	218,9	219,3	218,6	209,5
DQO/SO ₄ ²⁻ de 3	Substrato	1,6	1,1	2,1	15,7
	Volume reacional	401,6	401,1	402,1	415,7
	<i>Headspace</i>	218,4	219,9	217,9	204,3

Apesar da quantidade de substrato ter sido mostrada em volume, o trub, o GB e o GP foram medidos em massa para serem aplicados nos reatores. Este procedimento se fez necessário devido a viscosidade do glicerol e as partículas de sólidos presentes no trub que tornam a medição de pequenos volumes desses elementos inviável. A densidade dos substratos é apresentada juntamente com as demais características dos mesmos na Seção 5.

Além do tratamento dos poluentes da DM, objetivou-se dar um destino adequado aos subprodutos utilizados como fonte de carbono. Deste modo, os ensaios foram realizados com excesso de doador de elétrons. Como relatam Hao *et al.* (2014), as relações DQO/SO₄²⁻ entre 2,4 e 4,8 podem ser aplicadas para remoção de sulfato, e como foi aplicado por Silva *et al.* (2011) com a relação DQO/SO₄²⁻ de 3,2. No entanto, como os substratos apresentam baixo pH, alta DQO e de moléculas de alta massa molar, para evitar falha do sistema por acúmulo de ácidos orgânicos, a relação DQO/SO₄²⁻ foi aumentada gradativamente. Durante dois meses foi fornecida uma quantidade de substrato que proporcionasse a relação DQO/SO₄²⁻ de 2. Em seguida, a relação DQO/SO₄²⁻ foi aumentada para 3 por mais dois meses. As amostras do meio líquido eram recolhidas imediatamente após a mistura de DM com os substratos e após 168 horas de batelada. Uma amostra do inóculo inicial aplicado nos sistemas foi recolhida. Após os 4 meses de execução desta etapa, o lodo final, o qual não era substituído a cada batelada, foi coletado de cada uma das condições para estudo da seleção de espécies na presença de cada um dos substratos.

4.2.2 Procedimento experimental II: avaliação da relação DQO/SO₄²⁻

Foram testadas as relações DQO/SO₄²⁻ de 1, 2,5 e 5. Valores maiores do que estes foram descartados pela possibilidade de acidificar o reator ou produzir um efluente final de alta carga orgânica com limitada aplicação. Devido a diversidade de possíveis rotas de oxidação,

considerando a diversidade microbiológica e de receptores de elétrons, menores concentrações de matéria orgânica também foram descartadas por poderem se tornar o fator limitante da redução de sulfato. Nesta etapa foram montadas seis diferentes condições em triplicatas, totalizando dezoito frascos. As condições experimentais são sistematizadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Condições experimentais dos reatores utilizados na Etapa II.

Frascos	I	II	III	IV	V	VI
Relação DQO/sulfato	1	2,5	5	1	2,5	5
Substrato	Trub	Trub	Trub	GB	GB	GB
Substrato (mL)	5,2	13,1	26,2	0,7	1,7	3,5
Volume reacional (mL)	355,2	363,1	376,2	350,7	351,7	353,5
Headspace (mL)	264,8	256,9	243,8	269,3	268,3	266,5

O inóculo utilizado era proveniente dos ensaios anteriores. Em cada reator foram adicionados 50 mL de inóculo ($11,11 \text{ mgSVT.L}^{-1}$) e 300 mL de DM. Os reatores foram submetidos à agitação de 100 rpm a 30 °C. A cada 24 h foi avaliada a concentração de sulfato até 168 horas de teste, com coleta de amostras utilizando seringas por septos de borracha. O afluente e o efluente da batelada foram também avaliados quanto ao pH, metais e DQO.

4.3 Procedimentos experimentais de rápida adaptação

4.3.1 Procedimento experimental III: avaliação da adaptação do inóculo à DM e diferentes relações DQO/SO₄²⁻

Para esta etapa foi utilizado um novo lote de inóculo obtido do mesmo reator do qual se obteve o inóculo da etapa anterior, no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da Universidade Federal de Minas Gerais. O inóculo coletado foi separado em duas porções. Três litros foram armazenados sem passar por nenhum procedimento, à temperatura ambiente

(aproximadamente 25 °C) por um mês. Este inóculo foi nomeado Cru. Três litros de inóculo foram armazenados com cinco litros de DM também à temperatura ambiente também por um mês. Este inóculo foi nomeado Aclimatado (Acl). Foi realizada uma nova coleta de DM no mesmo local da coleta realizada anteriormente, uma mineradora de ouro no município de Nova Lima.

Os dois inóculos foram sedimentados naturalmente e a fase sólida obtida após descarte do sobrenadante foi aplicada nos reatores. Foram utilizados 60 mL de inóculo e 350 mL de DM em cada um dos reatores (9,8 mgSVT.L⁻¹ com o inóculo cru e 10,26 mgSVT.L⁻¹ com o inóculo Acl). Foram utilizadas diferentes relações DQO/SO₄²⁻ com cada um dos inóculos Cru e Acl, conforme mostrado na Tabela 4.3. Novamente, a concentração de sulfato é mantida igual entre os reatores e a quantidade de substrato é diferente para cada condição. Cada uma das condições mostradas na Tabela 4.3 foi montada em triplicata. Os reatores foram mantidos nas mesmas condições que nas etapas anteriores, no escuro a 30 °C e com agitação de 100 rpm por bateladas sequenciais de 168 horas. A agulha de 0,7 x 30 mm foi utilizada na tampa dos frascos para manutenção da atmosfera microanaeróbia.

Tabela 4.3 - Condições experimentais utilizadas na Etapa III.

Doador de elétrons	DQO/SO ₄ ²⁻	Inóculo	Substrato (mL)	Volume reacional (mL)	Headspace (mL)
Trub	0,8	Cru	4,3	414,3	205,7
		Acl			
	1,6	Acl	8,6	418,6	201,4
		Cru			
3	Acl	16,1	426,1	193,9	
	Cru				
5	Acl	26,8	486,8	133,2	
	Cru				
GB	0,8	Cru	0,6	410,6	209,4
		Acl			
	1,6	Acl	1,1	411,1	208,9
		Cru			
3	Acl	2,1	412,1	207,9	
	Cru				
5	Acl	3,6	413,6	206,4	
	Cru				

4.3.2 Procedimento experimental IV: adição fracionada de substrato

Devido ao fato de que os substratos apresentam a tendência ao acúmulo de ácidos orgânicos, foi elaborado um procedimento com o objetivo de distribuir a formação destes ao longo do tempo, minimizando a possibilidade de acidificação do sistema. Apenas o inóculo Acl foi utilizado nesta etapa, com alteração na forma com que o substrato foi adicionado nos reatores. Novamente, foram utilizados 60 mL de inóculo, 350 mL de DM. Os reatores foram mantidos no escuro a 30 °C, com agitação de 100 rpm, por 144 horas. Foi realizado o que será chamado de Fornecimento fracionado da fonte de carbono (FFFC), onde o substrato foi adicionado em pequenas porções ao longo do período de batelada. A quantidade de substrato correspondente à relação DQO/SO₄²⁻ de 3 foi dividida em 6 porções iguais (657,37 mg de DQO cada porção), e cada porção adicionada no reator a cada 24 h, iniciando no tempo 0. A cada 24 h, a concentração de sulfato e o pH eram aferidos. Exclusivamente com trub foi realizado um procedimento extra, pelo qual a mesma quantidade de substrato, a qual se refere a relação DQO/SO₄²⁻ de 3, foi desta vez dividida em 7 porções iguais (563,46 mg de DQO cada porção). Cada porção também foi adicionada a cada 24 h, iniciando no tempo zero, e desta vez a batelada foi mantida por 168 horas.

4.3.3 Polimento do efluente da etapa sulfetogênica com produção de biogás

Um procedimento tal como o descrito na etapa IV foi realizado para obtenção do efluente a ser aplicado nesta etapa de polimento. O GB referente à relação DQO/SO₄²⁻ de 3 foi dividido e aplicado em 6 porções iguais a cada 24 h ao longo de 6 dias, e a mesma quantidade de DQO em trub foi dividida em 7 partes iguais e adicionadas do mesmo modo ao longo de 7 dias. Após a etapa sulfetogênica, o efluente obtido foi então aplicado em outro reator para realização da etapa de pós-tratamento. O inóculo utilizado na etapa de polimento era granular, proveniente de um reator *up-flow anaerobic sludge blanket* (UASB) usado para tratar efluente de matadouro de aves (Dacar, Tietê-SP). Em procedimento asséptico, cada reator recebeu 5 mL de lodo, 45 mL de meio proporcionando 67 mL de *headspace*. Os reatores foram lacrados e submetidos a

um sistema de troca de atmosfera (Figura 4.4), para garantir equalização da pressão interna e atmosfera exclusiva de nitrogênio. Foram montadas 4 condições em triplicata, 12 reatores segundo as condições expostas na Tabela 4.4.

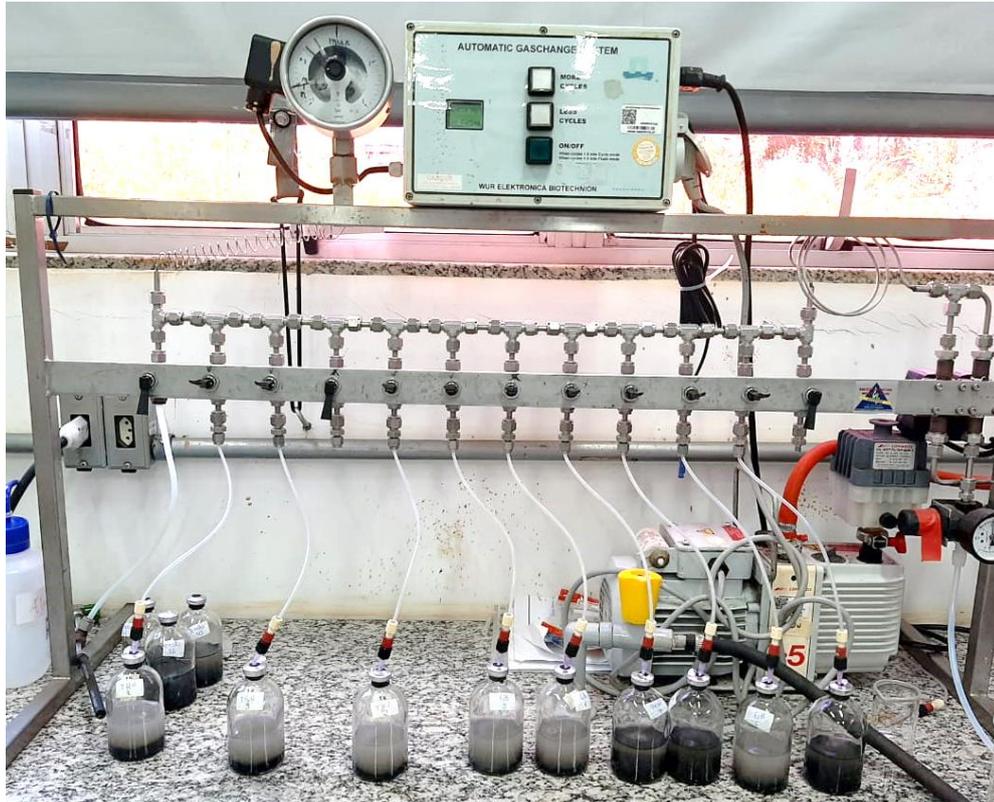


Figura 4.4 - Reatores da etapa de produção de biogás sendo submetidos ao sistema de troca de atmosfera. Fonte: da autora.

Tabela 4.4 - Condições experimentais do teste de produção de metano.

	Condição I	Condição II	Condição III	Controle endógeno
Meio	Efluente do tratamento de DM com trub	Efluente do tratamento de DM com GB	Ácido propiônico e solução nutriente	Sem doador de elétron
pH	6,2	6,6	6,2	6,2
DQO (mg.L ⁻¹)	4597±97	3390±67	3847±52	-
Relação alimento/microrganismo	0,57	0,424	0,481	-
Sulfato residual (mg.L ⁻¹)	330±10	193±9	-	-
Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	4012±101	3267±52	3579±74	-

Na condição III foi adicionado ácido propiônico como doador de elétrons e solução nutriente conforme descrito por Aquino *et al.* (2007), criando a proporção de DQO: N: P de 350: 5: 1. Na condição III e no controle endógeno, o pH foi corrigido com NaOH. O ácido propiônico foi utilizado como controle positivo por não estar disponível de forma imediata à metanogênese. Oxidado em acetato, H₂, H⁺ e HCO₃⁻ (CHERNICHARO, 2016), o ácido propiônico se aproxima mais das condições de degradação de um substrato complexo, sendo mais apropriado para a comparação com estes efluentes do que se fornecido um ácido disponível diretamente à oxidação completa como o ácido acético.

Os reatores foram submetidos à agitação de 100 rpm no escuro a 30 °C por 6 dias. A cada 24h era recolhida uma amostra gasosa do *headspace* para averiguar a concentração de metano. O efluente do polimento foi avaliado quanto à concentração de sulfato e DQO, pH e alcalinidade.

4.4 Análises

As análises de DQO, sulfato, pH, metais e metaloides foram realizadas segundo os métodos descritos por Standard Methods (APHA, 2012). Alcalinidade a bicarbonato foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Ripley *et al.* (1986). A concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) foi verificada utilizando espectrofotometria de alta performance Shimadzu's system (HPLC). A coluna de troca iônica utilizada foi a Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300,0x7,8 mm), sob configuração de 55 °C. AGV foram analisados sob um tempo total 35 minutos com comprimento de onda de 210 nm com detector UV-Vis e matriz de diodos (DAD - Shimadzu SPDM20A). Metais e metaloides foram medidos pelo método 3120 B, 'Determination of Metals by Plasma Emission Spectrometry'. A preparação da amostra para análise de metal foi realizada conforme descrito por Choudhary e Sheoran (2011). Foi adicionado 1 mL de HNO₃ concentrado ultrapuro para cada 50 mL de amostra imediatamente após a coleta, ajustando o pH para menos que 2. As amostras foram filtradas através do filtro Whatman nº 42. Apenas metais e metaloides dissolvidos foram analisados. As concentrações foram determinadas usando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (MakeThermo electron corporation Ltd, Modelo S2).

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e utilizadas as médias na discussão dos resultados. Foi estimado o desvio padrão amostral de acordo com a função DESVPAD.A (onde A se refere à amostra), de acordo com a equação 4.1, onde \bar{x} é a média de amostra MÉDIA (núm1; núm2...) e n é o tamanho da amostra.

$$DESVPAD.A = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (4.1)$$

Foram utilizadas análises de variância para comparar os efeitos das diferentes combinações de variáveis (tipo de inóculo, substrato, DQO/SO₄²⁻) na eficiência da remoção de sulfato. Foi aplicado o teste F com 5% de significância utilizando-se o *software* RStudio. Os valores obtidos foram ordenados com o teste de agrupamento Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) com 5% de significância. Também foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA tri-fatorial) para comparação entre as eficiências de remoção de sulfato com cada um dos substratos testados e o controle endógeno. Foi aplicado o teste *a posteriori* de Tukey HSD para as diferenças significativas (P<0,05) (ZAR, 1996).

A quantificação de metano foi realizada com um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies

7890A modelo GC A.01.14, equipado com detector de condutividade térmica e coluna Rt-MSieve 5^a (30m x 0.53mm x 50µm). Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste e a temperatura da coluna mantida em 40°C. O detector e o injetor foram programados para 120°C. Os valores de área obtidos foram aplicados à uma curva construída com injeção de diferentes volumes de gás padrão metano (99,5% de pureza – White Martins) no cromatógrafo.

A extração de DNA foi realizada usando o kit de isolamento de DNA PowerSoil® (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O analisador de quantificação fluorométrica Qubit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado como ferramenta para quantificação de amostras e um espectrofotômetro (Nanodrop 1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para medir a pureza do DNA.

As amostras foram analisadas quanto à composição e estrutura da comunidade microbiana por sequenciamento de alto rendimento usando um sequenciador Illumina (Illumina, San Diego, CA, EUA). Os iniciadores de PCR da região variável V4 do gene 16S rRNA utilizados para amplificação do DNA extraído foram, 515F-806R para Bactéria e 341-785R para *Archaea*. Foram utilizados o *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (Qiagen, EUA) nas condições estabelecidas: 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, após o que foi realizado um passo final de alongamento a 72°C por 5 minutos. Foi utilizado gel de agarose a 2% para determinar o sucesso da amplificação e a intensidade relativa das bandas. As amostras foram reunidas em proporções iguais com base em sua massa molar e concentrações de DNA e purificadas usando esferas *AMpure XP Beads*. Em seguida, o produto de PCR purificado foi utilizado para preparar a biblioteca de DNA Illumina. O sequenciamento de última geração (*Next-generation sequencing* - NGS) foi realizado com a plataforma MiSeq, seguindo a metodologia descrita por Van den Hoecke *et al.* (2015). Os dados sequenciados foram processados utilizando o *pipeline* de análise de análise de genes ribossômico e funcional de DNA utilizado por MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EUA).

Os índices de diversidade Shannon (H') e Simpson (1-D); e os índices de riqueza Margalef (D_{Mg}) e Chao1 dos resultados do sequenciamento foram calculados utilizando o *software* PAST (*Paleontological Statistic Software*) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Índices de Diversidade e Riqueza

Índice	Fórmula	Siglas
Shannon (H')	$H' = -\sum p_i \ln p_i$	p_i : frequência relativa
Simpson (1-D)	$D = \sum p_i^2$	p_i : n_i/N
Margalef (D_{Mg})	$D_{mg} = (S-1)/ \ln N$	S: nº de grupos (sequências diferentes)
		N: nº total de sequências

As sequências foram submetidas ao Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI - <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>) no bioprojeto “PRJNA623927” sob o ID de acesso “SUB7262533”.

4.5 Quantificação da eficiência de remoção e destino da DQO

A eficiência de remoção de sulfato e de DQO foram definidas por meio das equações 4.2 e 4.3, respectivamente.

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = \left(\frac{SO_{4en}^{2-} - SO_{4s}^{2-}}{SO_{4en}^{2-}} \right) \times 100 \quad (4.2)$$

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = \left(\frac{DQO_{en} - DQO_s}{DQO_{en}} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

Em que SO_{4en}^{2-} , DQO_{en} e SO_{4s}^{2-} , DQO_s são as concentrações de sulfato e DQO aferidas imediatamente após a mistura da DM com substrato e inóculo e ao fim do período previsto para cada batelada em cada etapa. A porcentagem de DQO consumida pelas BRS foi calculada de acordo com a equação 4.4 (CUNHA *et al.*, 2020).

$$DQO \text{ para sulfetogênese (\%)} = \left(\frac{0,67 \cdot (SO_{4en}^{2-} - SO_{4s}^{2-})}{DQO_{en} - DQO_s} \right) \times 100 \quad (4.4)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos substratos, inóculo e DM

As características dos substratos testados são apresentadas na Tabela 5.1. Os resultados de DQO obtidos mostraram ordens de grandeza compatíveis com os valores registrados para estes subprodutos na literatura. O trub utilizado por Perimenis *et al.* (2018) apresentava 294 mg.g⁻¹ de DQO e o GB utilizado por Albuquerque (2014) apresentou a DQO de 1123 g.L⁻¹. A DQO obtida na presente pesquisa para GB em g.L⁻¹ é 1586. A DQO do etanol e do GP utilizados foram de 2052±2 mg.L⁻¹ e 2381±3 mg.g⁻¹ respectivamente.

Tabela 5.1 - Características dos substratos.

	Unidade	Trub	GB
Sólidos totais (ST)	mg.L ⁻¹	155±1	83±1
Sólidos voláteis (SVT)	mg.L ⁻¹	150±1	82±1
DQO	mgDQO.g ⁻¹	200±2	1300±49
Densidade	g.cm ⁻³	1,05±0,001	1,22±0,003
Sulfato	mg.L ⁻¹	–	52±2
pH	–	4,9±0,001	5,9±0,04

A composição da DM é mostrada na Tabela 5.2. O primeiro lote foi utilizado nos procedimentos I e II, enquanto o segundo lote nos procedimentos III e IV. Embora menos frequente, o pH neutro pode ser encontrado em efluentes ricos em sulfato gerados pela atividade mineradora, tal como ocorre na Mina de Campbel I com pH de 6,5-8,5 e de Delnite com pH 6,8-7,8. Uma variação bastante significativa no pH pode ocorrer na mesma localidade, exemplificado pelo que ocorre na mina de Heath Steele, onde o pH varia entre 1-7,5, em Kidd Creek com variação de 3-7, em Nickel Rim (3-6,5) e em Waite Amulet (2,5-7,5) (MCGREGOR; BLOWES 2002). O ambiente de mineração pode apresentar minerais de carbonato (LANGMAN *et al.*, 2019), o qual pode ser o agente neutralizante do pH nestes ambientes.

Tabela 5.2 - Composição da DM, cujo Lote 1 foi utilizado nas Etapas I e II e o Lote 2 nas Etapas III e IV (mg.L⁻¹).

	SO ₄ ²⁻	Fe	As	Cd	Pb	Sb	Zn	pH
Lote 1	3860,5± 349	-	1,4± 0,02	14,8± 0,3	1,8± 0,04	3,9± 0,1	209± 9	7,5± 0,001
Lote 2	3756,4± 258	68± 4	0,8± 0,02	10,2± 0,33	2,1± 0,1	2,0± 0,02	115± 5	7,5± 0,003

Os STV dos inóculos utilizados são mostrados na Tabela 5.3. O inóculo utilizado na etapa IV foi o mesmo Acl utilizado na etapa III.

Tabela 5.3 - Características dos inóculos utilizados em cada etapa - STV (mg.L⁻¹).

Etapa I	Etapa II	Etapa III		Metanogênese
		Cru	Acl	Granular
45,34±1,01	66,67±0,26	57,2±1,9	59,9±0,9	71,86±3,2

Os resultados apresentados nesta seção foram aplicados nos cálculos para montagem dos reatores utilizados no presente trabalho, assim como são importantes na avaliação de eficiência dos tratamentos realizados. Porém, em função da grande variação que pode ocorrer na composição de cada um dos subprodutos aqui avaliados, devido a inúmeras variáveis em sua formação tratados na revisão da literatura, não há propósito de aplicação literal destes dados externos à esta tese. No entanto, estas informações podem ser utilizadas como referência para prever comportamento de sistemas que façam uso subprodutos de composição similar aos utilizados aqui. É possível que as estratégias de operação e proporções utilizadas que proporcionaram boa eficiência mostradas nas seções a seguir, também possam ser aplicadas à sistemas que utilizem subprodutos de composição similar aos aqui aplicados. É necessário que estas generalizações sejam feitas com criticidade e especialmente, considerando além da DQO dos subprodutos, a composição e a recalcitrância, especialmente a proporção de moléculas de elevada massa molar presente nos mesmos.

5.2 Efeitos dos diferentes doadores de elétrons nos sistemas de adaptação lenta

5.2.1 Eficiência dos subprodutos trub e GB como doadores de elétrons na remoção de sulfato e DQO

Nesta seção serão apresentados os resultados quanto à eficiência dos doadores de elétrons obtidos durante o procedimento de adaptação e após estabilidade dos reatores. Após dois meses utilizando a relação DQO/SO_4^{2-} de 2, os valores de concentração de sulfato no início e no final da última batelada foram considerados para calcular a eficiência de remoção de sulfato, e são apresentados na Tabela 5.4. Os reatores foram operados por mais dois meses com a relação DQO/SO_4^{2-} de 3, atingindo condições estáveis (remoção de sulfato constante com variação de $\pm 7\%$). Para obtenção dos valores apresentados para os substratos testados e os controles positivos, o valor de remoção no frasco de controle endógeno foi subtraído. Isto foi feito para que a remoção de sulfato por adsorção ao inóculo ou por redução endógena fosse

desconsiderado. Os valores de pH efluente obtidos em cada batelada mencionada também são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Remoção de sulfato e pH efluente obtidos com as relações DQO/SO₄²⁻ de 2 e 3 com os diferentes tipos de substrato avaliado.

	DQO/SO ₄ ²⁻ de 2		DQO/SO ₄ ²⁻ de 3	
	Remoção de sulfato (%)	pH efluente	Remoção de sulfato (%)	pH efluente
Controle negative	2,6±4	6,5±0,01	1,9±5	6,5±0,01
Etanol	52,1±4,3	5,5±0,02	92,3±0,3	6,0±0,03
GP	58,8±2,6	4,4±0,04	91,4±3,1	4,8±0,03
Trub	61,8±2,9	4,5±0,02	89,5±0,9	4,8±0,03
GB	49,2±4,3	4,6±0,03	89,1±0,9	4,9±0,02

No controle endógeno, a remoção de sulfato na primeira batelada foi de 9,9±4%, enquanto com etanol, GP, GB e trub de, respectivamente, 25,2±7, 21,4±6, 27,2±5 e 26,4±5%. O pH efluente obtido na primeira batelada foi de 7,4±0,09 no controle endógeno, e de 4,9±0,09, 3,9±0,04, 3,8±0,09 e 3,5±0,8 com etanol, GP, GB e trub, respectivamente. É possível que a remoção de sulfato na primeira batelada do controle endógeno tenha se dado por redução com fonte de carbono proveniente de DQO residual do reator metanogênico de onde o inóculo foi coletado, bem como por adsorção no inóculo. Após essa batelada, a DQO residual proveniente do reator metanogênico deve ter se esgotado, assim como os sítios ativos para possível adsorção devido à alta concentração de sulfato aplicada e ao fato de que não houve substituição do inóculo. Este deve ser o motivo pelo qual tenha ocorrido menor redução de sulfato nas bateladas seguintes com esta condição. A diminuição do pH observada no controle endógeno após a primeira batelada, assim como nos demais reatores, pode ter ocorrido devido à produção de ácidos orgânicos com liberação de H⁺, no caso do controle endógeno, a partir de células mortas. A concentração dos intermediários metabólicos nos reatores de controle endógeno não deve ter sido suficiente para ativar o metabolismo de oxidação completa rápida o suficiente para eliminá-los até o final da batelada.

O pH efluente no sistema com etanol é sempre mais elevado em relação aos sistemas com os demais substratos em todos os momentos avaliados. Moléculas de elevada massa molar como as que existem no GB e no trub, como lipídios, proteínas e carboidratos precisam passar por diversas etapas da degradação anaeróbia, conforme mostrado na Figura 5.1. Já o GP não depende da etapa da hidrólise, sendo decomposto a partir da acidogênese. O etanol depende apenas da acetogênese e metanogênese para ser degradado. Isso significa que a diversidade e a concentração de intermediários metabólicos que pode ser acumulado a partir de GB e trub é maior que a partir dos demais substratos, sendo exemplificado por açúcares, aminoácidos, peptídeos, glicerol, etanol, 1,3-propanodiol, butanol, PHA, succinato, propiônico, n-nutirico e n-capríco. Já a partir da degradação do GP não ocorre acúmulo de açúcares, aminoácidos e peptídeos, e a partir do etanol só pode ser acumulado acetato e H_2 . Os ácidos orgânicos podem liberar H^+ no meio (CHERNICHARO 2016), sendo possivelmente este o fator que proporcionou menores pHs efluentes nos sistemas onde foi empregado GP, GB ou trub como substratos.

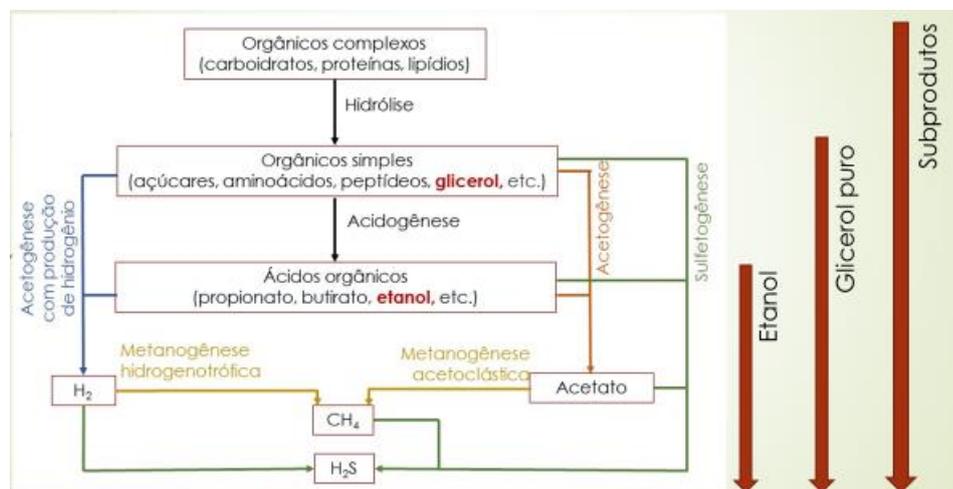


Figura 5.1 - Etapas da degradação anaeróbia necessárias para cada um dos substratos utilizados. Fonte: Chernicharo (2016) adaptado.

Houve aumento na remoção de sulfato no quarto mês com todos os substratos em relação aos resultados obtidos no segundo mês. O maior aporte de elétrons pode ter favorecido a

sulfetogênese, um dos fatores que podem ter contribuído para a melhor remoção de sulfato. Rotas metabólicas não sulfetogênicas podem consumir DQO, como por exemplo a redução de metais e metaloides da DM, formação de metano e de H₂, sendo que a competição por substrato pode ter sido minimizada mediante seu maior fornecimento. Embora não tenha ocorrido remoção completa de DQO mediante a relação DQO/SO₄²⁻ de 2, é possível que as moléculas residuais sejam moléculas de elevada massa molar indisponíveis às BRS. Para que o doador de elétrons disponível não seja o limitante do processo, outros trabalhos com subprodutos complexos utilizaram excesso de doador de elétrons. Mora *et al.* (2018), que utilizaram GB e DM com 220 mg.L⁻¹ de sulfato, tiveram os melhores resultados de remoção de sulfato com relação DQO/SO₄²⁻ de 7.

Além disso, o aumento da eficiência na remoção de sulfato também pode ter se dado pelo fato de que ao longo do tempo, as espécies de BRS resistentes ao abaixamento do pH possam ter sido selecionadas e conseqüentemente aumentando a abundância relativa de BRS. Também pode ter ocorrido seleção de espécies acetogênicas e metanogênicas que suportam o baixo pH formado no sistema. Embora sejam concorrentes das BRS pelo mesmo substrato, as espécies metanogênicas têm importante papel na manutenção de uma baixa pressão parcial de H₂. A baixa pressão parcial de H₂ é importante para manter uma termodinâmica favorável à degradação da matéria orgânica (CHERNICHARO, 2016). Como pode ser observado na Tabela 5.5, o rendimento energético dos microrganismos acidogênicos é maior que o dos demais grupos, fazendo com que estes apresentem um baixo tempo mínimo de geração (aproximadamente 30 minutos) e as taxas de crescimento mais elevadas do consórcio microbiano (CHERNICHARO, 2016). O metabolismo das espécies acetogênicas só é favorecido quando ocorre em simbiose com as espécies metanogênicas ou sulfetogênicas. Neste caso, o rendimento energético é dividido entre os indivíduos participantes da simbiose. A maior atuação dos grupos acetogênicos, metanogênicos e sulfetogênicos torna mais eficiente a cadeia de oxidação do substrato. A adaptação do consórcio às condições do meio não foi observada apenas mediante a eficiência de remoção de sulfato. Ainda que aumentando-se a DQO inicial, o pH efluente ainda foi mais alto, podendo ser um indicativo de maior consumo de intermediários metabólicos e, portanto, menor acúmulo de AGV e H⁺.

Tabela 5.5 - Rendimento energético de diferentes etapas da degradação anaeróbia. Fonte: adaptado de Chernicharo (2016).

	Reação	ΔG° (kJ. mol ⁻¹)
Acidogênese	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 2 CO_2 + 2H^+ + 4H_2$	-206
	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COO^- + 2 H_2O + 2 H^+$	-358
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2 CO_2 + H^+ + 2 H_2$	-255
Acetogênese	$CH_3CH_2COO^- + 3 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3 H_2$	+76
	$CH_3CH_2COO^- + 2 HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3 HCOO^-$	+72
	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + H^+ + 2 H_2$	+48
Metanogênese	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31
	$3 H_2 + 0,75 HCO_3^- + 0,75 H^+ \rightarrow 0,75 CH_4 + 2,25 H_2O$	-102
	$CH_3CH_2COO^- + 1,75 H_2O \rightarrow 1,75 CH_4 + 1,25 HCO_3^- + 0,25 H^+$	-57

O acúmulo de H₂ pode resultar em acúmulo de ácidos orgânicos reduzidos, tais como propionato e butirato, cujas degradações são termodinamicamente inibidas por altas taxas de H₂ dissolvido, acetato e metanoato (ácido fórmico) (CASTRO *et al.*, 2004). O acúmulo destes intermediários metabólicos consome alcalinidade, assim comprometendo a manutenção da neutralidade do pH e o equilíbrio entre as espécies participantes da digestão anaeróbia. Quando o H₂ formado é rapidamente e efetivamente consumido, passa a ocorrer degradação de propionato, butirato e etanol. As reações acetogênicas a partir de propionato, butirato e etanol só são termodinamicamente viáveis em interação com espécies acetoclásticas e hidrogenotróficas.

O consórcio microbiano também pode ter se adaptado à presença de moléculas tóxicas provenientes da DM, dos substratos ou formadas a partir da oxidação destes. O melhor estabelecimento das vias de oxidação incompleta e completa também são expressas pelo consumo de DQO, mostrado na Figura 5.2.

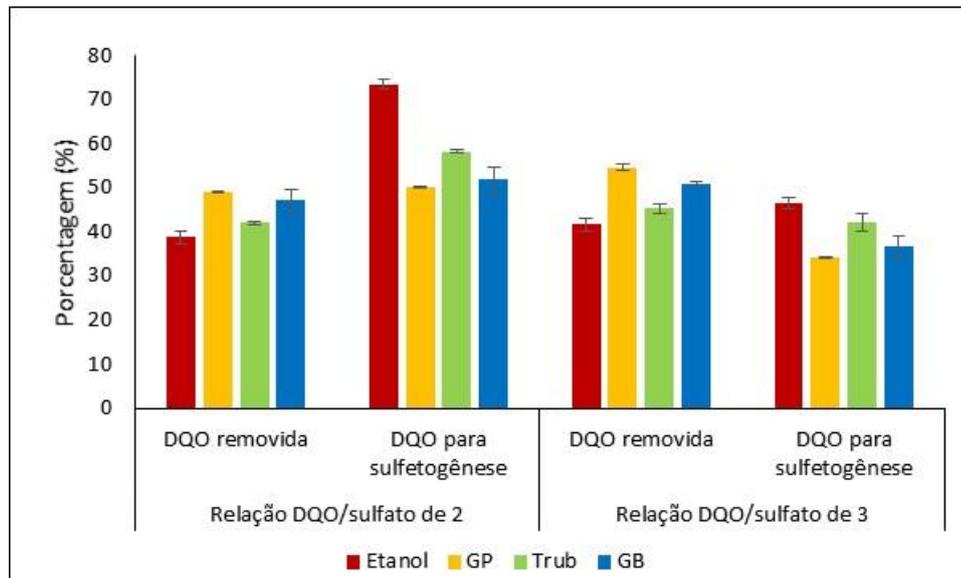


Figura 5.2 - Consumo e uso da DQO em vias metabólicas de redução de sulfato. Fonte: da autora.

O consumo de substrato aumentou ao longo do tempo e do aumento da sua concentração inicial. Assim como o aumento da remoção de sulfato, os resultados obtidos acerca da oxidação do substrato também revelaram que os consórcios microbianos se adaptaram às condições de cada sistema. As vias metabólicas não sulfetogênicas de oxidação completa ocorreram com todos os substratos nas duas condições, sendo maior com maior aporte de elétrons. O etanol, substrato mais lábil utilizado, não foi o que promoveu a maior remoção de DQO, porém nas duas condições foi o que mais favoreceu a rota sulfetogênica de consumo de elétrons. Com menor concentração de substrato (DQO/SO₄²⁻ de 1) Cunha et al. (2020) obtiveram 69% de DQO consumida direcionada para sulfetogênese. Com maior variabilidade de moléculas de origem e formadas por oxidação incompleta, os demais substratos provavelmente ativaram maior número de vias de oxidação completa. É possível que uma maior diversidade de espécies metanogênicas e redutoras de metais e metaloides possam ter tido seus metabolismos ativados por uma maior diversidade de moléculas disponíveis. Porém, a menor proporção de elétrons direcionada para sulfetogênese com os substratos GP, GB e trub mediante excesso de aporte de elétrons e período de adaptação, não foi um impedimento para remoção de sulfato.

Vias de oxidação incompleta do trub levam ao acúmulo de ácidos orgânicos como acético, butírico e capróico (PERIMENIS *et al.*, 2018). A oxidação incompleta do glicerol por sua vez pode gerar acetato, lactato e 1,3-propanodiol (SANTOS; JOHNSON, 2018), propionato

(QATIBI *et al.*, 1991) ou butirato (BERTOLINO *et al.*, 2012). A DQO residual somada à diminuição de pH são indicativos de que tenha ocorrido acúmulo de AGV a partir dos subprodutos testados. Utilizando GB, Zamzow *et al.* (2007) constataram que depois de adaptado ao respectivo substrato, as BRS usam os intermediários metabólicos da degradação do glicerol mais completamente do que o fazem com o acetato produzido com a oxidação do etanol. Os resultados obtidos no presente trabalho e os publicados por Zamzow *et al.* (2007) reforçam o que disseram Beaulieu *et al.* (2000) e Reisman *et al.* (2003) sobre o uso de fontes mistas de carbono favorecerem o tratamento de efluentes ricos em sulfato. Isso pode ser resultado do fato de que um inóculo que apresenta grande diversidade microbiana favorece a adaptação à uma fonte complexa de substrato. Com inóculo proveniente de um reator de tratamento anaeróbio de esgoto doméstico, Baêta *et al.* (2012) obtiveram sucesso no tratamento anaeróbio de substratos complexos como efluentes da indústria têxtil.

Pesquisas já haviam mostrado que trub e GB são boas fontes de carbono para formação de metano (BABA *et al.*, 2013; ALBUQUERQUE, 2014; ANDRIAMANOHARIISOAMANANA *et al.*, 2018; PERIMENIS *et al.*, 2018). Esta deve ser a principal rota metabólica que, sendo utilizada, resultou em menor proporção de elétrons direcionada para sulfetogênese com estes substratos em relação ao etanol. Porém, a proporção de elétrons direcionada para sulfetogênese foi maior com GB quando comparado ao GP nas duas condições. As moléculas tóxicas presentes no GB podem ter prejudicado mais as espécies metanogênicas do que as sulfetogênicas. Enquanto as BRS podem metabolizar substâncias inibidoras como alcanos, compostos aromáticos, organoclorados e AGCL, as metanogênicas são sensíveis a eles (COLLERAN *et al.*, 1995). O GB também promoveu maior proporção do consumo de elétrons na sulfetogênese em relação a outras vias metabólicas quando comparado com acetato, soro de leite, esterco suíno e vinhaça por Mora *et al.* (2018), que utilizavam DM com 220 mg.L⁻¹ de sulfato. Da mesma forma que no presente estudo, os resultados obtidos por Mora *et al.* (2018) também se aplicam quando comparados ao etanol, trub e GP e aplicados ao tratamento de efluentes com maiores cargas de sulfato, os quais exigem maiores concentrações de substrato. As impurezas presentes no GB podem ter indiretamente favorecido à redução de sulfato.

Apesar dos subprodutos utilizados apresentarem moléculas potencialmente tóxicas, moléculas recalitrantes e promoverem maior diminuição no pH, o trub e o GB, podem contribuir com o aporte de nutrientes. GB, por exemplo, pode apresentar íons de sódio (Na) (0,36–19 g.L⁻¹) e

potássio ($0,08\text{--}92\text{ g.L}^{-1}$) (SANTOS *et al.*, 2015), e o trub pode conter $10\text{--}50\text{ mg.L}^{-1}$ de fosfato (SIMATE *et al.*, 2011). Em ambientes com variedade de moléculas, a decomposição de carboidratos de cadeia longa e outras moléculas de alta massa molar pelos processos hidrolítico, acidogênico, acetogênico e metanogênico acetoclástico favorece a presença das BRS (JAMIL; CLARKE, 2013). Estas vias de degradação formam moléculas como o H_2 e metanoato (ácido fórmico), os quais são elementos chave da degradação sinérgica e excelentes doadores de elétrons para as BRS, como a *Desulfomicrobium* (SANTOS *et al.*, 2017). As vantagens do uso dos subprodutos conferidas ao consórcio anaeróbio foram suficientes para amenizar as desvantagens, de modo que a eficiência de remoção de sulfato com todos os substratos testados foi estatisticamente a mesma. A similaridade entre os valores de remoção de sulfato com os diferentes substratos foi verificada pela análise de variância (ANOVA), apresentando valor máximo de F 0,4988. O valor máximo F para os graus de liberdade (MQF) 3 e 8 foi 5,42. Também foi aplicado o teste Tukey com 95% de confiança (Figura 5.3).

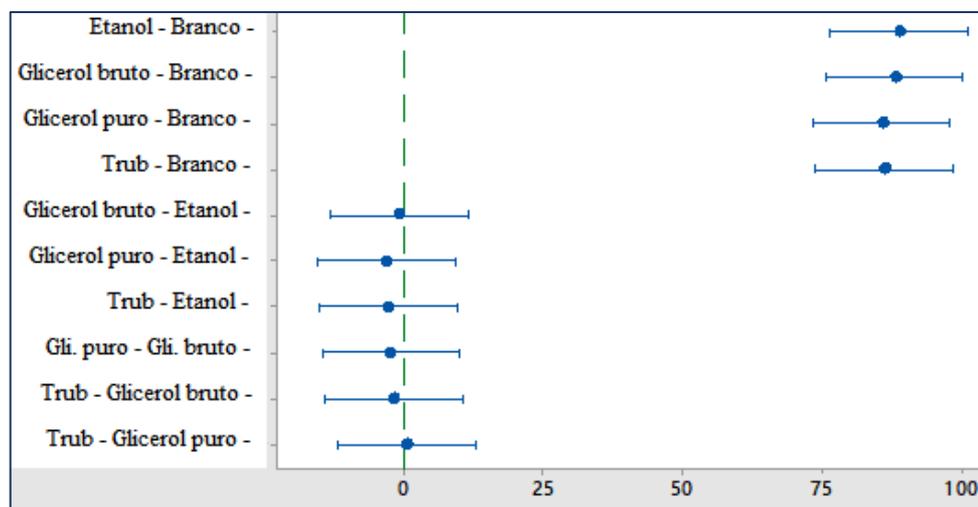


Figura 5.3 - Teste Tukey com 95% de confiança. Fonte: da autora.

Anteriormente ao desenvolvimento do presente trabalho, a viabilidade técnica do tratamento biológico de efluentes ricos em sulfato com BRS já era comprovado, no entanto, há uma limitação pelo custo na aquisição da fonte de carbono (BERTOLINO, *et al.*, 2012). Ao se comprovar que não houve diferença na eficiência na remoção de sulfato entre os doadores de elétrons testados, o uso dos subprodutos revelou-se mais sustentável em relação aos substratos puros. O uso de subprodutos é uma alternativa econômica e ambientalmente mais adequada

quando proporciona uma aplicação nobre aos resíduos, enquanto elude que outras cadeias de produção sejam deslocadas com consumo de matéria prima e geração de outros subprodutos. Baseado nos valores de DQO obtidos no presente trabalho e o custo dos substratos utilizados (QUISPE *et al.*, 2013 e CME 2020), cada 100 g de DQO de etanol apresenta um custo de US\$ 14,4, o GP de US\$ 0,1184 e o GB de US\$ 0,0053. Para obter 100 g de DQO, 538 mL de trub são consumidos, o qual não apresenta valor de mercado.

Além do efeito dos tipos de substratos, tempo de adaptação e relação DQO/SO_4^{2-} , é importante considerar o resultado da atmosfera utilizada neste trabalho. A criação de atmosferas com completa ausência de oxigênio em reatores de escala industrial é extremamente difícil (PEDIZZI *et al.*, 2016) e assim, para melhor aplicabilidade do sistema de escala laboratorial, o uso de uma atmosfera microaeróbia é vantajosa. A atmosfera microaeróbia não interrompeu a redução de sulfato, tal como obtido em outros sistemas sulfetogênicos com atmosfera não estritamente anaeróbia (MORA *et al.*, 2018). Apesar de ser um grupo estritamente anaeróbio, as BRS podem ser encontradas ativas em condições temporariamente aeróbias. As BRS podem empregar mecanismos como o deslocamento para regiões anóxicas, criação de microambientes anóxicos por meio da granulação e formação de sistemas enzimáticos que reduzem e eliminam oxigênio dissolvido. A presença de oxigênio dissolvido pode retardar a sulfetogênese, porém de modo geral a favorece em relação à metanogênese e acetogênese (MORA *et al.*, 2018).

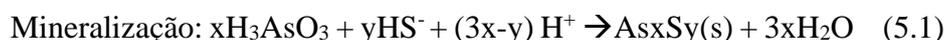
5.2.2 Eficiência na remoção de metais e metaloides dos sistemas com GB e trub na relação DQO/SO_4^{2-} de 3

Após 4 meses de operação dos reatores em batelada na relação DQO/SO_4^{2-} de 3, observou-se satisfatória remoção de metais diante do excesso de sulfeto formado em relação à quantidade de metais a serem precipitados. Na contabilização de erros estatísticos, a remoção de metal pode ser considerada semelhante entre os tratamentos com cada substrato. Visto que a remoção de metais ocorre por reação com o produto da sulfetogênese e a eficiência da redução de sulfato nas duas condições foi similar, é coerente que a remoção de metais também o tenha sido. Os resultados são apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Eficiência na remoção de metais e metaloides em porcentagem (%).

Fonte de carbono	As	Cd	Pb	Sb	Zn
GB	99,1±2,5	99,9±0,3	88,3±2,2	98,8±0,5	99,8±0,01
Trub	99,6±4,6	99,9±0,05	99,98±2,8	99,9±0,05	99,8±0,01

O sulfeto produzido na redução de sulfato apresenta afinidade química com alguns cátions metálicos promovendo precipitação de sulfetos metálicos em ampla faixa de pH (CHOUDHARY; SHEORAN, 2012). A completa precipitação dos metais e metaloides, somada com a constatação de consumo de DQO além da necessária para redução de sulfato ocorrida, são indicativos de que houve redução biológica de cátions. Assim, os cátions atingiram estados de oxidação passíveis de precipitação como sulfetos metálicos. A precipitação, sobretudo, foi possível pelas transformações bioquímicas. Exemplo disso é o que ocorre com as formas oxidadas de arsênio, As^{5+} , $H_2AsO_4^-$ e $HAsO_4^{2-}$, que são reduzidas pelas DARB para As^{3+} e H_3AsO_3 na presença de uma fonte de elétrons (VAN LIS *et al.*, 2013). Os cátions reduzidos de arsênio se precipitam como sulfetos de arsênio segundo a Equação 5.1, na qual $x = y = 1$, se o AsS estiver sendo formado; ou, $y = 1,5x$ se o As_2S_3 for o mineral formado.



A precipitação de sulfetos metálicos tem relação de causa e efeito sobre o pH ácido. A liberação de H^+ pode ter relação com a diminuição apresentada no pH dos sistemas. Caso não houvesse redução no pH, a precipitação de sulfetos de arsênio poderia não ocorrer. A bioprecipitação de sulfetos de arsênio já foi relatada com glicerol como doador de elétrons em pH 5 (BATTAGLIA-BRUNET *et al.*, 2012) e com etanol em pH 6,25-6,5 (RODRIGUEZ-FREIRE *et al.*, 2015). No entanto, em pH 7,4, Altun *et al.* (2014) constatou que houve falha na bioprecipitação de As.

A precipitação de metais e metaloides é fundamental para o tratamento da DM. Os resultados revelam que o sistema com trub e com GB como doadores de elétrons na relação DQO/ SO_4^{2-} de 3 após 4 meses de adaptação funciona também para estes poluentes. Ambos os subprodutos testados, trub e GB podem ser utilizados como doadores de elétrons para o tratamento da DM. Os resultados foram obtidos de sistemas microaeróbios com efluentes reais, o que aproxima as

condições de escala laboratorial das ocorridas em escala industrial. Análises estatísticas revelaram que não há diferença significativa entre os subprodutos e os doadores de elétrons puros para os sistemas testados. Apesar da mesma eficiência, os dois subprodutos avaliados consistem em doadores de elétrons mais vantajosos econômica e ambientalmente. O tratamento de DM com estes doadores de elétrons proporcionou aplicações nobres aos subprodutos, fechando ciclos de recursos naturais já explorados, enquanto evitou que novas cadeias de produção sejam deslocadas. No caso do trub, não há custo de aquisição embutido. O GB é 22 vezes mais barato que o GP e 2700 vezes mais barato que o etanol. A fabricação de biodiesel também apresenta custos ambientais, porém, neste caso, o GB é um subproduto e não o objeto que movimentou o setor industrial.

5.3 Aspectos gerais da comunidade microbiana do inóculo inicial e do lodo proveniente dos sistemas sem fonte de carbono e com cada tipo de doador de elétrons

Após quatro meses de funcionamento dos reatores, o inóculo proveniente de cada um dos cinco tipos de sistemas foram comparados entre si e com o inóculo inicial, o qual era proveniente do reator metanogênico de tratamento de esgoto. Os tipos de sistemas mencionados dizem respeito aos reatores que receberam os substratos trub, GB, GP e etanol, e o sistema que recebeu apenas DM sem nenhum substrato, o controle endógeno. O objetivo foi de comparar diferenças na forma como cada substrato pode influenciar a composição do inóculo, selecionando diferentes grupos microbianos. A análise das 6 amostras revelou uma soma de 480 gêneros, dos quais, 469 pertencentes ao Domínio *Bacterias* e 11 pertencentes ao Domínio *Archaeas*.

A biodiversidade obtida em cada um dos sistemas pode ser observada na Figura 5.4. O sistema que foi submetido à presença de apenas DM sem fornecimento de substrato proporcionou diminuição da biodiversidade. Dos gêneros presentes no inóculo inicial, 55 não foram detectados no controle endógeno, porém, destes gêneros, apenas 6 não foram determinados também nos sistemas que receberam além de DM, um substrato: *Streptosporangium*, *Gallionella*, *Propionibacterium*, *Saccharibacter*, *Hartmannibacter stappia* e *Thiorhodovibrio*. A DM pode ter afetado a presença destes gêneros, enquanto os outros 49 gêneros devem ter sido desfavorecidos devido à falta de substrato orgânico. Foram detectados 44 gêneros no

controle endógeno que não estavam presentes no inóculo inicial. Possivelmente trata-se de espécies fornecidas pela DM. O sistema com etanol foi o único a proporcionar aumento da biodiversidade do inóculo. Possivelmente a DM proporcionou espécies que se reproduziram exclusivamente na presença de etanol, as quais não tiveram representatividade nos demais sistemas.

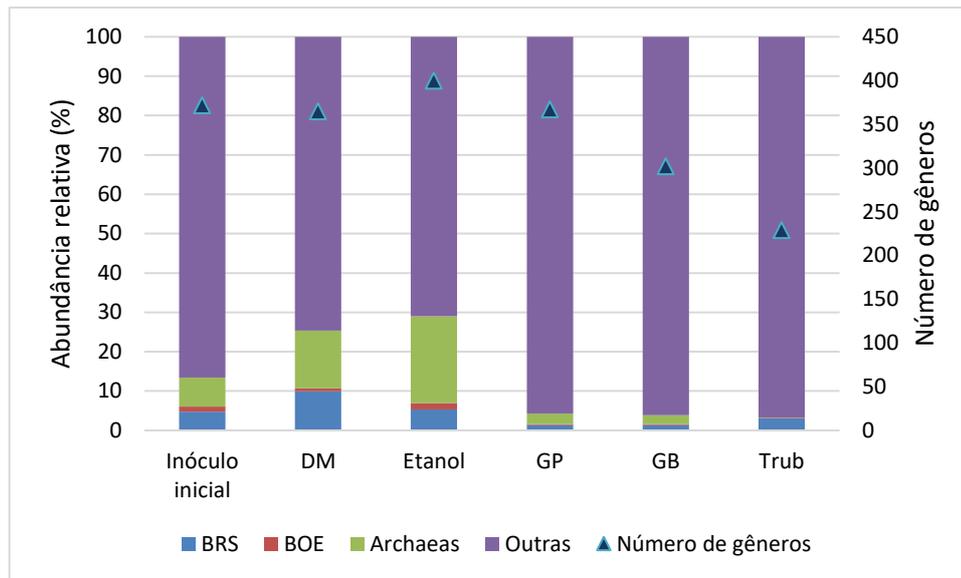


Figura 5.4 - Biodiversidade e abundância relativa dos grupos BRS, BOE, *Archaeas* no lodo de cada um dos sistemas. Fonte: da autora.

Houve um aumento na representatividade de BRS com o fornecimento de DM. Pode ter ocorrido reprodução de espécies deste grupo mediante a alta concentração de sulfato e a baixa concentração de doador de elétrons (resíduo do tratamento de esgoto doméstico e proveniente de morte celular). Além disto, a própria DM pode ter contribuído com o fornecimento de indivíduos de BRS, já que a ocorrência deste grupo em ambientes de DM é confirmada (BOMBERG *et al.*, 2015). No entanto, a abundância relativa de BRS foi baixa em todos os sistemas. Embora a representatividade dos redutores de sulfato tenha sido baixa, Pester *et al.* (2010) afirmam que espécies com representatividade abaixo de 0,006% do total de genes, podem ter uma participação significativa na redução de sulfato, o que também é confirmado por Motteran *et al.* (2018). Na pesquisa de Mora *et al.* (2018), a remoção de 90% do sulfato é realizada com um inóculo contendo apenas 1,19% de BRS. No presente estudo, a porcentagem de BRS isoladamente parece ter tido pouca influência na remoção do sulfato atingida, já que ela variou significativamente entre os substratos que promoveram a mesma eficiência de

remoção de sulfato. O equilíbrio da eficiência na remoção de sulfato entre os substratos pode, então, ter sido proporcionada pela variação na proporção de outros grupos direta ou indiretamente relacionados com a sulfetogênese, conforme descrito a seguir.

É possível notar que ocorreu diminuição da biodiversidade com os doadores de elétrons GP, GB e trub. A representatividade dos grupos BRS, *Archaeas* e Bactérias oxidantes de enxofre (BOE) também foi menor nestes sistemas. O fato de que estes substratos proporcionaram redução do pH efluente para valores abaixo de 5 pode estar relacionada com a formação de um lodo menos diverso, onde as espécies menos resistentes à acidez foram prejudicadas.

As espécies de BOE promovem oxidação de enxofre e sulfeto com formação de ácido sulfúrico, ou seja, uma rota que proporciona um atraso para a remoção de sulfato. A diminuição da representatividade de ambos os grupos (BRS e BOE) simultaneamente com os substratos GP, GB e trub pode ser um importante fator em proporcionar um equilíbrio, no qual, mesmo com menor abundância relativa de BRS, estes sistemas apresentaram a mesma eficiência de remoção de sulfato do que o sistema com etanol. O aumento na abundância relativa de BRS e diminuição de BOE no controle endógeno demonstra que, possivelmente, a DM possa ser utilizada para adaptar um inóculo de reator metanogênico à sulfetogênese. Com etanol, houve aumento na representatividade de BRS, porém, com esse substrato as BOE também apresentaram maior abundância relativa em relação ao inóculo inicial, passando de 1,2 para 1,7%.

Os gêneros de BOE *Xanthomonas*, *Thiofaba* e *Thiomonas* (CHO *et al.*, 1992; MORI; SUZUKI, 2008; ASANO *et al.*, 2011) estavam representados no inóculo inicial com as abundâncias relativas de 0,01; 0,04 e 0,1%, respectivamente, e não foram detectados com os substratos GB e trub. Com etanol estes gêneros ainda eram representados nas abundâncias relativas de 0,01; 0,01 e 0,07% respectivamente. O gênero de BOE *Sphingomonas* (LI *et al.*, 2011) estava representado por 0,24% do inóculo inicial e diminuiu para 0,01% com GB e não foi detectado com GP e trub, enquanto aumentou para 0,39% com etanol. Os gêneros *Hyphomicrobium* (degradador de compostos de enxofre com a geração de sulfato - MURAKAMI *et al.*, 2002) e a BOE *Leucobacter* (SHI *et al.*, 2019) também tiveram suas representatividades aumentadas com etanol, de 0,21 para 0,32% e de 0,45 para 0,72%, respectivamente. Estes gêneros tiveram suas representatividades diminuídas para 0,08% com GB e 0,01% com trub. Os gêneros de BOE *Achromobacter*, *Sulfuricurvum*, *Thiobacillus*, *Thiohalophilus* e *Tumebacillus* (JADHAV; JADHAV, 2017; HAN *et al.*, 2012; FUKUSHIMA *et al.*, 2013; FUKUSHIMA *et al.*, 2013 e

USHER *et al.*, 2014), tiveram suas representatividades reduzidas com GB e trub para valores abaixo de 0,01%. As *Sulfurovum*, outro gênero de BOE (HUANG *et al.*, 2016), apresentaram uma diminuição menos acentuada, passando de 0,08 para 0,07; 0,05; 0,06 e 0,04% de abundância relativa com os substratos etanol, GP, GB e trub, respectivamente. Todos os gêneros de BOE mencionados tiveram diminuição para abundâncias relativas inferiores a 0,02% no controle endógeno, exceto os gêneros *Sulfurovum*, *Hyphomicrobium* e *Leucobacter*. O primeiro manteve sua representatividade, *Hyphomicrobium* teve sua abundância relativa diminuída para 0,1% e *Leucobacter* foi favorecido chegando a 0,51% neste sistema.

Apesar do domínio *Archaeas*, o qual apresenta espécies metanogênicas, estar presente proporcionando a funcionalidade dos digestores metanogênicos (MORA *et al.*, 2018), são espécies fermentadoras e acetogênicas que normalmente são mais abundantes neste tipo de ambiente (KEFENI *et al.*, 2017). Os grupos fermentadores e acetogênicos foram representados na Figura 5.4 incluídos em “outros”, o grupo mais abundante em todas as condições. O domínio *Archaeas* teve representatividade significativa no inóculo inicial. A maior abundância relativa do grupo de *Archaeas* e BRS obtida no controle endógeno e com etanol pode ser resultado de uma diminuição na representatividade dos grupos hidrolíticos e acidogênicos, os quais estão incluídos no item “outros” na Figura 5.4. Indivíduos hidrolíticos degradam proteínas, carboidratos e lipídios. As espécies acidogênicas oxidam açúcares, aminoácidos, peptídeos e glicerol com elevado rendimento energético (CHERNICHARO, 2016), ou seja, moléculas que não estão presentes nestes sistemas. No controle endógeno, as células mortas podem ter fornecido uma pequena quantidade de elétrons ao consórcio, que nesta condição e sob o pH neutro da DM, favoreceu BRS e metanogênicas quando comparado ao grupo “outros”.

Ao contrário, a representatividade do grupo “outros” foi maior nos sistemas onde as moléculas que estimulam a hidrólise e a acidogênese estão presentes (GP, GB e trub). Com maior rendimento energético que os grupos metanogênicos e sulfetogênicos, o crescimento populacional das espécies acidogênicas é mais acelerado na presença de doadores de elétrons adequados a este grupo (CHERNICHARO, 2016). Enquanto o grupo acidogênico gera ácidos orgânicos e álcoois, muitas espécies de BRS e *Archaeas* promovem oxidação completa destes doadores de elétrons durante a metanogênese e sulfetogênese. A menor representatividade de BRS e *Archaeas* em relação à categoria “outros” contendo as espécies acidogênicas e hidrolíticas nos sistemas com GP, GB e trub pode estar relacionado com acúmulo de ácidos

orgânicos, os quais são responsáveis por liberação de prótons H^+ , consumo de alcalinidade e, portanto, pode ter relação com o menor pH efluente obtido nestes sistemas.

Segundo Sánchez *et al.* (2014), espécies metanogênicas e BRS são sensíveis ao baixo pH, portanto a menor representatividade destes grupos pode também ter relação de consequência relacionada ao baixo pH efluente. No entanto, como com GP e GB houve maior representatividade de *Archaeas* comparativamente ao sistema com trub. Embora visualmente o Domínio *Archaea* tenha perdido sua representatividade na Figura 5.4 com os substratos GP, GB e trub, seus valores foram, respectivamente, 2,64; 2,3 e 0,07%. As *Archaeas* podem ter sido afetadas também por moléculas do trub ou formadas da oxidação parcial destas. A representação significativa do domínio *Archaeas*, ainda que inferior à entrada, com GP e GB pode ser explicado pelo fato de que algumas espécies metanogênicas podem criar micronichos com pH mais elevado que o restante do meio (SÁNCHEZ *et al.*, 2014). A diminuição de bactérias metanogênicas favorece o tratamento em duas etapas. Além de minimizar a competição com BRS na fase sulfetogênica, maior quantidade de substrato pode ser preservada em solução, podendo ser aplicado em etapa posterior com produção de metano. Após a etapa sulfetogênica, o efluente pode ser aplicado estimulando espécies metanogênicas em outro compartimento, ou pode ser aplicada a recuperação de ácidos orgânicos de interesse comercial.

Os gêneros de *Archaeas* com abundância relativa acima de 0,02%, em pelo menos um dos sistemas, estão representados na Tabela 5.7 com suas respectivas abundâncias relativas. *Methanobacterium* foi o segundo gênero mais bem representado no inóculo inicial, no sistema endógeno e com etanol. Com GP e GB este é o quinto gênero mais representado. Com trub o *Methanobacterium* é o único gênero de *Archaea* presente e aparece apenas como 23º gênero mais representado. Com GB o gênero *Methanosaeta* é o 17º mais representado.

Tabela 5.7 – Gêneros de *Archaeas* com abundância relativa acima de 0,02% em pelo menos um dos sistemas. Fonte: da autora.

Gênero	Abundância relativa (%)					
	Inicial	Endógeno	Etanol	GP	GB	Trub
<i>Methanobacterium</i>	7,12	14,43	21,57	2,49	2,05	0,06
<i>Methanosaeta</i>	0,16	0,12	0,28	0,10	0,23	0,00
<i>Methanobrevibacter</i>	0,12	0,10	0,15	0,04	0,02	0,00

Methanobacterium e *Methanosaeta* podem interagir sintróficamente com BRS como a *Desulfovibrio*. Nessa interação, os produtos metabólicos da oxidação incompleta pelas BRS, como o acetato, são consumidos pelas metanogênicas e o H₂ produzido pelas *Methanobacterium* é consumido pelas BRS, aumentando a eficiência da redução dissimilatória de sulfato (POZO *et al.*, 2015). Os autores obtiveram melhora na remoção de sulfato e atribuíram o fato ao enriquecimento das *Methanobacterium*. A produção de H₂ por espécies metanogênicas é um mecanismo de proteção para lidar com fornecimento de elétrons em excesso (DEPPENMEIER; MULLER, 2008), o que se aplica às condições utilizadas nesta pesquisa. *Methanobacterium* podem atuar em elevadas pressões parciais de H₂ por meio da interconversão de H₂ e H⁺. Esses microrganismos usam hidrogenases para catalisar a produção de H₂ a partir do excesso de elétrons e minimizar a carga negativa próxima à célula microbiana.

Todos os gêneros envolvidos nesta interação sintrófica estão representados na Figura 5.5, na qual são exibidas as abundâncias relativas dos gêneros que estão entre os 20 mais representados em pelo menos um tipo de sistema e que apresentam abundância relativa de pelo menos 1% em ao menos um dos sistemas. A elevada representatividade destes gêneros pode ser um indício de que esta interação sintrófica tenha tido influência favorável à redução de sulfato também na presente pesquisa com todos os doadores de elétrons. A abundância relativa de *Desulfovibrio* foi de 0,24 a 1% nos sistemas com doadores de elétrons, bastante acima da mencionada por Pester *et al.* (2010) para que seja significativa para remoção de sulfato (0,006%).

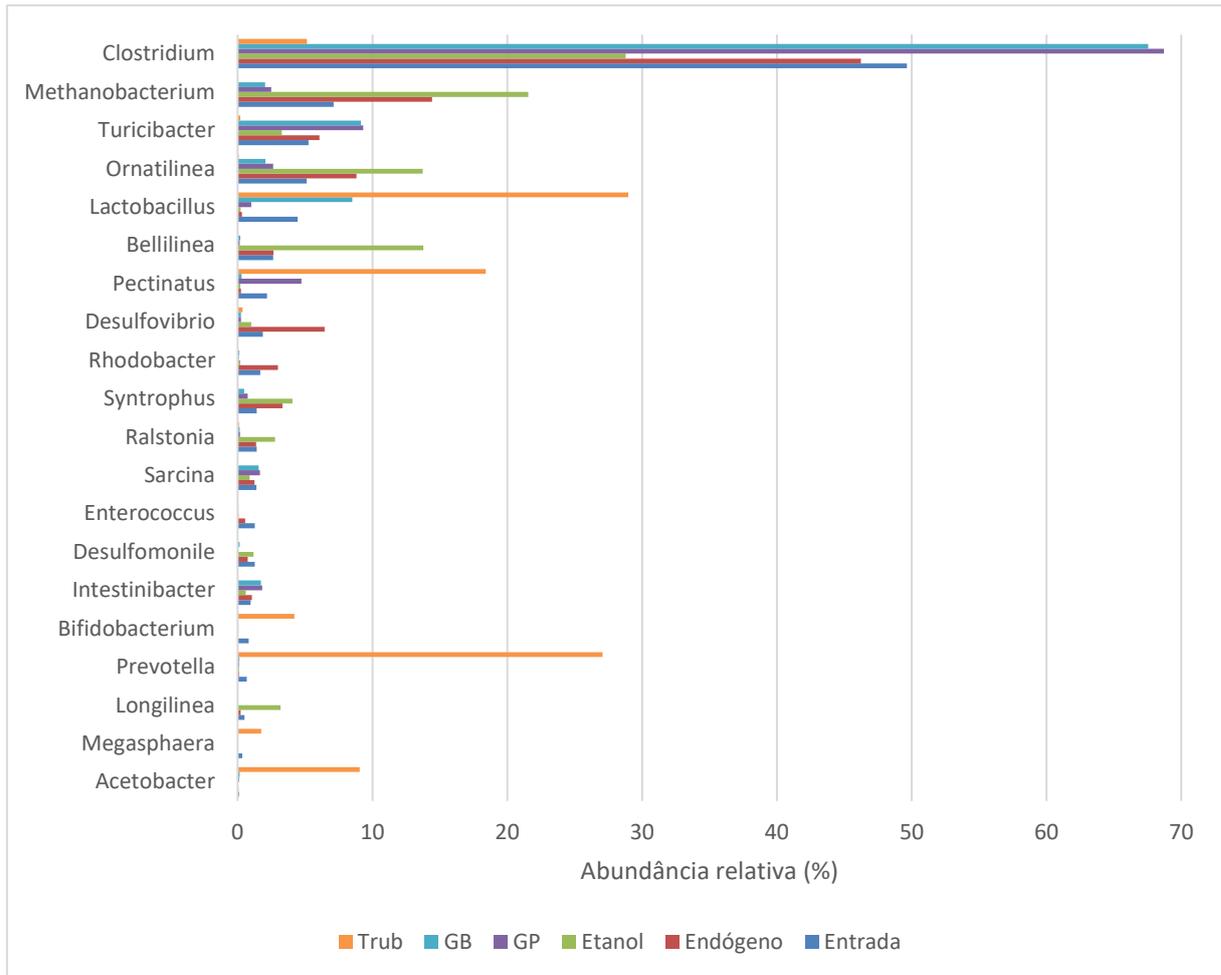


Figura 5.5 - Abundância relativa dos 20 gêneros melhor representados em pelo menos um dos tipos de sistemas. Fonte: da autora.

O gênero *Clostridium* foi o mais abundante em todas as condições, exceto com trub. Ele apresenta importante papel na formação de intermediários metabólicos utilizados pelas BRS. Este gênero já foi referido como significativo representante de lodos aplicados à sistemas ricos em sulfatos e alimentados com glicerol (MORA *et al.*, 2018). Estas espécies têm papel hidrolítico, fermentativo e acetogênico, formando moléculas como H_2 e 1,3-propanodiol (ALBUQUERQUE, 2014), butirato, acetato e etanol (BAXTER *et al.*, 2019) e lactato (GUO *et al.*, 2017). Além de atuarem como fermentadores, a possibilidade de algumas espécies de *Clostridium* terem papel direto na redução de sulfato não deve ser desconsiderada. Algumas espécies do gênero *Clostridium* podem reduzir compostos de enxofre devido à presença da enzima sulfeto desidrogenase (FLORENTINO, 2017). *Clostridium sp.* BXM reduz o sulfato para compostos reduzidos de enxofre (BAO *et al.*, 2012). Varon (2013) aponta o gênero como ativo na redução dissimilativa de compostos de enxofre em sulfetos.

Além do *Clostridium*, alguns gêneros fermentadores presentes na Figura 5.5 se adaptaram à DM, provavelmente sendo mantidos no controle endógeno por elétrons provenientes de morte celular. Porém, também como ocorreu com *Clostridium*, não se adaptaram ao sistema com trub. Foi o caso dos gêneros *Turicibacter*, *Ornatilinea*, *Intestinibacter* e *Sarcina*. O principal produto metabólico de *Turicibacter* é o lactato (HERRMANN *et al.*, 2018), formado a partir da degradação de maltose e 5-cetogluconato (BOSSHARD *et al.*, 2002). O metabolismo conhecido das *Ornatilinea* não explica o motivo da alta representatividade deste gênero com etanol. *Ornatilinea* fermenta açúcares com a geração de acetato, etanol e H₂ e diminuiu com GP, GB e trub, possivelmente porque seu pH ideal é de 7,5 a 8 (PODOSOKORSKAYA *et al.*, 2012). Já o gênero *Sarcina* que pode se adaptar a baixos valores de pH, se adaptou com GP e GB. *Sarcina* produz etanol fermentando carboidratos (ODDÓ; DÍAZ, 2019). *Intestinibacter* fermenta glicose em ácido acético, ácido isovalérico e ácido fenilacético (PAA) (SONG *et al.*, 2004). Além destes gêneros de fermentadores que foram representados na Figura 5.5, outros tiveram o mesmo comportamento diante da presença de DM e no sistema com trub, os quais são mostrados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Abundância relativa de gêneros fermentadores com resistência à presença de DM e sensibilidade à presença de trub. Fonte: da autora.

Gênero	Abundância relativa (%)					
	Inicial	Endógeno	Etanol	GP	GB	Trub
<i>Syntrophorhabdus</i>	0,056	0,066	0,110	0,031	0,033	0,005
<i>Eubacterium</i>	0,185	0,177	0,134	0,181	0,193	0,009
<i>Lachnoclostridium</i>	0,012	0,018	0,007	0,032	0,037	0,007
<i>Lachnospira</i>	0,034	0,040	0,015	0,049	0,064	0,001

A fermentação de algumas moléculas por *Syntrophorhabdus* só se torna energeticamente viável quando promovida em atividade sintrófica com espécies metanogênicas ou redutoras de sulfato (JUNGHARE *et al.*, 2019). O gênero *Eubacterium* fermenta glicerol, açúcares e 1,2-propanodiol a H₂, ácido fórmico (metanoato), succínico, butírico, acetato, lactato, 3-hidroxi-propionaldeído, propionato e cobalamina (TAKADA *et al.*, 2016; ENGELS, *et al.*, 2016), o que pode explicar sua abundância com GB. *Lachnoclostridium* fermenta carboidratos

com a produção de H₂, etanol e acetato (STEER *et al.*, 2001). *Lachnospira* é um gênero ruminal degradador de glicose e pectina (DUSKOVA; MAROUNEK, 2001).

A maioria destes gêneros não foram prejudicados com GP ou GB, o que mostra que não é a diminuição do pH efluente a causa de suas menores abundâncias com trub. Características deste substrato ou de moléculas formadas a partir dele, deve ser a causa da diminuição da representatividade destes gêneros. Embora o trub seja rico em açúcar, estes gêneros fermentadores de açúcares não se desenvolveram bem com este substrato, se adaptando ao sistema com GB.

Já outros gêneros foram prejudicados em todos os sistemas onde ocorreu redução no pH efluente. Além da diminuição na abundância relativa observada no Domínio *Archaea*, também ocorreu diminuição de outras espécies que competem por substrato com as BRS. *Syntrophus* cresce em simbiose com espécies metanogênicas e compete com BRS por substrato (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). A menor representatividade deste gênero juntamente com o gênero *Methanobacterium* nos sistemas com GP, GB e trub pode ter proporcionado influência favorável à remoção de sulfato nestes sistemas.

A diminuição do pH efluente também parece ter prejudicado os gêneros *Rhodobacter* e *Ralstonia*, os quais são redutores assimilativos de sulfato (MARIETOU *et al.*, 2018 e SINGH *et al.*, 2012). O gênero *Rhodobacter* foi favorecido pela presença de DM, porém, possivelmente o excesso de doador de elétrons foi o que prejudicou este gênero, pois nem com etanol, sistema onde houve pouca diminuição do pH efluente, o gênero apresentou boa representatividade. Já a abundância relativa de *Ralstonia* que é resistente à presença de metais (SARRET *et al.*, 2005), não sofreu alteração pela presença de DM sem fornecimento de elétrons. Este gênero parece ter sido favorecido mediante a presença de um doador de elétrons, porém sensível à diminuição do pH (Figura 5.5).

O lodo obtido no sistema onde foi aplicado trub, demonstrou ter sido fortemente afetado por espécies comumente encontradas nos ambientes de cervejarias. Os gêneros *Acetobacter*, *Pectinatus* e *Megasphaera* oxidam açúcares e álcoois de açúcar e são degradadores de cerveja (KOMAGATA *et al.*, 2014, SCHLEIFER *et al.*, 1990; MATOULKOVÁ; KUBIZNIAKOVÁ, 2014; PARADH, 2015). *Pectinatus* e *Megasphaera* são produtores de H₂S (JUVONEN 2006), no entanto não foram encontradas referências que atribuam a função de redutores de sulfato à estes gêneros. Observou-se que no sistema com trub, houve aumento na abundância destes

gêneros (Figura 5.5). Outro gênero associado à presença de trub é o *Lactobacillus*, o qual realiza a fermentação ruminal de grãos de cerveja (MAMUAD *et al.*, 2017) e são identificados como importantes fermentadores de trub com produção de proteases (SADH *et al.*, 2018). A proliferação de *Lactobacillus* deve estar relacionada à alta concentração de açúcares no trub. *Lactobacillus* é conhecido pela produção de lactato e embora não possam oxidar glicerol, metabolizam uma grande diversidade de açúcares: galactose, D-glicose, D-frutose, D-manose, Na-cetilglucosamina, arbutina, salicina, celobiose, maltose, lactose, sacarose, trealose, amido e b-gentiobiose (ROOS *et al.*, 2005), L-arabinose, ribose, melibiose, rafinose e gluconato (WATANABE *et al.*, 2009). Os autores já mencionaram a capacidade do gênero em se adaptar em pHs de 4 a 8,5, o que pode ter favorecido sua reprodução nos sistemas com diminuição do pH.

O gênero *Bifidobacterium* sintetiza b-frutose, hidrolases incomuns entre bactérias e fermentam seletivamente frutooligossacarídeos em detrimento de outros carboidratos (MAO *et al.*, 2018). É possível que estes carboidratos estejam presentes no trub, causando estímulo ao gênero. O trub pode ter fornecido indivíduos destes grupos e favorecido a reprodução dos mesmos devido ao fornecimento de doadores de elétrons adequados.

As *Selenomonas*, outro gênero comum em reatores de produção de cerveja (TAKESHITA *et al.*, 2012 e SCHLEIFER *et al.*, 1990), embora não estejam representadas na Figura 5.5, tiveram sua abundância relativa aumentada de 0,1 para 0,8% com trub. Com GP e GB estes valores são de 0,5 e 0,6%, respectivamente, e no controle endógeno e com etanol menores que 0,01%. *Selenomonas* é um gênero ativo na degradação do glicerol (LINEHAN *et al.*, 1978) e glicose (SCHLEIFER *et al.*, 1990). Nenhuma descrição do gênero foi encontrada na redução dissimilativa de sulfato, mas o gênero contribui para a produção de sulfeto a partir de aminoácidos contendo enxofre (HUNGATE, 1966).

Enterobacter também não aparece na Figura 5.5, mas é um gênero que teve sua abundância relativa aumentada de 0,3 para 0,6% com trub mantendo-se com os demais substratos. O gênero apresenta espécies que oxidam o tiosulfato com D-Glicose D-Xilose D-Mannose L-Arabinose como fonte de carbono, como a *E. hormaechei* (KIM *et al.*, 2008). A espécie também degrada a lignina devido à produção de lignina peroxidase (LiP) (ZHOU *et al.*, 2017), molécula esta, disponível no trub. *Enterobacter* também pode atuar na degradação do glicerol com a produção de produtos de valor agregado como 1,3-propanodiol, etanol e H₂ (ALBUQUERQUE, 2014).

Olsenella teve sua abundância relativa diminuída de 0,3 para valores menores que 0,1 em todas as condições, exceto com trub, onde chega a 0,5%. Este gênero também fermenta carboidratos e açúcares possivelmente encontrados no trub, glicose, glicogênio, trealose, amido, frutose, maltose, manose, salicina, sacarose e hidrolisa a esculina (LI *et al.*, 2015).

Outro gênero que possivelmente teve sua representatividade aumentada no sistema com trub devido à presença de açúcares, é o *Prevotella*. Este gênero é capaz de metabolizar uma grande variedade de açúcares, incluindo polissacarídeos complexos, como celulose e hemicelulose, moléculas encontradas em grandes quantidades no trub. O gênero ruminal *Prevotella* possui l-cisteína desulfidrase, uma enzima que produz H₂S (YONO *et al.*, 2009) e pode estar relacionado com a remoção de sulfato neste sistema. *Prevotella* já foi encontrado em sistemas com concentração de sulfato de 211 mg.L⁻¹ e alta relação de DQO/SO₄²⁻ (de 10,7 a 63,8) com remoção de 98 e 86% de sulfato e DQO, respectivamente (SHAN *et al.*, 2017). *Prevotella* também foi detectado no sedimento do Rio Tinto da Espanha (FLORENTINO, 2017), ou seja, o gênero tem um bom estabelecimento em ambientes ricos em sulfato com baixo pH, característica do Rio Tinto e do reator com trub.

Já o gênero da flora ruminal *Ruminococcus*, diferente dos demais, teve sua abundância relativa diminuída com trub (de 0,4 para 0,04%), enquanto aumentou com GP (0,7%) e com GB (0,8%). Sem substrato e com etanol a abundância relativa de *Ruminococcus* também havia diminuído (0,4 e 0,3%). Alguns gêneros da microflora ruminal também são capazes de metabolizar o glicerol, que é incluído na composição dos fosfolipídios da parede celular das plantas e nos lipídios de reserva das sementes das plantas (ROGER *et al.*, 1992). O gênero *Ruminococcus*, além de oxidar celulose e atuar na degradação da cerveja, é ativo na fermentação do glicerol (SCHLEIFER *et al.*, 1990; ALBUQUERQUE, 2014 e MOHAJERI, *et al.*, 2018). A representatividade de *Cellulosilyticum* também apresentou aumento junto ao GP e GB (de 0,06 para 0,1 e 0,7%, respectivamente) enquanto diminuiu com trub (0,002%), apesar deste gênero ser um degradador de celulose (ADELSKOV; PATEL, 2017; CAI *et al.*, 2010;).

O trub foi o substrato que proporcionou o lodo mais específico, diminuindo a biodiversidade, proporcionando redução da abundância relativa dos grupos *Archaeas* e BOE, e também apresentando gêneros não representados em nenhuma outra condição: *Geothermobacter* (0,004%), *Candidatus kuenenia* (0,003%), *Limnobacter* (0,003%), *Steroidobacter* (0,003%), *Steroidobacter* (0,003%), *Vitreoscilla* (0,003%), *Ammoniibacillus* (0,001%) e *Anaerolinea*

(0,001%). Apenas 3 gêneros foram exclusivos do sistema com GB: *Sphaerisporangium* (0,006%), *Dethiobacter* (0,001%) e *Coralimargarita* (0,001%). 178 gêneros foram representados em pelo menos uma das condições e não foram detectados quando GB foi utilizado como substrato. A quantidade de gêneros que não foram detectados apenas com trub, foi 252, dos quais, 12 representantes de BRS: *Desulforegula*, *Desulfoglaeba*, *Desulfobacter*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacula*, *Desulfatibacillum*, *Desulfonatrum*, *Desulfatitalea*, *Desulfocaldus*, *Desulfitobacterium*, *Dethiobacter* e *Desulfuromusa*. Estes gêneros prejudicados na presença de trub também não foram detectados com GB, exceto *Desulfonatrum*, *Desulforegula*, *Desulfoglaeba* e *Dethiobacter*. *Desulforegula*, um gênero oxidador de AGCL (REES; PATEL, 2001), teve sua abundância relativa aumentada com GB de 0,002 para 0,003%. Os gêneros redutores de sulfato detectados na presença do trub que não o foram com GB, foram *Desulfotignum*, *Desulfocarbo* e *Desulfovirga*.

O gênero *Roseobacter*, capaz de reduzir sulfato (BROCK *et al.*, 2013), possivelmente foi favorecido pela DM, aumentando de 0,05 para 0,1% no controle endógeno e prejudicada pelo acúmulo de ácidos orgânicos nas demais condições, diminuindo para menos de 0,04% com os substratos, não sendo detectada nos sistemas com GB e trub. O gênero *Pusillimonas*, embora seja capaz de reduzir sulfato (CAO *et al.*, 2011), foi prejudicado em todos os sistemas com DM (de 0,02% para 0,002 no controle endógeno e 0,01% com etanol) e não foi detectado nos sistemas que promoveram diminuição do pH efluente.

Para manutenção da visibilidade das espécies com menores representatividades, alguns gêneros importantes do ponto de vista desta pesquisa não puderam aparecer na Figura 5.5. É importante pontuar os gêneros redutores de sulfato presentes entre os 20 mais abundantes em cada condição: com trub – *Megasphaera* (1,7%), *Desulfovibrio* (0,4%) e *Paludibacter* (0,2%); com GB – *Desulfovibrio* (0,2%) e *Paludibacter* (0,25%); com GP - *Desulfovibrio* (0,25%) e *Paludibacter* (0,3%); com etanol - *Desulfomonile* (1,2%), *Desulfovibrio* (1%) e *Desulforhabdus* (0,6%); no controle endógeno - *Desulfovibrio* (6,4%) e *Desulfomonile* (0,75%) e no inóculo inicial - *Desulfovibrio* (1,9%) e *Desulfomonile* (1,3%). Observa-se que o gênero *Paludibacter* foi bem representado em todos os sistemas que provocaram diminuição do pH. Este gênero possui capacidade de redução de sulfato em pH 4,5 (LIANG *et al.*, 2013). Ele foi detectado no sedimento do Rio Tinto da Espanha, conhecido pela acidez e pela alta concentração de sulfato (FLORENTINO, 2017).

No entanto, a maioria das BRS apresentam pH ideal mais próximo à neutralidade (SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Moléculas presentes nos subprodutos utilizados como substratos e a diminuição do pH efluente nestes sistemas devem estar relacionados com a diminuição da diversidade de gêneros redutores de sulfato. Com trub e GB foram detectados 22 e 23 gêneros redutores de sulfato, respectivamente, enquanto no inóculo inicial havia 30 gêneros. No controle endógeno também foram detectados 30 gêneros redutores de sulfato, no entanto, *Desulfatibacillum*, *Desulfonatronum* e *Desulfitobacterium* foram detectados apenas após a adição de DM, possivelmente trazidos por este efluente.

Desulfatitalea e *Desulfocaldus* embora não tenham sido detectados no controle endógeno, podem também terem sido trazidos juntamente com este efluente, no entanto não se mantiveram no lodo sem o fornecimento de substrato e nem nos sistemas com diminuição do pH, sendo detectados com etanol, sistema que apresentou 34 gêneros de BRS. Considerando que o etanol utilizado é um produto puro, o fato de que o sistema com etanol apresentou mais gêneros redutores de sulfato que o inóculo inicial e o sistema endógeno só pode ser explicado pela possibilidade de que a DM tenha fornecido estes indivíduos, mas que eles não puderam se manter no sistema sem adição de substrato e nem mediante as condições obtidas nos sistemas com os demais doadores de elétrons. *Dethiobacter*, um redutor dissimilativo de compostos de enxofre (FLORENTINO, 2017), foi detectado exclusivamente na presença de GB, podendo ter sido fornecido juntamente deste substrato ou pela DM, porém favorecido exclusivamente com GB. Com GP o lodo obtido apresentou 28 gêneros de BRS.

Na Figura 5.6 são mostrados os gêneros que promovem redução de sulfato com representação de pelo menos 0,15% de abundância relativa em ao menos um dos sistemas. É notável a participação de *Desulfovibrio* em todos os sistemas, um gênero que promove redução de sulfato com oxidação incompleta do substrato (SHAN *et al.*, 2017). A abundância deste grupo pode estar vinculada ao tipo de sistema microaeróbio utilizado, já que se trata de um gênero com estratégias de adaptação à baixas concentrações de oxigênio, podendo sobreviver à exposição prolongada ao oxigênio dissolvido devido à ação de enzimas como a oxigênio redutase (MOTTERAN *et al.*, 2018).

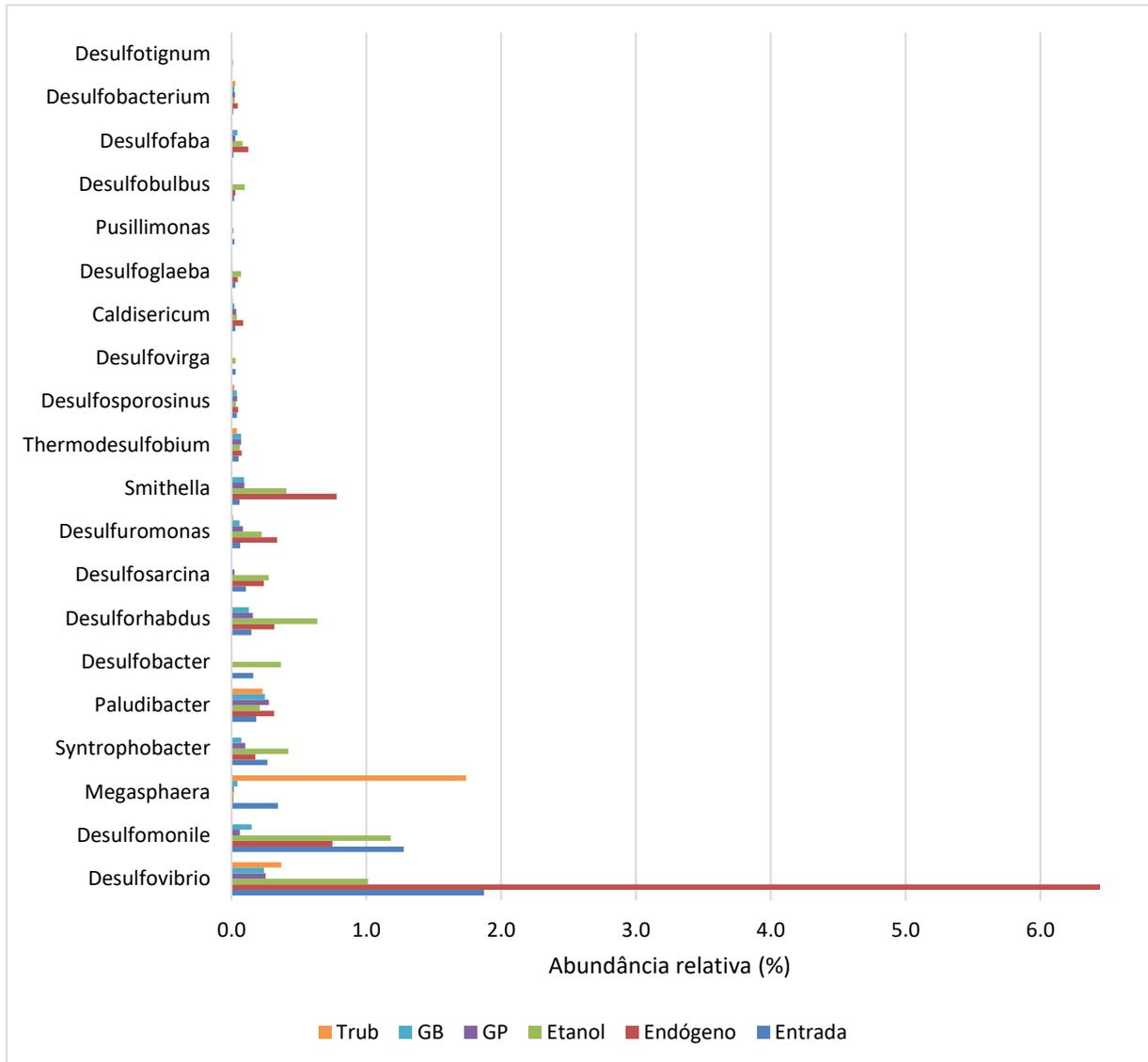


Figura 5.6 - Abundância relativa dos gêneros de BRS mais abundantes em pelo menos um dos tipos de sistemas. Fonte: da autora.

É possível observar que as espécies redutoras de sulfato mais abundantes variaram entre as condições testadas, especialmente com o trub. *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* e *Desulfomonile* apresentam pH ótimo próximo da neutralidade (FLORENTINO, 2017) e foram favorecidas com etanol enquanto com os substratos que causaram abaixamento de pH, elas tiveram representatividade diminuída. Entre os gêneros de BRS que apresentaram abundância relativa similar entre os diferentes sistemas, houve o *Desulfosporosinus*, o qual pode se adaptar a baixos valores de pH (3,6) (SÁNCHEZ *et al.*, 2014; FLORENTINO, 2017). *Desulfosporosinus* é

oxidante de glicerol e redutor de sulfato (KUMAR *et al.*, 2014), e seu crescimento estimulado devido à presença de glicerol e Fe^0 já foi descrito por Kumar *et al.* (2014).

Butyrivibrio é um gênero fermentador, ruminante com papel importante na biohidrogenação e pode reduzir o sulfato inorgânico (SHAN *et al.*, 2017). Embora não esteja representado na Figura 5.6, pode ter proporcionado influência na redução de sulfato com GB com abundância relativa de 0,015% e com trub (0,011%), enquanto no inóculo inicial suas abundâncias relativas eram inferiores a 0,003%. Já *Rhodovastum* (0,003% no inóculo inicial e 0,012% com trub), não é capaz de utilizar o sulfato inorgânico da DM, mas assimila o sulfato como nutriente (OKAMURA *et al.*, 2009) e pode ter utilizado sulfato orgânico no sistema com trub.

A Tabela 5.9 sintetiza as principais fontes de elétrons normalmente utilizadas pelas BRS mais abundantes nos reatores.

Tabela 5.9 - Moléculas usadas como doador de elétrons pelas principais BRS presentes nos sistemas.

Gênero	Doador de elétron	Referência
Megaspheara	Aminoácidos como serina e glutamato.	Srinivasan <i>et al.</i> (2018).
Desulfobacter	Acetato, piruvato, etanol.	Lien; Beeder (1997)
Paludibacter	Acéteares como celulose e hemicelulose.	Chen <i>et al.</i> (2017)
Thermodesulfobiu	H ₂ e metanoato.	Rüffel <i>et al.</i> (2018)
Desulfovibrio	Acetato, H ₂ , metanoato, lactato, piruvato, fumarato, malato, succinato, DHA, glicérol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, Pentanol-I, propanol-I e etanol.	Qatibi <i>et al.</i> (1991) e Motteran <i>et al.</i> (2018)
Desulfobacterium	Fenol, benzoato, 4-hidroxibenzoato, 4-metilfenol, 4-clorofenol, acetato, butirato e piruvato.	Suzuki <i>et al.</i> (2014)
Desulfosporosinus	Glicérol, lactato, H ₂ , metanoato, butirato, ácido capríco, caprilato, metanol, etanol, fumarato, ácido sírínico, piruvato.	Kumar <i>et al.</i> (2014).
Desulfuromonas	Acetato, etanol, propanol, butanol.	Alves <i>et al.</i> (2011)
Butyrivibrio	Carboidratos.	Shan <i>et al.</i> (2017)
Desulfomonile	H ₂ , metanoato, lactato, piruvato, acetato, benzoato, metanoato.	Motteran <i>et al.</i> (2018)
Desulforhabdus	H ₂ , metanoato, acetato, propionato, butirato, isobutirato, lactato, piruvato, etanol, propanoato e butanol.	Kuever <i>et al.</i> (2015)
Desulfofaba	Acetato, alanina, butanol, butirato, etanol, fumarato, glicérol, Hexadecanoato, lactato, malato, propanol, serina, succinato, valerato.	Verslyppe <i>et al.</i> (2014)
Desulfoglaeba	N-alcanos com 6 a 12 moléculas, piruvato, butirato, ácido hexanoico e ácido metil octadecanoico.	Davidova <i>et al.</i> (2006)
Desulfobulbus	Propionato, lactato, H ₂ , piruvato, etanol, acetato.	Gu; Mitchell (2006)
Desulfosarcina	Metanoato, acetato, propionato, butirato, álcoolis, benzoatos, lactato, piruvato.	Kuever <i>et al.</i> (2015)
Desulfocarbo	Metanoato, acetato, piruvato, butirato, fumarato, succinato, ácido palmítico, benzoato.	An; Picardal (2014)
Desulfovirga	Adipato (E)-2-hexanedioato (E)-3-hexanedioato, piruvato, lactato, metanoato, acetato, propionato, butirato, valerato, ácido capríco, heptanoato, octanoato, nonanoato, decanoato, undecanoato, dodecanoato, isobutirato, isovalerato, isocapríco, 3-fenilpropionato, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, 1-nonanol e 1-decanol.	Tanaka <i>et al.</i> (2000)

Espera-se que tais moléculas estejam presentes nos substratos correspondentes aos reatores de ocorrência das espécies, ou tenham sido produzidas por oxidação incompleta a partir deles. O

acúmulo das moléculas presentes nesta lista nos respectivos efluentes tratados, deve ter sido minimizado pelo consumo realizado por essas espécies.

Existem gêneros que não são redutores dissimilativos de sulfato e, portanto, não estão representados na Figura 5.6, mas que são importantes para o tema desta pesquisa, já que atuam no ciclo do enxofre no sentido da sulfetogênese. Estes gêneros serão apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Gêneros atuantes no ciclo do enxofre no sentido da sulfetogênese. Fonte: da autora.

Gênero	Abundância relativa (%)					
	Inicial	Endógeno	Etanol	GP	GB	Trub
<i>Caldisericum</i>	0,029	0,086	0,040	0,036	0,021	0,009
<i>Geotoga</i>	0,025	0,038	0,027	0,017	0,027	0,011
<i>Bacteroides</i>	0,144	0,472	0,296	0,212	0,167	0,296
<i>Blastochloris</i>	0,172	0,334	0,412	0,108	0,022	0,001
<i>Bacillus</i>	0,148	0,148	0,107	0,171	0,158	0,012
<i>Sulfurospirillum</i>	0,003	0,005	0,001	0,003	0,001	0,000
<i>Pseudomonas</i>	0,340	0,058	0,142	0,056	0,039	0,198
<i>Spirochaeta</i>	0,019	0,046	0,044	0,029	0,030	0,007
<i>Coprothermobacter</i>	0,003	0,002	0,008	0,000	0,001	0,000
<i>Salmonella</i>	0,010	0,007	0,003	0,001	0,030	0,005
<i>Syntrophobacter</i>	0,265	0,177	0,421	0,102	0,073	0,006
<i>Smithella</i>	0,059	0,781	0,407	0,095	0,094	0,008

O gênero *Caldisericum* possui espécies portadoras de sulfeto desidrogenase, podendo promover redução dissimilatória de enxofre (FLORENTINO, 2017), sulfato (MORI *et al.*, 2009) e tiosulfato (MORI *et al.*, 2009). A enzima sulfeto desidrogenase, a qual pode catalisar oxidação de sulfeto ou redução de enxofre e tiosulfato, também é produzida pelo gênero *Spirochaeta* (DUBININA *et al.*, 2010). A redução dissimilatória de enxofre também pode ser realizada por espécies de *Coprothermobacter* com pH ideal acima de 5 (FLORENTINO, 2017), desfavorecido com GP, GB e trub provavelmente devido ao baixo pH efluente. O gênero *Salmonella* pode promover a redução de tiosulfato catalisada pela enzima tiosulfato redutase com oxidação de glicerol, e provavelmente pela disponibilidade deste doador de elétrons foi favorecido na presença de GB (STOFFELS *et al.*, 2011).

Os *Bacteroides* auxiliam indiretamente na degradação do sulfato pela síntese da sulfatase, uma enzima que participa de reações intermediárias de redução do sulfato ao sulfeto (GACITÚA *et al.*, 2018). Este gênero foi favorecido pela presença de DM independente do fornecimento de substrato e de qual seja o doador de elétrons. *Blastochloris* participam da remoção de enxofre do meio líquido, mas dependem de uma fonte de sulfato reduzida, como tiosulfato pois não promovem a redução de sulfato (MADIGAM *et al.*, 2019). Os *Blastochloris* foram desfavorecidos com diminuição do pH efluente e principalmente com os subprodutos os quais apresentam composição diversa. O gênero *Geotoga* apresenta espécies que promovem a oxidação de carboidratos e proteínas com redução de enxofre em sulfeto de hidrogênio, como *G. petraea*, a qual atua entre pHs 5,5 e 9 (FLORENTINO, 2017; USHER, 2014 e GROUZDEV *et al.*, 2019).

Embora não sejam encontradas referências que confirmem a realização da redução de sulfato pelos gêneros *Bacillus* e *Sulfurospirillum*, espécies destes gêneros produzem a enzima citocromo-C nitrito redutase (NrfA), relacionada à redução de nitrato e sulfato (KRONECK; TORRES, 2014). Segundo Kroneck e Torres (2014) e Ahmann *et al.* (1994), *Sulfurospirillum* podem reduzir o tiosulfato, enxofre e As^{5+} com oxidação de lactato, mas não o sulfato. Quanto ao gênero *Pseudomonas*, embora ele tenha perdido representatividade com GP e GB, é capaz de produzir PHA a partir da degradação do glicerol, moléculas de valor agregado (ALBUQUERQUE, 2014). Gallardo-Benaventi *et al.* (2019) afirmam que a espécie *P. fragi* pode produzir sulfeto na presença de sulfato, e Florentino (2017) afirma que *P. putida* são capazes de reduzir compostos de enxofre com a oxidação do H_2 .

As interações sintróficas entre *Syntrophobacter* e *Smithella* podem ter contribuído para a remoção de sulfato. Esses gêneros degradam o lactato e propionato usando sulfato e fumarato como receptores de elétrons (LIU, 1999). Os produtos metabólicos acetato e H_2 são degradados por BRS e espécies metanogênicas. O favorecimento de ambos os gêneros já foi confirmado em um sistema de redução de sulfato com GB (MORA *et al.*, 2018) e no tratamento de água de lavanderia contendo sulfato e moléculas orgânicas recalcitrantes (MOTTERAN *et al.*, 2018).

Os gêneros *Sporanaerobacter*, *Tannerella*, *Thermanaerovibrio*, *Thermosipho*, *Veillonella*, *Bacterioides* e *Blastochloris* também atuam no ciclo do enxofre no sentido da sulfetogênese, porém não foram detectados no inóculo inicial. Eles devem ter sido acrescentados por efluentes

utilizados nos sistemas. Conforme mostrado na Tabela 5.11, é possível constatar que a DM influenciou na representatividade destes gêneros no consórcio microbiológico.

Tabela 5.11 - Gêneros atuantes no ciclo do enxofre no sentido da sulfetogênese que não estavam presentes no inóculo inicial acrescentados ao lodo por algum dos efluentes. Fonte: da autora.

Gênero	Abundância relativa (%)					
	Inicial	Endógeno	Etanol	GP	GB	Trub
<i>Sporanaerobacter</i>	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tannerella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003
<i>Thermanaerovibrio</i>	0,000	0,004	0,005	0,000	0,000	0,000
<i>Thermosiphon</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,001	0,001
<i>Veillonella</i>	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Tissierella</i>	0,000	0,004	0,003	0,003	0,009	0,000
<i>Arcanobacterium</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000

A *Sporanaerobacter*, um redutor de enxofre e gerador de acetato (HERNANDEZ *et al.*, 2002), pode ter sido desfavorecida pelo excesso de doador de elétrons. *Tannerella* é um gênero sulfetogênico (KATO *et al.*, 2005) que pode ter sido proporcionado pelos dois subprodutos ou fornecido pela DM mas ter perdido a competição nos demais sistemas. O gênero *Thermanaerovibrio* também é um redutor de compostos de enxofre (PALANIAPPAN *et al.*, 2013). Este gênero pode ter sido representado por espécies atuantes em pH entre 6,5 – 8,1 como a *T. acidaminovorans* (FLORENTINO, 2017) e por isso não foi detectado nos sistemas que promovem diminuição do pH. Espécies do gênero *Thermosiphon* como a *T. africanus*, produzem sulfeto desidrogenase e podem reduzir o enxofre (HUBER *et al.*, 1989). *Thermosiphon* pode ter sido proporcionada pela DM mas perdido a competição na ausência de doador de elétrons e com etanol. O gênero *Veillonella* é descrito como sulfetogênico, **mais** representado em pH neutro e menos em pH abaixo de 5 (WASHIO *et al.*, 2014). O gênero pode ter sido proporcionado pela DM mas só foi capaz de manter sua representatividade com GP. A espécie *V. dispar* apresenta uma relação de simbiose com BRS produzindo acetato a partir da fermentação de citrato (MUYZER; STAMS, 2008).

Bukhtiyarova *et al.* (2019) afirmam que, embora as espécies de *Tissierella* possuam sulfito redutase dissimilatória *dsrAB* e desulfoviridina, a redução dissimilatória de sulfato pelo gênero não foi confirmada. O genoma de *Tissierella* não possui APS redutase, sulfato de adenililtransferase, *DsrC* e *DsrMK*, até então consideradas necessárias para a redução

dissimilatória de sulfato. No entanto, *Tissierella* produz H_2S durante o seu crescimento, o que, segundo os autores, possivelmente ocorre devido às atividades da cisteína sintase (CysK) e / ou cisteína desulfidrase (CdsH). Quanto às *Arcanobacterium*, embora não seja confirmada a redução de sulfato pelo gênero, ele é portador da enzima que pode promover redução de sulfato e nitrato, citocromo-C nitrito redutase (NrfA) (KRONECK; TORRES, 2014).

O consórcio microbiano foi modificado em todas as condições experimentais, os diferentes substratos estudados proporcionaram alterações na composição dos inóculos. A DM e os subprodutos testados, os quais são provenientes de diferentes processos fermentativos, forneceram novas espécies microbianas e selecionaram espécies já presentes. GB e trub alteraram significativamente a comunidade microbiana, mantendo a eficiência na remoção de sulfato. O uso de GB e trub pode, portanto, ser planejado segundo diferentes objetivos, de acordo com as características do inóculo inicial e potencial de cada substrato em favorecer ou suprimir determinadas espécies.

As alterações provocadas pela DM não foram exclusivamente favoráveis à remoção de sulfato, mas, sem dúvida, promoveram a interferência no ciclo do enxofre. O uso de DM sintética em pesquisas pode gerar resultados que não são replicáveis em condições reais, principalmente devido à ausência das espécies introduzidas pela DM, ou seleção provocada por este efluente. Muitas pesquisas ainda utilizam DM sintética (DONG *et al.*, 2019 e COLIPAI *et al.*, 2018). Alguns trabalhos aumentam gradualmente a similaridade da DM sintética, com as características da DM real (CUNHA *et al.*, 2020), outras utilizam DM sintética para diluir a DM real, diminuindo a proporção da DM sintética ao longo do tempo (NOGUEIRA *et al.*, 2019). Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que esta estratégia de adaptação pode ser desnecessária, especialmente pelo fato de que a DM favoreceu o aumento na abundância relativa de BRS. A execução de pesquisas com substratos sintéticos que não considerem as espécies presentes nesses itens ou o efeito de seleção promovido por eles, também pode gerar resultados não replicáveis em condições reais.

Embora a DM tenha aumentado a abundância relativa de BRS e os subprodutos utilizados como doadores de elétrons diminuído, os resultados do estudo da comunidade microbiológica e de eficiência do tratamento de DM demonstraram que a porcentagem de BRS no inóculo isoladamente não é um fator definitivo para a remoção de sulfato. É necessário considerar a abundância relativa de grupos que atuam em vias opostas à redução de sulfato e de espécies

concorrentes pelo mesmo substrato que as BRS. Embora os substratos que causaram diminuição do pH, GP, GB e trub sejam os que apresentaram a menor quantidade de BRS, eles também foram os que mais reduziram as espécies metanogênicas, que competem pelos doadores de elétrons com BRS e as BOE, que atuam em vias opostas à redução de sulfato. Embora as porcentagens de remoção de sulfato obtidas sejam consideradas estatisticamente iguais entre os doadores de elétrons utilizados, a seleção de diferentes gêneros com cada substrato demonstrou que as maneiras pelas quais a remoção de poluentes ocorreu diferiram desde a hidrólise e fermentação e em todas as vias de oxidação de doadores de elétrons.

5.4 Efeitos da relação DQO/SO_4^{2-} nos sistemas de adaptação lenta

Depois que foram obtidas ao final de cada batelada, eficiências satisfatórias de remoção de sulfato e mantidas constantes com variação de $\pm 7\%$, confirmando a adaptação do inóculo para o tratamento de DM, foi avaliada a melhor relação DQO/SO_4^{2-} . Sob uma relação DQO/SO_4^{2-} de 5, o efluente atingiu uma concentração de sulfato inferior à 250 mg.L^{-1} . A concentração de sulfato final nos frascos com relação DQO/SO_4^{2-} de 5 com GB e trub, respectivamente, foram de $246,12 \pm 7,70$ e $113,21 \pm 3,24$. Os dados de remoção de sulfato, DQO e pH efluente são apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Eficiência de remoção de sulfato e pH efluente sob as diferentes relações DQO/SO₄²⁻.

Doador de elétrons	Trub	Trub	Trub	GB	GB	GB
DQO/SO ₄ ²⁻	1	2,5	5	1	2,5	5
Remoção de sulfato (%)	84,0± 0,1	87,6± 1,2	96,8± 0,2	81,6± 0,7	86,2± 0,3	93,0± 0,4
Remoção de DQO (%)	69,9± 1,9	68,1± 3,7	73,8± 2,1	71,7± 1,3	61,6± 2,7	72,9± 2,1
DQO direcionada para sulfetogênese	80,5± 2,5	34,5± 4,1	18,4± 5,1	76,2± 2,0	37,5± 3,3	18,4± 3,9
pH efluente	5,4± 0,02	5,0± 0,01	4,8± 0,03	5,4± 0,02	5,2± 0,04	4,8± 0,01

De acordo com os resultados, depois de estabelecida a sulfetogênese, quanto maior o aporte de elétrons, maior foi eficiência da remoção de sulfato. Pesquisas que utilizaram doadores puros de elétrons, como Rodriguez (2010), com etanol, e Singh *et al.* (2014), com glicose, afirmam, respectivamente, que as relações DQO/SO₄²⁻ de 1 e 0,8 são mais adequadas para remoção de sulfato. Os autores se remetem ao estímulo das espécies metanogênicas causado pelo excesso de doador de elétrons como o motivo pelo qual maiores relações DQO/SO₄²⁻ não são adequadas. Porém, quando substratos complexos são utilizados, algumas moléculas de maior recalcitrância demoram mais a serem oxidadas a formas disponíveis às BRS. É o que ocorre com a lignina, celulose e hemicelulose presentes no trub (PERIMENIS *et al.*, 2018), por exemplo. Neste caso, o baixo fornecimento de substrato pode se tornar o fator limitante à redução de sulfato.

Mora *et al.* (2018), que utilizavam DM com concentração de sulfato de 220 mg.L⁻¹ e substratos complexos, concluíram que a menor relação DQO/SO₄²⁻ foi 7 para que a quantidade de substrato não fosse o fator limitante da redução de sulfato. A relação DQO/SO₄²⁻ de 7 em comparação com o sistema utilizado no presente estudo seria um aporte de elétrons muito significativo, visto que a concentração inicial de sulfato utilizada é 17 vezes maior do que a utilizada por Mora *et al.* (2018). A adequação do sistema à concentração de substrato relativa à DQO/SO₄²⁻ de 7 seria bastante dificultada pela tendência ao acúmulo de ácidos orgânicos, ou até mesmo inviável. Porém, os dados que mostram que um maior aporte de elétrons feito com

subprodutos pode ser favorável ao sistema de tratamento é vantajoso quando se considera que estes doadores de elétrons são resíduos. Além da quantidade disponível de elétrons deixar de ser a limitação da redução de sulfato sob altas relações DQO/SO₄²⁻, os efeitos inibidores de metaloides, como arsênio, podem ser menores (MATOS *et al.*, 2018). Este fator pode se dar por diminuição do contato desses íons com as células devido, por exemplo, à diluição e adsorção.

A melhor remoção de sulfato associada à maiores relações DQO/SO₄²⁻ também já foi registrada em algumas pesquisas realizadas com substratos puros. Papirio *et al.* (2013) obtiveram 68% e 88% de remoção de sulfato sob as relações DQO/ SO₄²⁻ de 1 e 5 respectivamente, partindo de um efluente sintético com concentração de sulfato de 1500 mg.L⁻¹ e utilizando lactato como doador de elétrons. O consumo completo de DQO sem que todo sulfato presente fosse reduzido também se deu com etanol como doador de elétrons sob relação DQO/SO₄²⁻ de 1 (VIEIRA *et al.*, 2016). Além da produção de metano, a formação de H₂ e redução de metais também podem contribuir para o consumo de DQO, cujas reações são favoráveis ao tratamento da DM.

Os resultados de remoção de sulfato e DQO fornecem indícios de que nesta etapa estavam simultaneamente ativas, espécies de BRS e outras oxidadoras completas como as metanogênicas. Conforme discutido no item 5.2.1, embora competidoras das BRS por substrato, com excesso de doador de elétrons as espécies metanogênicas são necessárias para manutenção de uma baixa pressão parcial de H₂ e produção de moléculas mais oxidadas. Com o aumento no aporte de elétrons, houve maior atividade das BRS, porém o aumento das vias de oxidação não sulfetogênicas foi bem mais expressivo.

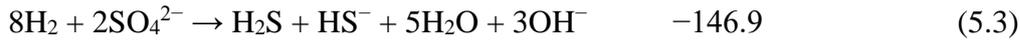
As espécies que promovem a oxidação completa estavam adaptadas ao baixo pH e foram estimuladas com relação DQO/SO₄²⁻ de 5. Isso pode ser inferido a partir da análise do consumo de DQO e pH efluente nesta condição em relação à DQO/SO₄²⁻ de 3 aplicada no procedimento que antecedeu este. Quanto maior a relação DQO/SO₄²⁻ aplicada, menor foi o pH efluente, e mais DQO foi removida. A quantidade de DQO residual no sistema com relação DQO/SO₄²⁻ de 5 foi de 5057 mg.L⁻¹ com trub e 5238 mg.L⁻¹ com GB, a mesma ordem de grandeza de quando havia sido utilizada a relação DQO/SO₄²⁻ de 3. O pH efluente dos dois tipos de sistemas também foi muito próximo, o que é indício de que o valor de pH esteja relacionado com a quantidade de AGV acumulados, a qual é similar entre estas condições.

A DQO residual pode ser um empecilho para a utilização deste efluente, no entanto pode ser precursora de produtos com valor agregado. Da DQO que foi consumida na relação DQO/SO_4^{2-} de 5, subtraída a quantidade direcionada para sulfetogênese, a produção de metano teórica em 30 °C estimada a partir da quantidade de DQO que foi removida seria de 4291 e 4344 mL por litro de efluente tratado com GB e com trub respectivamente. Os cálculos foram realizados de acordo com Metcalf e Eddy (2003), segundo a estequiometria da reação, sem considerar parcelas dissolvida no meio líquido ou perdida na fração gasosa. As tecnologias de purificação de biogás com alta concentração de H_2S estão em ascendente eficiência e aplicabilidade. Exemplos são os modelos comerciais de escala industrial THIOPAQ[®], SHELL-PAQUES[®], H_2SPLUS SYSTEM[®], cujos desenvolvedores declaram que o material recuperado pode ser aplicado como fertilizante (QUIJANO *et al.*, 2018). Melhoras operacionais para sistemas de purificação de biogás continuam em desenvolvimento, como a tecnologia de dessulfurização em duas etapas com coluna de absorção acoplada a um biorreator *airlift* (ALR) de aeração contínua, proposta por Quijano *et al.* (2018). Além da produção de biogás, conforme mencionado na Revisão de literatura, a DQO residual produto de fermentação pode ser fonte de moléculas de valor agregado a serem recuperadas (SINGHANIA *et al.*, 2013; LONGO *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017; EREGOWDA *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2020; REYES *et al.*, 2020). A produção de metano e de carboxilatos como alternativas à DQO residual da fase sulfetogênica será mais discutida no item 5.6 sobre pós-tratamento.

O inóculo demonstrou capacidade de oxidar maior quantidade de substrato depois do período de adaptação. As espécies hidrolíticas, fermentativas, acidogênicas, acetogênicas e oxidadoras completas demonstraram estar adaptadas ao tipo de substrato e ao abaixamento do pH. Segundo Singh *et al.* (2014), o modo aplicado para adaptação é definitivo para o resultado. O aumento gradativo no aporte de elétrons também foi a estratégia utilizada por Mora *et al.* (2018), iniciando com a relação DQO/SO_4^{2-} de 2,5. Inicialmente é importante limitar o fornecimento de substrato para evitar o rápido desenvolvimento de bactérias fermentativas e acidogênicas, enquanto permite-se o desenvolvimento de bactérias sulfetogênicas. A adaptação com limitação de DQO implicou na degradação da matéria orgânica lentamente hidrolisável, permitindo o desenvolvimento de bactérias sulfetogênicas no inóculo.

A adaptação de espécies de BRS e metanogênicas ao baixo pH já foi demonstrada por Sánchez *et al.* (2014), porém neste caso, o baixo pH era devido à própria DM e não ao acúmulo de AGV. Como é apresentado por Singh *et al.* (2014), a disponibilidade de H^+ pode promover redução

de sulfato utilizando H_2 com maior aproveitamento energético pelas espécies de BRS que podem se adaptar ao baixo pH. A energia livre de Gibb's ΔG° ($kJ\ mol^{-1}$) da redução de sulfato com e sem utilização de H^+ é apresentada nas reações 5.2 e 5.3.



A análise da concentração de sulfato a cada 24 h revela que, após 120 h, mediante as DQO/ SO_4^{2-} de 1 e 2,5, a concentração de sulfato se estabilizou com até 87,5% de remoção de sulfato com ambos os substratos (Figura 5.7).

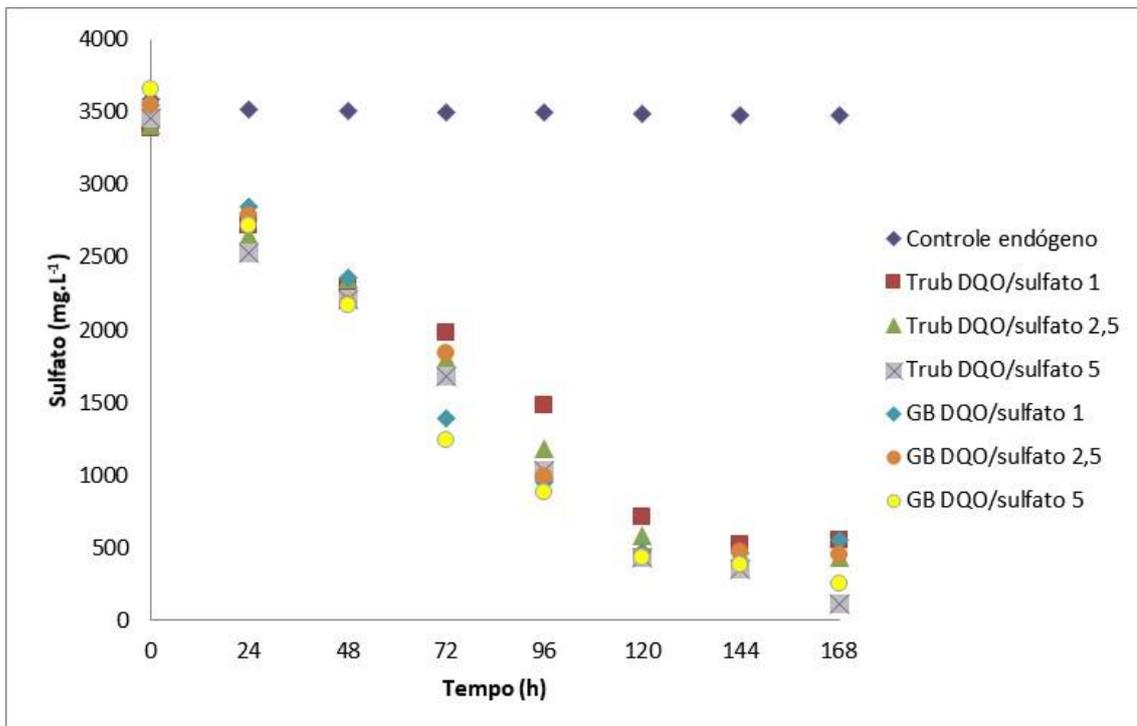


Figura 5.7 - Concentração de sulfato ao longo do tempo mediante as relações DQO/ SO_4^{2-} 1; 2,5 e 5, com os substratos GB e Trub. Fonte: da autora.

Mediante a relação DQO/SO₄²⁻ de 5, em 120 h, as eficiências de remoção estavam em 87,8 e 87,9% com Trub e GB, respectivamente, e continuaram aumentando até atingir os valores detalhados na Tabela 5.12 em 168 horas. Assim como mencionado no item 5.2.1, existe a possibilidade de que quando o aporte de elétrons é realizado com subprodutos contendo moléculas de difícil degradação, a DQO residual seja composta de moléculas de elevada massa molar, ou seja, indisponíveis às BRS. Os resultados apresentados na Figura 5.7 também apontam para esta conclusão. Com relação DQO/SO₄²⁻ abaixo de 2,5, é possível que após 120h, a DQO residual esteja na forma de moléculas recalcitrantes que demandam maior tempo para serem oxidadas e se tornarem biodisponíveis às BRS, e por este motivo tenha ocorrido a interrupção da redução de sulfato. Já com relação DQO/SO₄²⁻ de 5, em 120h de batelada ainda existam moléculas biodisponíveis às BRS mantendo a redução de sulfato.

5.5 Diminuição do período de adaptação do inóculo à sulfetogênese e geração de efluente com características favoráveis ao processo metanogênico

Os resultados apresentados nos procedimentos discutidos até aqui são efetivos em remover poluentes da DM. Quanto à DQO residual neste efluente, conforme mencionado, a produção de biogás é um dos destinos apropriados. Para melhor estimativa do potencial metanogênico do efluente do tratamento de DM com esses subprodutos, foi elaborado um procedimento que pudesse gerar um pH mais próximo da neutralidade e uma alcalinidade acima de 2500 mg CaCO₃.L⁻¹. Essas características poderiam proporcionar uma estratégia sustentável e eficiente de pós-tratamento ao potencializar a produção de biogás a partir da DQO residual sem a demanda de insumos alcalinos normalmente necessários para neutralização de sistemas de degradação anaeróbia (TAUSEEF *et al.*, 2013). Além disso, como a DM demonstrou potencial em aumentar a abundância relativa de BRS, o procedimento fez uso dela na busca em diminuir o tempo de adaptação no inóculo à sulfetogênese. Os resultados deste procedimento são discutidos ao longo da seção 5.5.

5.5.1 Características da mistura de DM com GB e com trub

Nesta etapa, um novo lote de trub foi utilizado. Desta vez apresentando um pH de $4,69 \pm 0,03$ e DQO de $175,1 \pm 2,8$ g.kg⁻¹. O GB utilizado nos procedimentos anteriores foi o mesmo aplicado aqui, com pH de $5,92 \pm 0,04$ e $1300 \pm 49,3$ g.kg⁻¹ de DQO. Apesar do baixo pH dos substratos, a mistura com DM não promoveu redução do pH. Pelo contrário, a adição de GB inclusive elevou o pH, como mostra a Tabela 5.13. Os efluentes dessa mistura podem ter contribuído com elementos com propriedades alcalinizantes que consumiram H⁺, prevenindo a diminuição do pH. Fosfato e carbonato proporcionam alcalinidade parcial (GODOI *et al.*, 2017). Ambos os subprodutos são derivados de plantas, as quais apresentam fosfato na membrana fosfolipídica. O trub pode apresentar entre 10-50 mg.L⁻¹ de fosfato (SIMATE *et al.*, 2011). O GB também pode apresentar cálcio (11-23 mg.L⁻¹) (SILES *et al.*, 2010). A DM usada apresentou $525,5 \pm 5,5$ mg.L⁻¹ de Ca. É possível que o cálcio tenha origem de minerais de carbonato e de fósforo, como calcita [CaCO₃] e hidroxiapatita [Ca₅(PO₄)₃(OH)], comum em ambientes de produção de DM (LANGMAN *et al.*, 2019; BLOWES *et al.*, 2014). A presença destes minerais pode ter contribuído para manutenção do pH da mistura de efluentes próximo da neutralidade.

Tabela 5.13 - Características da mistura de DM com os respectivos subprodutos utilizando-se a relação DQO/SO₄²⁻ de 3.

Ácidos orgânicos (mg.L ⁻¹)	Mistura de DM com GB	Mistura de DM com trub
Oxálico	<LD	26,5±4,01
Glucurônico	<LD	246,1±17,0
Acético	1,4±0,02	22,0±3,21
Propiônico	1,0±0,08	212,6±19,9
Isobutírico	<LD	509,6±65,1
Isovalérico	<LD	55,3±5,9
pH	7,76±0,09	7,2±0,06
Alcalinidade parcial (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	575±27	528±14
Alcalinidade intermediária (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	188±14	260±12
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	763±41	788±25

LD: limite de detecção. Além dos ácidos apresentados, os ácidos succínico, acético, butírico, valérico e capríco foram analisados apresentando valores abaixo do limite de detecção em ambos os sistemas.

Embora a neutralidade da mistura com trub também tenha se mantido, houve uma pequena diminuição do pH. O trub exige adição de um volume maior de substrato para proporcionar a mesma relação DQO/SO₄²⁻, já que ele é menos concentrado em DQO em relação ao GB. Além disso, a maior concentração de açúcares no trub (57,4%) (PERIMENIS *et al.*, 2018), pode ter favorecido gêneros degradadores de cerveja como *Acetobacter*, *Zymophilus*, *Selenomonas*, *Megasphaera* e *Pectinatus* (MATOULKOVÁ & KUBIZNIAKOVÁ, 2014) as quais oxidam açúcares e álcoois com produção de ácidos orgânicos como propionato e acetato. A Tabela 5.13 mostra que a concentração dos ácidos orgânicos analisados foi maior com trub. Possivelmente, parcial decomposição já havia ocorrido na produção ou armazenamento dos subprodutos, sendo maior com o trub. Ácidos orgânicos contribuem com a alcalinidade intermediária (GODOI *et al.*, 2017), maior na mistura com este substrato. Embora os ácidos orgânicos tenham efeito tampão na mudança de pH na faixa de pH 4,3-5,75, eles liberam H⁺ no sistema. Estas características podem ser indícios de que esta mistura apresente maior tendência ao acúmulo de ácidos orgânicos e conseqüente acidificação deste sistema de tratamento.

Apenas a DM foi considerada fonte de sulfato. O trub não apresentou sulfato e foi detectado 0,097 g.kg⁻¹ de sulfato no GB utilizado. Este valor é inferior aos valores de sulfato obtidos para este subproduto em outras pesquisas (0,49-2,73 g.kg⁻¹) (SILVESTRE *et al.*, 2015) e qualquer um destes se tornam insignificantes na proporção que representam para a concentração de sulfato desta mistura.

5.5.2 Efeitos da adaptação do inóculo com DM sem substrato

Neste procedimento, o inóculo proveniente de reator UASB metanogênico não foi adaptado a um aumento gradual da relação DQO/SO₄²⁻. O inóculo foi adaptado à presença da DM real, porém sem fornecimento de substrato, e foi comparado ao inóculo que não sofreu nenhum tipo de procedimento após retirado do reator metanogênico. A adaptação do inóculo revelou-se útil quando utilizado GB como doador de elétrons na relação DQO/SO₄²⁻ de 3. Nesta condição, um mês de adaptação do inóculo à presença de MD sem adição de substrato proporcionou o estabelecimento da sulfetogênese, atingindo 75,8± 4.3% de remoção de sulfato em batelada de 168 h, como observado na Figura 5.8. Utilizando o procedimento I desta pesquisa, foram

necessários 120 dias de adaptação com GB e com trub para obtenção de 89,5% de remoção de sulfato.

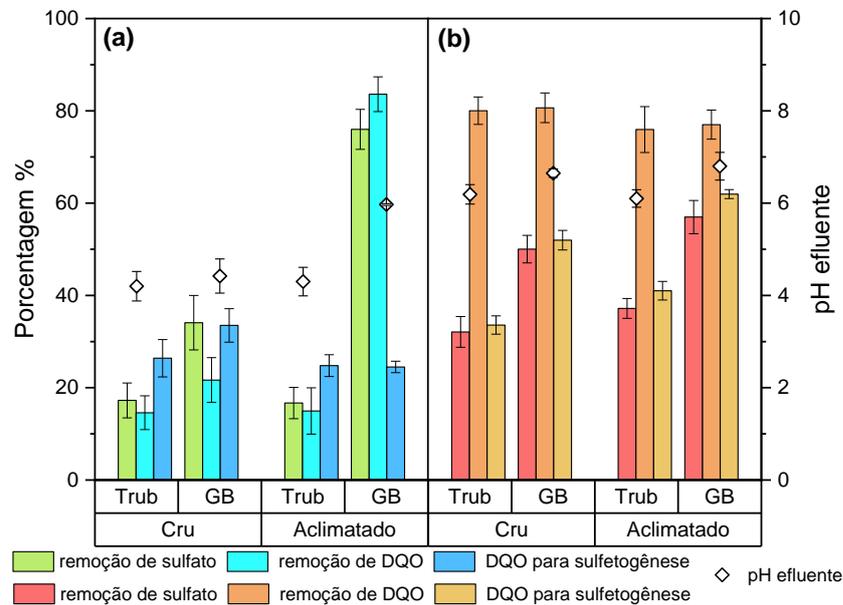


Figura 5.8 - Porcentagem de remoção de sulfato e DQO e proporção de DQO utilizada na redução de sulfato com os inóculos Cru e Acl sob as relações DQO/SO₄²⁻ de 3 (a) e 0,8 (b).
Fonte: da autora.

Como foi mostrado na Seção 5.3, a DM pode aumentar a abundância relativa de BRS e *Archaeas*, enquanto diminui de BOE. É possível que isso tenha ocorrido neste período de adaptação com DM, proporcionando a boa eficiência de remoção de sulfato e DQO com GB obtida na relação DQO/SO₄²⁻ de 3. Como abordado no item 5.2.1, a atuação das *Archaeas* metanogênicas é importante para manutenção da termodinâmica ideal para o consumo de intermediários metabólicos (CASTRO *et al.*, 2004; CHERNICHARO, 2016). O acúmulo de ácidos orgânicos promove consumo de alcalinidade e possivelmente por isso a remoção de DQO e tipo de substrato pareceu mais relacionada com o pH efluente do que a remoção de sulfato. Quando foi atingida uma boa remoção de DQO, o pH efluente foi mais elevado. A prevenção do acúmulo de ácidos orgânicos é mais necessária quando é fornecido um excesso de doador de elétrons, e possivelmente por isso a adaptação do inóculo proporcionou diferenças mais significativas mediante a relação DQO/SO₄²⁻ de 3. Sem adaptação, com GB na relação DQO/SO₄²⁻ de 3 a remoção de sulfato e DQO não se estabeleceram o sistema foi acidificado.

A adaptação do inóculo com DM (Acl) não proporcionou diferença na remoção de DQO comparado ao inóculo Cru. Porém, quando a remoção de DQO é comparada entre o inóculo adaptado com DM e o inóculo adaptado no procedimento anterior, com adaptação lenta mediante aumento gradual na relação DQO/SO₄²⁻ (seção 5.2), houve grande diferença. O modo de adaptação do inóculo é decisivo para definição do modo de ação do consórcio microbiano (SINGH *et al.*, 2014). Enquanto o inóculo Acl adaptado com DM proporcionou 83,6% de remoção de DQO, na etapa anterior, o mesmo inóculo com a mesma DM e substratos mediante a mesma relação DQO/SO₄²⁻ de 3 proporcionou 46% e 51% de remoção de DQO e pH efluentes de 4,8 e 4,9, respectivamente, com GB e trub. De acordo com os resultados no tratamento com cada modo de adaptação, é possível inferir que a adaptação com apenas DM estimulou uma degradação mais completa do substrato em relação à adaptação com o gradativo aumento da relação DQO/SO₄²⁻.

A oxidação incompleta de GB pode promover aumento na concentração de acetato, lactato, 1,3-propanodiol (SANTOS; JOHNSON, 2018), propionato (QATIBI *et al.*, 1991), e butirato (BERTOLINO *et al.*, 2012). O acúmulo de AGCL provenientes da degradação de glicerol comprometendo a remoção de DQO e causando abaixamento de pH já foi observado por Chou e Su (2019) e Oliveira *et al.* (2018). Para evitar esse problema, os autores adicionaram baixas concentrações de glicerol aos sistemas, diluindo ou misturando com outros substratos. Remetendo-se aos resultados mostrados na seção 5.3, tem-se que o efeito negativo do GB sobre as *Archaeas* foi menor do que com o trub. A boa eficiência de remoção de sulfato e DQO com GB sob relação DQO/SO₄²⁻ de 3 deve ter sido permitida pela ação das espécies metanogênicas na manutenção de menores concentrações de ácidos orgânicos reduzidos e H₂. Isto mostra que a adaptação do inóculo com DM pode ser pertinente com este substrato e uma opção às estratégias anteriormente propostas na literatura, podendo ser mais sustentável especialmente por não envolver adição de água limpa e mais simples do que a operação do tratamento controlando a mistura de dois substratos.

A correlação obtida entre boas eficiências de remoção de DQO e pH efluente próximo a neutralidade com GB sob relação DQO/SO₄²⁻ de 3, também está relacionada com o fato de que a manutenção das vias de oxidação completa também afetam o pH efluente devido a formação de moléculas com propriedades alcalinizantes. A sulfetogênese e a metanogênese podem ocorrer com produção de ânions bissulfeto (HS⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻) (CUNHA *et al.*, 2020), este último, o principal alcalinizante nos sistemas anaeróbios (PAULO *et al.*, 2015). A

formação de moléculas alcalinizantes a partir da sulfetogênese pode ser exemplificada pela oxidação do metanol (Reações 3.3 e 3.13), piruvato (Reação 3.5), lactato (Reações 3.6 e 3.9), metano (Reação 3.11), propionato (Reações 3.14 e 3.15), acetato (Reação 3.16) e H_2 (Reações 5.2 e 5.3). As reações de acetogênese e metanogênese na Tabela 5.5 também são exemplos de vias da degradação anaeróbia com formação de moléculas que contribuem com o tamponamento do sistema. De acordo com as características do efluente do sistema com GB, à medida que ácidos orgânicos que liberam H^+ no meio foram produzidos, receptores de H^+ também foram produzidos, assim mantendo o pH.

Esses resultados demonstraram que a DM real pode proporcionar rápida adaptação com eficiência satisfatória de remoção de sulfato. O uso de DM sintética ou uso de água limpa para diluição da DM são comuns nas pesquisas, especialmente durante o período de adaptação (VIEIRA *et al.*, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2020). Lopes *et al.* (2010) precisaram de 80 dias para atingir 70% de remoção de sulfato mediante a relação DQO/SO_4^{2-} de 4,13 com efluente sintético. Além de necessitar de um longo tempo de adaptação, o uso de DM sintética pode selecionar espécies que não suportem as características da mistura com efluentes reais. Nogueira *et al.* (2019) utilizou a diluição da DM natural com DM sintética como estratégia de adaptação, aumentando a proporção do efluente natural ao longo do tempo. Os pesquisadores demonstraram que, conforme a proporção de DM natural aumentava na mistura, a eficiência na remoção de sulfato diminuiu, alcançando 10% com 75% de DM natural.

O efeito da adaptação do inóculo foi bastante diferente nos sistemas onde foi empregado um pequeno aporte de substrato. Enquanto com excesso de doador de elétrons a presença de *Archaeas* metanogênicas é favorável, em sistemas com baixas relações DQO/SO_4^{2-} , as espécies metanogênicas tornam-se indesejadas por competirem pelo substrato com as BRS (SAMPAIO *et al.*, 2019). O consumo de substrato por espécies metanogênicas pode ter sido o fator que limitou a remoção de sulfato mediante a relação DQO/SO_4^{2-} de 0,8. Embora a DQO não tenha sido completamente consumida, a DQO residual provavelmente consistiu em moléculas mais recalcitrantes, indisponíveis às BRS. Este pode ter sido o motivo que limitou a remoção de sulfato em até 57% nessa relação. Com relação DQO/SO_4^{2-} de 1, Vieira *et al.* (2016) obtiveram 100% de remoção de DQO com substrato puro, o etanol. Embora em termos estequiométricos a relação DQO/SO_4^{2-} para redução de sulfato seja de 0,67 (LENS *et al.*, 1998), em um sistema biologicamente e quimicamente complexo, pode ser necessário um excesso de doadores de

elétrons para completar a remoção de sulfato, já que vias de oxidação de matéria orgânica não sulfetogênica não são suprimidas e nem todo o substrato pode ser utilizado pelas BRS.

Com tub os resultados da adaptação do inóculo com DM também se diferiram, tendo sido insuficientes para estabelecer o tratamento da DM. Com excesso de doador de elétrons, a baixa eficiência na remoção de sulfato com tub esteve relacionada com baixa eficiência também na remoção de DQO e diminuição do pH do sistema. Espécies hidrolíticas excretam lipases quebrando moléculas de elevada massa molar em AGCL e glicerol. Os AGCL são então absorvidos por espécies acetogênicas que promovem digestão intracelular em ácido acético e H_2 por β -oxidação (CHOU & SU, 2019). O tub possui grandes quantidades de moléculas recalcitrantes como lignina, celulose e hemicelulose (Tabela 3.5) e ele foi o substrato que mais acumulou intermediários metabólicos em relação a resíduos agroindustriais testados por Perimenis *et al.* (2018). O fornecimento de elevadas concentrações de moléculas de elevada massa molar parece ter induzido uma elevada produção de ácidos orgânicos. Vias de oxidação incompletas do tub podem resultar em acúmulo de ácido acético, butírico e caprótico (PERIMENIS *et al.*, 2018) já que o crescimento de espécies que promovem a oxidação completa é mais lento, como descrito no item 5.2.1, provocando um desequilíbrio na produção-consumo de intermediários metabólicos.

Ao remeter-se aos resultados da avaliação da comunidade microbiana (Seção 5.3), tem-se que o tub afeta negativamente os grupos BRS e *Archaeas*. A diminuição destes grupos deve ter novamente ocorrido mediante o maior aporte de tub (relação DQO/SO₄²⁻ de 3), proporcionando desequilíbrio do consórcio anaeróbio e o acúmulo de AGCL, AGV e H_2 , demonstrado pela baixa remoção de DQO e baixo pH efluente. A adaptação com DM, especialmente a DM utilizada a qual apresentou pH neutro, pode ter selecionado espécies de BRS e *Archaeas* mais susceptíveis ao baixo pH. As características do efluente, assim como as da mistura inicial de DM com substrato mostram que o tub é mais propício ao acúmulo de ácidos orgânicos em relação ao GB, fazendo com que o sistema com este substrato não atingisse uma boa eficiência na remoção de sulfato, ainda que com o inóculo adaptado à DM.

A menor tendência do GB em acidificar o sistema e as vantagens disso para a remoção de sulfato ficaram mais claras mediante o teste de Scott-Knott mostrado na Tabela 5.14. Com este substrato, sob a DQO/SO₄²⁻ de 0.8, estatisticamente a remoção de sulfato é considerada a mesma com os inóculos Cru e Acl, sendo a segunda melhor eficiência obtida. Já com o tub, sob a

DQO/SO₄²⁻ de 3, os sistemas com inóculos Cru e Acl foram classificados juntamente como sistemas de menores remoções de sulfato. Ou seja, somente a adaptação do inóculo não proporcionou uma boa eficiência para a remoção de sulfato.

O resultado da análise de variância das condições de tratamento testadas (combinação das variáveis tipo de inóculo, tipo de substrato e relação DQO/SO₄²⁻) proporcionou um p-valor estimado igual a 8.1444e-08 (Pr(>F)), ou seja, menor que o nível de significância adotado. A Tabela 5.14 mostra o agrupamento entre as condições resultante do teste de Scott-Knott.

Tabela 5.14: Classificação da eficiência na remoção de sulfato de acordo com o teste de Scott-Knott para as variáveis das condições de tratamento, tipo de inóculo, tipo de substrato e relação DQO/SO₄²⁻.

Classificação	Inóculo	Substrato	DQO/SO ₄ ²⁻
A	Acl	GB	3
	Acl	GB	0,8
B	Cru	GB	0,8
	Acl	Trub	0,8
	Cru	GB	3
C	Cru	Trub	0,8
	Acl	Trub	3
D	Raw	Trub	3

O efeito da relação DQO/SO₄²⁻ mostrou-se relacionado com o tipo de substrato e adaptação do inóculo. Hao et al. (2014) concluíram que para redução de sulfato a DQO/SO₄²⁻ ideal é entre 2.4-4.8. Este estudo mostrou que utilizando subprodutos de complexa composição, o limite para a relação DQO/SO₄²⁻ adequada à redução de sulfato é inferior. Isto é mais discutido no tópico a seguir onde mais relações DQO/SO₄²⁻ foram testadas.

5.5.3 Efeitos da relação DQO/SO₄²⁻ e tipo de substrato utilizando inóculo adaptado com DM

A avaliação do efeito da relação DQO/SO₄²⁻ aqui apresentada foi realizada exclusivamente com inóculo Acl. Ao contrário do resultado obtido no procedimento anteriormente realizado com

adaptação lenta (Seções 5.2 e 5.4), não foi obtido um resultado linear entre o aumento da relação DQO/SO_4^{2-} e a eficiência na remoção de sulfato. Além disso, diferente dos resultados com adaptação lenta, mediante a estratégia de adaptação avaliada nesta seção, houve diferenças no resultado do aumento no aporte de elétrons para a remoção de sulfato com cada um dos subprodutos, exceto na relação DQO/SO_4^{2-} de 5. Tal como mostrado na Figura 5.9, a imediata alimentação dos reatores com elevadas concentrações de substrato acarretou acidificação do sistema e impediu o estabelecimento da digestão anaeróbia completa, proporcionando baixas eficiências na remoção de sulfato com ambos os subprodutos. Isto confirma o fato de que a adaptação do inóculo com DM proporciona um sistema susceptível à falha por acidificação. Para sistemas com relação DQO/SO_4^{2-} de 5, a adaptação de longo prazo utilizada na seção 5.2 é mais indicada.

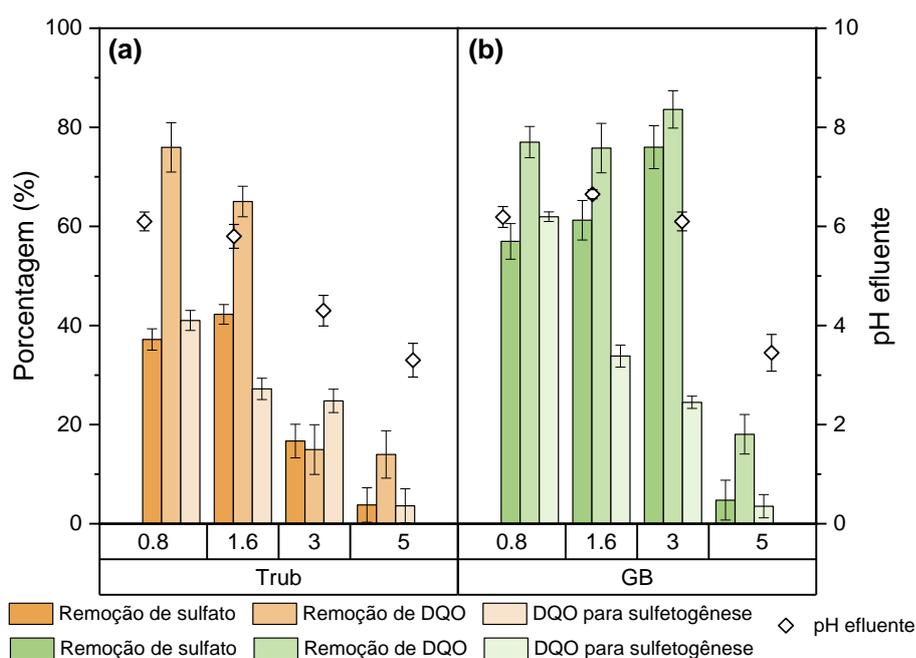


Figura 5.9 - Remoção de sulfato e DQO e porcentagem de DQO utilizada na redução de sulfato com inóculo Acl sob as relações DQO/SO_4^{2-} de 0,8; 1,6, 3 e 5. Fonte: da autora.

Utilizando-se inóculo Acl, com relação DQO/SO_4^{2-} de até 1,6 com trub e 3 com GB, infere-se que, conforme houve produção de AGCL e AGV, receptores de H^+ também foram produzidos, assim o pH neutro foi mantido. Embora a sulfetogênese gere moléculas com propriedades alcalinas (CUNHA *et al.*, 2020), no presente trabalho, utilizando substratos que contém

moléculas de alta massa molar, em relação DQO/SO₄²⁻ acima de 1,6 com trub e 3 com GB, possivelmente o acúmulo de AGV e AGCL se iniciou antes que houvesse receptores de prótons (HCO³⁻ e HS⁻) suficientes para manter o pH.

A susceptibilidade à acidificação utilizando trub ocorreu a partir da relação DQO/SO₄²⁻ de 3, enquanto com GB apenas mediante a relação DQO/SO₄²⁻ de 5. No entanto, a melhor remoção de sulfato não foi obtida com as relações DQO/SO₄²⁻ de 0,8 e 1,6, consideradas iguais entre si pelo teste de Scott-Knott (Tabela 5.15). A melhor remoção de sulfato com GB foi utilizando a relação DQO/SO₄²⁻ de 3 e com trub mediante as relações DQO/SO₄²⁻ de 0,8 e 1,6.

Tabela 5.15: Classificação da eficiência na remoção de sulfato de acordo com o teste de Scott-Knott para as variáveis das condições de tratamento, tipo de substrato e relação DQO/SO₄²⁻. O p-valor estimado foi igual a 8.1444e-08 (Pr(>F)).

Classificação	Substrato	DQO/SO ₄ ²⁻
A	GB	3
B	GB	1,6
B	GB	0,8
C	Trub	1,6
C	Trub	0,8
D	Trub	3
E	Trub	5
E	GB	5

Assim como ocorreu mediante a relação DQO/SO₄²⁻ de 0,8, com 1,6 a disponibilidade de doadores de elétrons biodisponíveis às BRS parece ter sido o fator limitante da redução de sulfato. Em sistemas utilizando doadores de elétrons com elevadas concentrações de polímeros de difícil decomposição, a etapa de hidrólise pode se tornar o estágio que limita a ocorrência da degradação se fornecido baixas concentrações de substrato (SHAH *et al.*, 2014). Nos sistemas com menor aporte de elétrons, ao final da batelada, os polímeros de difícil decomposição podem ter passado a se tornar o tipo de molécula mais abundante, principalmente com trub, tornando a hidrólise o estágio limitante do tratamento. Outras pesquisas sobre tratamento de efluentes ricos em sulfato que utilizaram doadores de elétrons que dependiam da etapa hidrolítica obtiveram resultados semelhantes. A remoção de sulfato se limitou a 68,1% enquanto apenas 55,4% da DQO havia sido removida utilizando soro de leite mediante a relação DQO/SO₄²⁻ de 0,5 (JIMENEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Nogueira *et al.* (2019) obtiveram 67% de remoção

de sulfato mediante a DQO/SO_4^{2-} de 1,5 com vinhaça, enquanto apenas 56% da DQO havia sido removida. Mora *et al.* (2018), concluíram que 7 foi a melhor relação DQO/SO_4^{2-} para que a quantidade de substrato não seja o fator limitante da redução de sulfato utilizando GB. No entanto, nesta pesquisa foi aplicada uma DM com apenas 220 mg.L^{-1} de sulfato, e portanto, a DQO/SO_4^{2-} de 7 não corresponde à uma DQO inicial tão alta como seria necessário utilizando a DM aplicada na presente pesquisa. Todos os resultados obtidos na presente pesquisa apontam para o fato de que com a concentração de sulfato de 3756 mg.L^{-1} , a DQO/SO_4^{2-} de 7 promoveria acúmulo de intermediários metabólicos e falha do sistema. Com o modo de operação aplicado nesta pesquisa, a DQO/SO_4^{2-} de 3 seria a mais adequada, minimizando a limitação do sistema por falta de doador de elétrons disponível bem como por acúmulo de intermediários metabólicos. No entanto, esta conclusão não se aplica ao trub.

A maior tendência do trub ao acúmulo de intermediários metabólicos também foi evidenciado pela porcentagem de DQO consumida, a qual foi mais baixa com o aumento da relação DQO/SO_4^{2-} de 0,8 para 1,6 com trub, enquanto com GB permaneceu a mesma. Considerando o desvio padrão, o pH efluente dos sistemas com trub não sofreu modificações mediante o aumento no aporte de elétrons. No entanto, com o fato de que o pH apresenta escala logarítmica, uma pequena diminuição representa um grande consumo de alcalinidade e diminuição da capacidade tampão do sistema (GODOI *et al.*, 2017). Considerando a sensibilidade da maioria das espécies metanogênicas à redução do pH (PONTONI *et al.*, 2015), é possível que estes reatores tenham atuado em condições sensíveis e susceptíveis ao desequilíbrio da produção e consumo de H^+ .

Estes sinais de sensibilidade não ocorreram com o aumento no fornecimento de GB, com o qual a porcentagem de remoção de sulfato e DQO foi mantida, podendo ser resultado de um significativo aumento na atuação de espécies metanogênicas. Mesmo com aumento na relação DQO/SO_4^{2-} para 3 com GB, a atuação dos grupos metanogênicos e sulfetogênicos foi robusta, com excelentes eficiências de remoção de sulfato, mesmo que com menores proporções de elétrons direcionadas à sulfetogênese. Desse modo, o GB se revelou uma excelente alternativa para co-digestão no tratamento de DM, especialmente apresentando oportunidade de uso da matéria orgânica residual para recuperação de ácidos orgânicos de interesse ou produção de biogás em um estágio seguinte.

5.5.4 Fracionamento da adição de substrato como estratégia operacional: efeitos na eficiência do tratamento e alcalinidade do efluente

Sabe-se que, na presença de sulfato, o menor fornecimento de doador de elétrons (próximo da relação DQO/SO_4^{2-} 0,67) favorece as BRS na competição com as espécies metanogênicas (SINGH *et al.*, 2014). No entanto, de acordo com os resultados obtidos nos procedimentos anteriormente mostrados no presente trabalho, conclui-se que esta afirmação pode não se aplicar mediante o uso de substratos de complexa composição, especialmente contendo moléculas recalcitrantes. O excesso de substrato pode ser necessário devido a fase de hidrólise de polímeros de difícil degradação tornar a disponibilização de moléculas às BRS lenta, além das demais vias de oxidação completa que podem ocorrer além da sulfetogênese e metanogênese nos reatores de tratamento de DM. Por outro lado, com excesso de doador de elétrons pode ocorrer desequilíbrio nas etapas de degradação anaeróbia acarretando acúmulo de intermediários metabólicos, acidificação e falha no tratamento. O Fornecimento fracionado da fonte de carbono (FFFC), onde o substrato foi adicionado em pequenas porções ao longo do período de batelada foi uma estratégia elaborada a partir destas informações. Quando a quantidade de GB referente à razão DQO/SO_4^{2-} de 3 foi dividida em 6 porções iguais adicionadas a cada 24 horas, o potencial de remoção de sulfato foi maximizado, como pode ser visto na Figura 5.10. Os bons resultados obtidos para remoção de sulfato utilizando-se o sistema com FFFC parece ter sido proporcionado pelo equilíbrio da produção e consumo de ácidos orgânicos e H_2 e equilíbrio na produção de moléculas consumidoras e geradoras de alcalinidade.

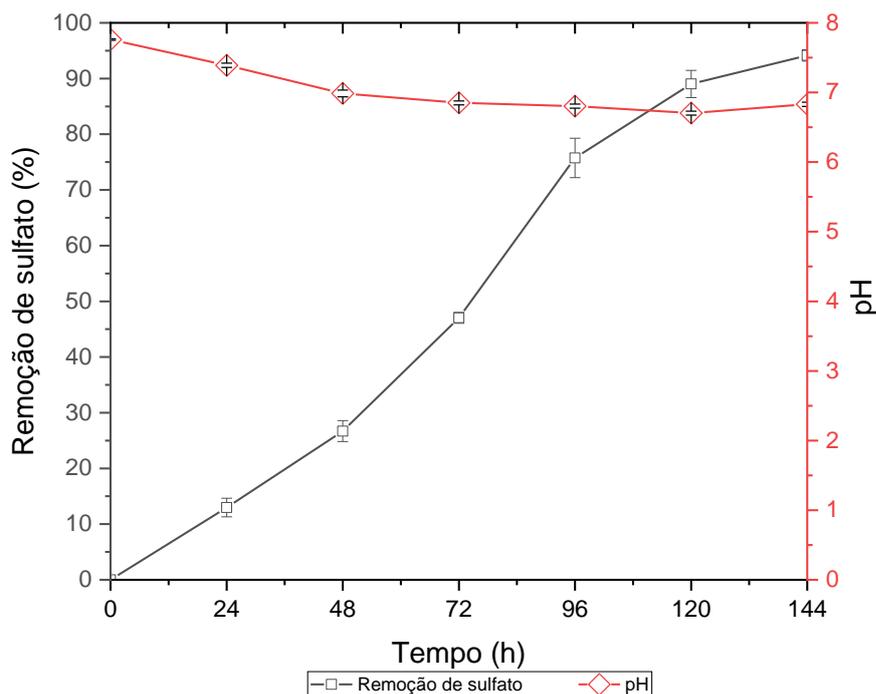


Figura 5.10 - Efeitos na remoção de sulfato e no pH promovidos pela adição de GB a cada 24 h. Fonte: da autora.

O fornecimento gradual do substrato distribuiu a formação de AGV ao longo do tempo, e a menor concentração destas moléculas favoreceu a ação das BRS que promoveram a oxidação dos mesmos, conforme esperado de acordo com a afirmação de Singh *et al.* (2014). Os resultados apontam para o fato de que foi atingida uma condição de equilíbrio do consórcio anaeróbico que além de minimizar o acúmulo de AGV e H_2 , proporcionou a formação de moléculas com propriedades alcalinas que aumentou a capacidade tampão do sistema.

No caso do trub, o fracionamento do suprimento de substrato em 6 dias não foi suficiente para evitar a acidificação (Figura 5.11). Em condições acidofílicas (5,0-6,0), pouco sulfeto é encontrado na forma dissociada. Nessas condições, a forma predominante do sulfeto é a molecular, que não possui capacidade tampão, por não ser um aceptor químico de prótons (GODOI *et al.*, 2017). Para valores de pH abaixo de 5,75, nem a alcalinidade do bicarbonato está presente em concentrações significativas, uma vez que o equilíbrio carbonato/bicarbonato é deslocado para a forma dissolvida de dióxido de carbono (ácido carbônico - H_2CO_3) (WOLF-GLADROW *et al.*, 2007). Ficou evidente que no momento que o pH fica abaixo de 6, a perda da capacidade tampão refletiu-se na redução brusca do pH e na estabilização da concentração

de sulfato. Quando o suprimento de substrato foi dividido em partes menores (7 porções) aplicadas por um período maior de tempo, um equilíbrio foi obtido entre a produção e o consumo de AGV, H_2 , HCO_3^- e HS^- , tornando possível manter o pH próximo à neutralidade e manter a remoção de sulfato e DQO.

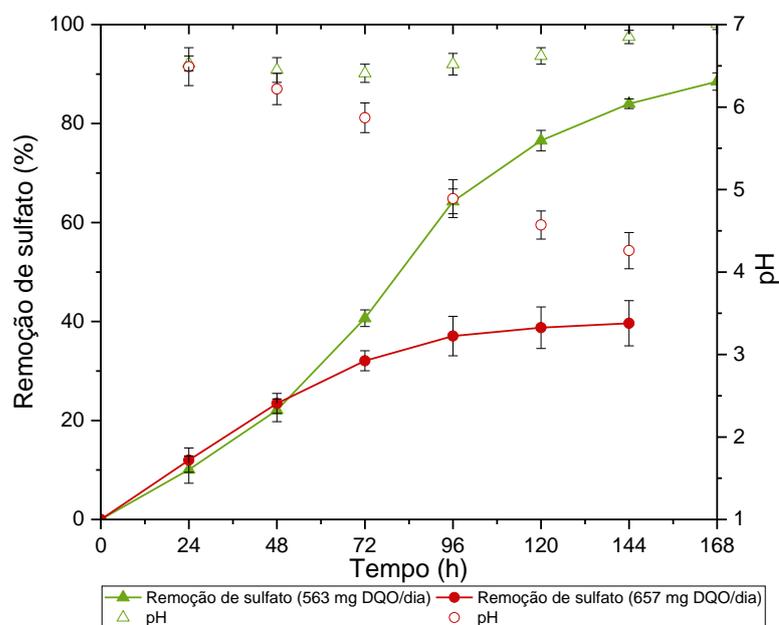


Figura 5.11 - Efeitos da adição fracionada de trub na remoção de sulfato e no pH ao longo do tempo quando 1380,47 mg de DQO de trub é adicionado em 6 porções iguais e quando a mesma quantidade é adicionada em 7 porções iguais. Fonte: da autora.

Conforme foi mencionado na Revisão de literatura, o trub apresentou maior acúmulo de ácidos orgânicos em procedimento anaeróbico em relação a outros resíduos de cervejaria e resíduos provenientes da fabricação de geléia de frutas (PERIMENIS *et al.*, 2018). Como o procedimento com FFFC proporcionou uma solução para o uso de trub no tratamento de MD, este tipo de operação pode se aplicar a estes e outros subprodutos que também apresentem tendência ao acúmulo de intermediários metabólicos.

A forma como o substrato é adicionado, de uma vez ou fracionado ao longo do tempo, alterou as vias de oxidação do doador de elétrons, o que se infere indiretamente a partir da Figura 5.12. O fracionamento na adição do substrato aumentou a proporção de DQO direcionada à sulfetogênese, assim indicando que as BRS foram favorecidas em relação às espécies metanogênicas quando comparado à operação com uma única adição de substrato. A alteração que o FFFC provocou na remoção de DQO é diferente para os dois substratos. Com GB, a

comparação se dá entre dois sistemas onde houve atividade do consórcio anaeróbio na degradação do substrato, não interrompida por acidificação, como no caso do trub sem FFFC. O fracionamento na adição de substrato aumentou a remoção de sulfato e o pH efluente com ambos os substratos, mas comparado com GB, com trub, houve menor remoção de DQO. É possível que não tenha havido tempo de ocorrer hidrólise dos polímeros de difícil degradação presentes nas últimas porções adicionadas às bateladas, mais abundantes no trub (lignina, celulose e hemicelulose). Não tendo havido tempo para solubilização destas moléculas adicionadas ao sistema nas últimas horas de batelada, o acúmulo de intermediários metabólicos consumidores de alcalinidade parcial foi limitado, fator decisivo que tornou exequível o tratamento de DM com trub. A menor remoção de DQO pode ser vantajosa quando o efluente for utilizado como fonte de matéria orgânica, para recuperação de ácidos orgânicos ou produção de metano.

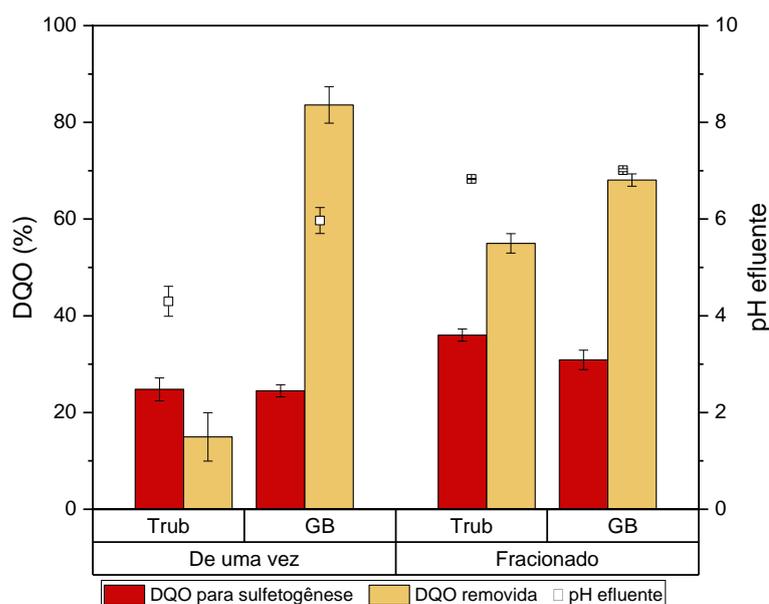


Figura 5.12 - Efeitos da forma como o substrato é adicionado na quantidade de DQO consumida e direcionada para a sulfetogênese (quantidade total de substrato referente a relação DQO/SO_4^{2-} de 3). Fonte: da autora.

No caso da produção de metano, a alcalinidade produzida nesta etapa sulfetogênica é decisiva para a prática deste tipo de pós-tratamento. Considerando as condições com inóculo Acl em que o pH do efluente foi maior que 5,8, a alcalinidade total efluente foi maior mediante o

procedimento com FFFC com ambos os substratos (Figura 5.13). Observa-se que quanto mais sulfato foi removido, maior a alcalinidade total efluente obtida. Essa proporção só não foi estabelecida ao comparar os doadores de elétrons GB e trub. Embora com menor remoção de sulfato, o sistema com trub proporcionou maior alcalinidade total efluente. Ainda que o acúmulo de intermediários metabólicos a partir do trub tenha sido diminuído com FFFC em relação ao sistema convencional, é possível que este efluente apresente maior quantidade de ácidos orgânicos que o sistema com CG. Embora os AGV liberem H^+ no meio em faixa de pH de 4,3–5,75, em pH neutro eles têm efeito tampão na mudança de pH e proporcionam alcalinidade intermediária. A alcalinidade intermediária com trub com FFFC foi de 2792 ± 157 mg $CaCO_3.L^{-1}$ enquanto com CG foi de 2488 ± 123 mg $CaCO_3.L^{-1}$.

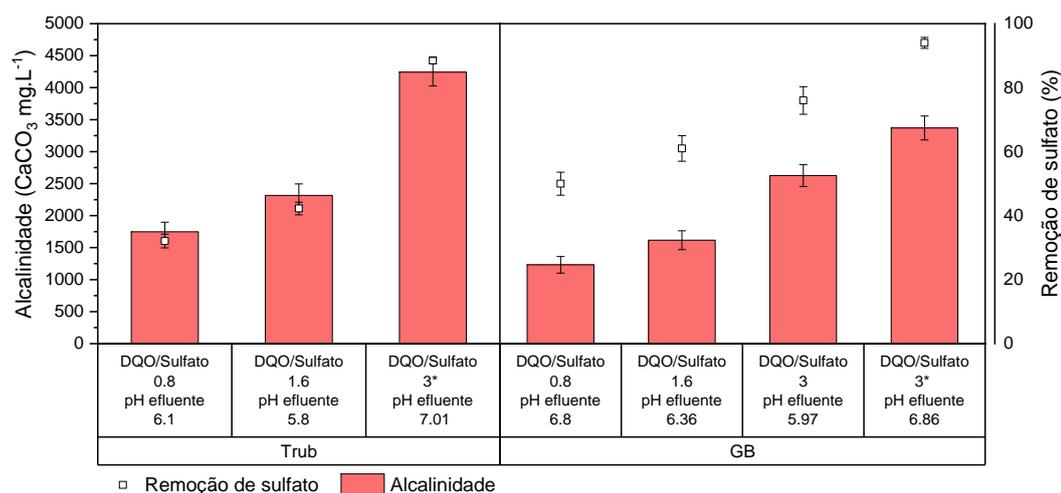


Figura 5.13 - Geração de alcalinidade e eficiência na remoção de sulfato de acordo com cada relação DQO/SO_4^{2-} nos sistemas que apresentavam pH efluente acima de 5,8. O asterisco (*) é usado para identificar os sistemas nos quais o substrato foi adicionado de modo fracionado.

Fonte: da autora.

A partir desses resultados é possível afirmar que a alcalinidade formada esteve relacionada com a formação de HCO_3^- , HS^- e ácidos orgânicos e, portanto, com a concentração de sulfato, DQO inicial e o tipo de substrato. Embora não seja possível fazer uma comparação direta com pesquisas que partem de diferentes concentrações de sulfato, DQO e diferentes substratos, ainda há uma correlação com os resultados obtidos nesta e em pesquisas publicadas anteriormente. Nogueira *et al.* (2019) partiram de 1150 mg.L⁻¹ de sulfato com relação DQO/SO_4^{2-} de 1,7

usando vinhaça como doador de elétrons e obtiveram $1331 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ de alcalinidade. A vinhaça também é um efluente complexo com baixo pH e substâncias de alta massa molar, e pode fornecer vias de oxidação comparáveis às obtidas no presente trabalho. Com menor disponibilidade de reagentes para a formação de sulfeto e AGV, a alcalinidade formada foi ligeiramente inferior à obtida no presente estudo com relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 1,6 com GB ($1617,0 \pm 147 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) e significativamente menor que aquele obtido com trub ($2238,7 \pm 189 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$). Considerando as características do afluente, tais diferenças na alcalinidade formada são compatíveis com o fato de que os AGV e o sulfeto formados contribuíram para a alcalinidade formada.

Conforme mencionado, o trub pode apresentar fosfato ($10\text{-}50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e nitrogênio ($12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of *Total Kjeldahl Nitrogen* (TKN) (SIMATE *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018). É comum que afluentes ricos em sulfato e nitrogênio orgânico gerem efluentes com elevada alcalinidade no tratamento anaeróbio (GODOI *et al.*, 2017). Estes elementos podem ter contribuído com a alcalinidade do sistema. Além disso, o nitrogênio e o fósforo podem ter favorecido o tratamento também pela função nutricional junto ao consórcio microbiano. Já foi constatado que o GB contém elementos nutricionais como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio que são factíveis de serem utilizados por microrganismos degradadores (THOMPSON & HE, 2006).

A operação do sistema com FFFC foi a melhor em termos de remoção de sulfato e controle de alcalinidade favorável ao tratamento anaeróbio em comparação ao modo sem o fracionamento. Para escalas de tratamento industrial, este modelo de operação pode ser adaptado ao fluxo semi-contínuo. O efluente obtido com o fracionamento da adição de trub e GB durante 7 e 6 dias, respectivamente, apresentou características favoráveis à sua aplicação em uma etapa de polimento para geração de metano. Com pH entre 6,5 e 7,5 e alcalinidade entre 2500 e 5000 $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, o efluente pode, de acordo com os critérios de Tauseef *et al.* (2013) para essas variáveis, ser aplicado ao sistema metanogênico.

5.5.5 Remoção de metais e metaloides mediante o modo de operação com fracionamento no suprimento do substrato

Além do efeito do tipo e concentração de substrato, a geração e consumo de alcalinidade também sofre influência dos metais presentes na DM. A precipitação de sulfetos metálicos por reação com HS^- ou H_2S pode promover liberação de H^+ , consumindo alcalinidade gerada em sistemas sulfetogênicos, seguindo reações exemplificadas nas Equações 5.4 e 5.6. Porém, nem todas as reações possíveis de geração de sulfetos metálicos ocorrem com a geração de H^+ , por exemplo, na Equação 5.6 (GODOI *et al.*, 2017). Por esse motivo, não é possível calcular o consumo de alcalinidade a partir da quantidade de metais removidos.



O efluente dos procedimentos em que o GB foi adicionado fracionado em 6 e o trub em 7 dias revelou uma remoção de metal ou metaloides de pelo menos 94,5% com ambos os substratos, mostrado na Figura 5.14.

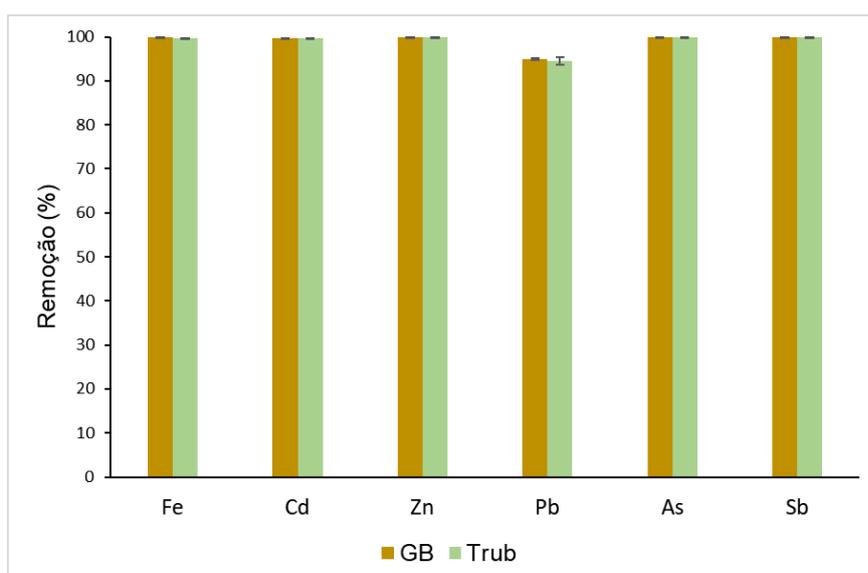


Figura 5.14 - Remoção de poluentes da DM com GB e com trub com fracionamento da adição de sulfato. Fonte: da autora.

Considerando a formação de FeS, CdS, ZnS, PbS, As₄S₄, Sb₂S₃, a quantidade de metais e metaloides da DM exigiria 108,5 mg.L⁻¹ de H₂S para sua precipitação completa. A partir da quantidade de sulfato removida, é possível formar 1254,8 mg.L⁻¹ de H₂S com GB e 1179,37 mg.L⁻¹ com trub. A quantidade de sulfeto produzida excede em muito a demanda, explicando por que houve sulfeto suficiente na fase aquosa para precipitar metais e agir como um receptor de prótons na manutenção do pH, ainda que uma parcela do sulfeto tenha volatilizado. O H₂S age como ácido fraco em solução e dissocia em pH neutro como mostrado na Reação 3.10 - $pK_a^1 = 6.9$ (30 °C e 1 atm). Em pH neutro como o obtido nestes efluentes, em torno de 50% do sulfeto de hidrogênio ocorre na forma dissociada HS⁻ (LEWIS, 2010), no entanto, ambas as formas H₂S e HS⁻ podem formar sulfetos minerais, como mostrado nas Reações 5.4 e 5.5 (GODOI *et al.*, 2017). A bioprecipitação promovida pela atuação sinérgica de BRS e metanogênicas também é favorável ao sistema por neutralizar os efeitos negativos do sulfeto de hidrogênio na degradação anaeróbia (PAULO *et al.*, 2015).

A bioprecipitação de sulfetos minerais é o principal mecanismo de remoção de metais e metaloides em biorreatores. Porém a remoção destes elementos da fase líquida também pode acontecer por precipitação de oxihidroxidos ou de carbonatos, tal como os mecanismos de sorção (exemplo, adsorção e precipitação em superfície) e co-precipitação (ou adsorção em) com Fe (CASTRO NETO *et al.*, 2018). Castro Neto *et al.* (2018) também obtiveram mais de 99% de remoção de Fe, Zn e também de Cu em bateladas com pH entre 6,5 e 7,4.

Uma remoção de 95% de Fe também foi obtida por Godoi *et al.* (2018^b), utilizando vinhaça sintética como doador de elétrons em sistema com pH inicial de 6,1 e pH efluente de 7,2. O modo de operação aqui proposto pode ser aplicado em reator de fundo cônico, o qual permite arraste e acúmulo de sulfetos metálicos no fundo do reator (GODOI *et al.*, 2017^b). Inclusive, o estudo indica que, com frequente purga dos sulfetos metálicos, a eficiência na remoção de metais da fase líquida aumenta (>90% de remoção partindo da concentração inicial de 400 mg.L⁻¹ de Fe²⁺) por evitar a saturação da zona de acomodação do reator. Isso pode ser bastante útil, especialmente quando se estiver trabalhando com uma DM com elevadas concentrações de metais e metaloides.

O modo operacional com FFFC maximizou a sustentabilidade do tratamento de DM ao permitir a aplicação de subprodutos como doadores de elétrons com uma elevada eficiência na remoção

de sulfato, metais e metaloides, além da geração de um efluente com características favoráveis à obtenção de moléculas de valor agregado (biogás e carboxilatos).

5.6 Pós-tratamento com geração de metano

O tratamento de DM com fracionamento na adição de substrato que foi realizada para obtenção do efluente a ser aplicado nesta etapa repetiu o comportamento de remoção de sulfato e DQO discutido anteriormente. Com trub, houve $52,33\pm 3,2\%$ e $87,67\pm 2,1\%$ de remoção de DQO e sulfato, respectivamente, enquanto com GB, as remoções de DQO e sulfato foram, respectivamente, de $50,51\pm 5,9\%$ e $92,76\pm 3,0\%$. Assim como era esperado, de acordo com a literatura (BABA *et al.*, 2013; ALBUQUERQUE, 2014; ANDRIAMANOHIARISOAMANANA *et al.*, 2018, PERIMENIS *et al.*, 2018 e OLIVEIRA *et al.*, 2018), os efluentes derivados da oxidação incompleta dos substratos GB e trub foram precursores da formação de metano nesta pesquisa. Os detalhes da etapa metanogênica são apresentados na Tabela 5.16, onde as Condições I e II correspondem aos sistemas com efluentes do tratamento de DM com trub e GB respectivamente, e a Condição III o sistema onde foi utilizado ácido propiônico.

Tabela 5.16 - Alterações no efluentes provocadas pela etapa metanogênica.

		Condição I	Condição II	Condição III	Controle endógeno
Entrada	pH	6,2±0,05	6,6±0,04	6,2±0,08	6,2±0,01
	DQO (mg.L ⁻¹)	3826,0±97	3971,8±67,5	3846,8±52	-
	Sulfato residual (mg.L ⁻¹)	329,9±10	193,5±8,6	-	-
	Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	4012±101	3267±52	3579±74	-
Saída	pH	7,33±0,008	7,22±0,05	7,15±0,02	6,91±0,04
	DQO (mg.L ⁻¹)	582,1±9,7	566,6±15	387,7±12	-
	Sulfato residual (mg.L ⁻¹)	63,0±3,8	71,7±5,6	-	-
	Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	3076±87	2661±60	2974±62	-
DQO removida (%)		84,8±1,3	85,7±1,7	89,9±1,4	-
DQO removida (mg.L ⁻¹)		3243,8±56	3405,3±43	3459,1±34	-

Condição I: efluente da etapa sulfetogênica alimentada com trub, II: efluente da etapa sulfetogênica alimentada com GB, III: ácido propiônico.

A alcalinidade produzida pelo próprio sistema de tratamento em ambas as etapas foi suficiente para manutenção do pH em valores favoráveis ao tratamento. A quantidade de nutrientes e de metabólitos intermediários presentes nos efluentes da sulfetogênese (Condições I e II) foi suficiente para manter a atividade dos diferentes grupos atuantes no consórcio microbiano. A maior eficiência de remoção de DQO ocorreu com ácido propiônico, e com os efluentes do tratamento sulfetogênico, a mesma eficiência foi obtida. Menor quantidade de DQO foi consumida a partir do efluente com trub, enquanto com GB e ácido propiônico este valor foi o mesmo considerando o desvio padrão.

A maior complexidade e recalcitrância de algumas moléculas presentes no trub, pode ser o fator que proporcionou menor remoção de DQO neste sistema. No entanto, a avaliação do acúmulo de metano mostrou que, na condição I houve maior produção de metano (Figura 5.15). Segundo os cálculos descritos por Metcalf e Eddy (2003), a 30 °C a partir da quantidade de DQO removida, a máxima produção em mL de metano por litro de efluente tratado seria de 1202,13±21, 1303,36±17 e 1356,67±13 nas condições I, II e III, respectivamente. A produção teórica foi calculada desprezando a porção de DQO utilizada na redução do sulfato residual.

Embora não tenha sido aferida a quantidade de metano em mL, nota-se que a concentração acumulada de metano no *headspace* foi maior nas condições I e II do que na condição III (Figura 5.15), contrariando a previsão do cálculo teórico de produção de metano. A via metabólica de produção de H₂ a partir do ácido propiônico deve ser a causa da DQO removida não ter proporcionado a produção de metano na proporção relativa à das condições I e II que se esperava. O controle endógeno mostra que o metano acumulado nas demais condições de fato tem origem na matéria orgânica fornecida, sendo baixa a produção de metano oriunda de morte celular e degradação de resíduos associados ao inóculo.

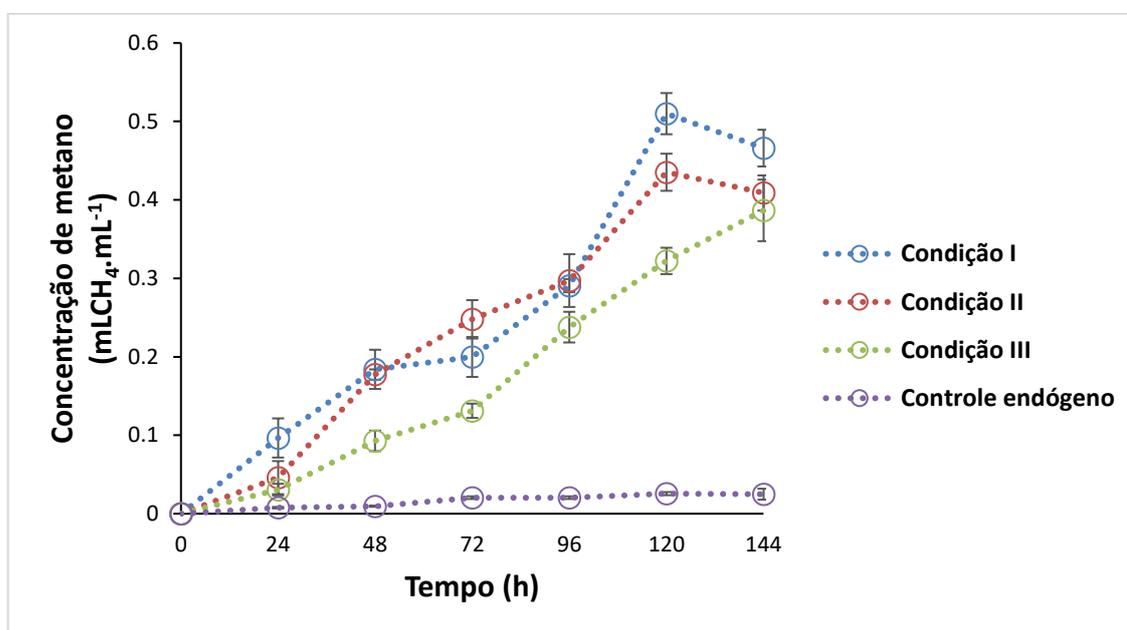


Figura 5.2 - Acúmulo de metano a partir da DQO presente nos efluentes do tratamento sulfetogênico em relação aos parâmetros controle endógeno e com ácido propiônico como doador de elétrons. Condição I: efluente da etapa sulfetogênica alimentada com trub, II: efluente da etapa sulfetogênica alimentada com GB, III: ácido propiônico, Controle endógeno: sem fornecimento de substrato. Fonte: da autora.

É esperado que tenha havido uma maior diversidade de moléculas nos sistemas contendo efluentes do tratamento sulfetogênico que foi alimentado com trub e com GB (Condições I e II) em relação ao sistema controle alimentado com ácido propiônico (Condição III). Este é possivelmente o fator que levou à maior variação de velocidades no acúmulo de metano no *headspace* nas Condições I e II. Inicialmente, o efluente do sistema alimentado com trub parecia ter maior concentração de moléculas diretamente disponíveis à metanogênese, assim iniciando

o acúmulo de metano mais aceleradamente que os demais meios. Ao longo do processo de degradação, o meio contendo trub teve um momento de aparente estabilização (48-72 h), mas acelerou o acúmulo de metano novamente. Este momento pode ser decorrente de um período em que moléculas mais recalcitrantes eram oxidadas em formas mais disponíveis para as vias metanogênicas. Alterações na taxa de produção de metano também foi obtida na Condição II, enquanto com ácido propiônico que apresenta poucas etapas de degradação, a produção de metano ocorreu de modo mais constante.

No gráfico da Figura 5.15 observa-se que a partir de 120 h passou a haver diminuição na concentração de metano no *headspace* das Condições I e II. Provavelmente a partir desse momento, passou a ocorrer consumo de metano acima de sua produção. Existe um processo sinérgico de oxidação anaeróbia de metano e redução de sulfato realizado entre BRS e espécies metanotróficas anaeróbias. Metanodiol (H_3CSH) é um intermediário metabólico que pode ser produzido pelas metanotróficas e consumido pelas BRS (LI *et al.*, 2018). As altas relações de DQO/SO_4^{2-} não são favoráveis às BRS (HAO *et al.*, 2014) e o efluente da fase sulfetogênica o qual alimentou a etapa de produção de biogás apresentava uma relação DQO/SO_4^{2-} de 13,9 na condição I e 17,5 na condição II. Espera-se nestas condições, que as espécies metanogênicas dominem o sistema e as BRS permaneçam inativas. Ao longo do tempo, com a diminuição da DQO e manutenção da concentração de sulfato, esta relação diminuiu e gradativamente e o sistema se tornou favorável à ativação do metabolismo de espécies sulfetogênicas.

O inóculo utilizado, proveniente de um reator UASB de tratamento de efluente de matadouro, já foi aplicado por Nogueira *et al.* (2019). Os autores afirmam que há ocorrência de BRS neste inóculo. É possível que após aproximadamente 120 h de ensaio, as espécies sulfetogênicas tenham sido estimuladas. A remoção de sulfato no reator metanogênico na condição I foi de 78,26% e na condição II de 67,41%. A diminuição na concentração de metano no *headspace* é um indício de que a redução de sulfato tenha ocorrido em sinergia com as metanotróficas, tendo metano e metanodiol como doadores de elétrons.

Quando as condições I e II são comparadas com o controle III, no qual não havia sulfato disponível, fica mais evidente que o consumo de metano nas primeiras condições se deu por oxidação em simbiose com a redução de sulfato. Não foi observada diminuição na concentração de metano na Condição III. O consumo de metano pelas espécies metanotróficas na ausência de sulfato precisaria de oxigênio como receptor de elétrons (HANSON; HANSON, 1996), o

qual não estava disponível no sistema. O uso do metano como doador de elétrons não é favorável quando o objetivo é a sua utilização como biogás. No entanto, a condição do sistema para análise do acúmulo de metano no *headspace* não se aplica às configurações operacionais de escala industrial, nas quais o biogás produzido é direcionado para armazenamento e uso. É possível que em escala industrial com recolhimento do biogás produzido, a quantidade de metano em solução e contato com os microrganismos seja minimizada, assim diminuído seu consumo. Além disso, como o consumo de metano se iniciou a partir do momento em que a relação DQO/SO₄²⁻ permite atuação das BRS, com controle desta variável por meio de fluxo semi-contínuo, é possível evitar que as condições do meio cheguem a se tornar favoráveis à simbiose entre espécies metanotróficas e sulfetogênicas.

As características de pH e alcalinidade do efluente final são favoráveis à continuidade da metanogênese, caso o objetivo seja remover a DQO residual. O sistema atingiu robustez com elevada eficiência, mantendo a alcalinidade e o pH estável próximo da neutralidade, portanto superando a tendência dos subprodutos utilizados em acumular ácidos orgânicos com acidificação do sistema. Houve estabelecimento da metanogênese a partir do efluente do tratamento sulfetogênico, o que mostra que esta estratégia de polimento pode ser aplicada, com produção de biogás sem necessidade de adição de aditivos alcalinos ou água limpa para diluição, assim completando o tratamento dos três subprodutos envolvidos de modo sustentável.

5.6.1 AGV formados e consumidos

Além da produção de biogás, a recuperação dos AGV acumulados nos processos anaeróbios é uma solução emergente como gestão de resíduos e mitigação de carbono. Os AGV apresentam ampla aplicação industrial e possuem rendimentos teóricos de energia iguais ou superiores ao biogás com custo de produção e recuperação competitivo em relação aos produzidos nos mercados químicos (EREGOWDA *et al.*, 2018 e BHATT *et al.*, 2020). Os ácidos carboxílicos de cadeia curta, produtos da fase acidogênica intermediária de digestão anaeróbia, são de alto interesse industrial com aplicabilidade na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (JONES *et al.*, 2017). Também podem ser utilizados como precursores de combustíveis e produtos químicos como monômeros para a produção de poli-hidroxialcanoatos (PHA),

solventes de base biológica, ou utilizados para a remoção biológica de nutrientes (JANG *et al.*, 2012; AGLER *et al.*, 2011).

A recuperação de VFA pode ser feita no compartimento de digestão anaeróbia com biorreator de membrana imersa (JOMNONKHAOW *et al.*, 2021) ou em tecnologias separadas a jusante, como eletrodialise, adsorção em resinas de troca iônica, destilação fracionada, cristalização ou precipitação (ZHOU *et al.*, 2017) e por bioprocessos de alongamento de cadeia seguido de perpretação (VERAS 2019; KUCEK *et al.*, 2016).

Dentre as moléculas que apresentam importância em diferentes ramos da indústria que podem ser formadas a partir da degradação do GB, tem-se: propanodióis, acetato, lactato, butirato, propionato, caprótico, hidrogênio, valérico, succínico, oxálico (ALBUQUERQUE, 2014; SAMUDRALA, 2019; SANTOS *et al.*, 2017; BERTOLINO *et al.*, 2012; SILVESTRE *et al.*, 2015 SANTOS; JOHNSON, 2018; VERAS, 2019; SADHUKHAN *et al.*, 2016; ANDRÉ, *et al.*, 2010). O trub também apresenta potencial para formação de AGV, entre eles o ácido acético, butírico, propiônico, valérico, isovalérico, caprótico e glucurônico (PERIMENIS *et al.*, 2018 e TAOUS; JOONG, 2008). Ácidos como o ácido fórmico (metanoato) e o isobutírico também são intermediários metabólicos possivelmente formados a partir da digestão anaeróbia de carboidratos de cadeia longa e outras moléculas de elevada massa molar (SANTOS *et al.*, 2017; LAN; YANG, 2018). Por este motivo foram avaliadas as concentrações dos ácidos oxálico, glucurônico, succínico, láctico, fórmico (metanoato), acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caprótico.

Como o consórcio anaeróbio é rico em espécies que promovem conjuntamente a degradação das moléculas em etapas onde o resíduo metabólico de uma é fonte de elétrons de outra, não é possível monitorar quanto de cada intermediário metabólico foi produzido. No entanto, é possível averiguar quais ácidos tiveram maior consumo do que produção, tal como o contrário. Em relação à concentração de cada ácido analisado na entrada e no efluente da etapa sulfetogênica (Tabela 5.13), tem-se a partir dos dados mostrados na Tabela 5.17, que com trub, os ácidos oxálico, glucurônico, isobutírico e isovalérico tiveram maior consumo do que produção. Os dois últimos ácidos podem ser consumidos pelos gêneros *Desulforhabdus* e *Desulfovira* (Tabela 5.9), os quais podem resistir ao sistema com trub, conforme os resultados mostrados na seção 5.3 deste trabalho.

Tabela 5.17 – Ácidos orgânicos acumulados no efluente da etapa sulfetogênica realizada com quantidade de substrato referente à relação DQO/SO₄²⁻ de 3.

Ácidos orgânicos (mg.L ⁻¹)	Trub ^a	GB ^a	GB ^b
Glucurônico	10,1±2,8	25,5±3,8	<LD
Lático	70,8±11,4	48,6±11,5	<LD
Fórmico	<LD	593,4±91,5	1406,7±38,2
Acético	2199,4±71,5	1406,9±126,9	808,7±42,7
Propiônico	470,8±61,7	345,2±86,7	1070,5±20,8
Isobutírico	244,5±23,3	20,1±5,7	31,3±2,3
Butírico	166,4±28,6	163,9±9,7	484,5±73,5
Isovalérico	<LD	<LD	49,3±4,3
Valérico	36,5±7,5	<LD	11,1±1,1

^aReferente aos sistemas onde o aporte de substrato foi realizado fracionadamente.

^bReferente ao sistema que recebeu o substrato completo no tempo 0 da batelada.

LD: limite de detecção.

Com GB os ácidos que estavam presentes (acético e propiônico) tiveram suas concentrações aumentadas, assim como foram produzidos os ácidos glucurônico, lático, fórmico (metanoato), isobutírico e butírico. Na pesquisa de Veras (2019), os ácidos mais abundantes produzidos a partir do GB foram o propiônico e o valérico. No entanto, o ácido valérico pode ser consumido pelo gênero *Desulfofaba*, o qual pode ser favorecido no sistema com GB (0,045%), como mostrado na seção 5.3. O acúmulo de acetato, lactato e metanoato podem estar relacionados com o favorecimento de *Lachnospira* no sistema com GB (0,064%), o qual foi averiguado na seção 5.3, já que este gênero é produtor destas moléculas (DUSKOVA; MAROUNEK, 2001). Quanto ao ácido isobutírico, embora sua formação seja prevista pela rota metabólica de degradação de moléculas presentes no GB, como a degradação de açúcares via piruvato (BHATIA; YANG 2017), o acúmulo desta molécula a partir da degradação de GB ainda não havia sido registrada na literatura. Não foram encontrados também, registros de acúmulo de ácido glucurônico a partir da degradação anaeróbia de GB. Algumas espécies são capazes de produzir exopolissacarídeos contendo ácido glucurônico a partir do glicerol, como o gênero *Xanthomonas* sintetiza a goma xantana (WANG *et al.*, 2017). Os gêneros *Pseudomonas*, *Xanthobacter* e *Sphingomonas* formam o exopolissacarídeo *native gellan* (Raghunandan *et al.*, 2018). Segundo os resultados da seção 5.3, o gênero *Xanthomona* não foi representado com GB, porém os gêneros *Pseudomonas*, *Xanthobacter* e *Sphingomonas* se apresentaram no sistema com este subproduto com abundâncias relativas de 0,039; 0,018 e 0,009%,

respectivamente. Estes devem ter tido relação com o acúmulo deste ácido no efluente do tratamento com GB.

Comparando os sistemas com trub e com GB onde foi aplicado o FFFC, o efluente da etapa sulfetogênica com trub apresentou maiores concentrações de ácido láctico, acético, propiônico, isobutírico e valérico. Os ácidos que tiveram suas concentrações aumentadas no efluente em relação à mistura inicial da batelada com trub foram os ácidos láctico, acético, propiônico, butírico e valérico. Os ácidos glucurônico e isobutírico não tiveram suas concentrações aumentadas, porém também foram representados no efluente da sulfetogênese. O gênero *Prevotella*, altamente favorecido no sistema com trub (Seção 5.3), é produtor de ácido láctico, acético, propiônico e isobutírico (LAN; YANG, 2018). O fato de que a abundância relativa deste gênero tenha aumentado tanto em relação ao inóculo inicial mediante o fornecimento de trub, somado ao fato de que foram encontradas elevadas concentrações de produtos metabólicos deste gênero, inclusive na mistura da entrada da batelada, sugerem que indivíduos de *Prevotella* já estavam presentes juntos deste subproduto.

Entre as espécies redutoras de sulfato que mais se destacaram com trub tem-se a *Megasphaera spp.* que aumentou sua abundância relativa de 0,34% para 1,74%. As *Megasphaera* são aptas a produzirem os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e caprótico a partir da frutose e do lactato (CHELACK; INGLEDEW 1987). Outro gênero produtor de ácido caprótico encontrado em grande quantidade nos sistemas é o *Clostridium*. O ácido caprótico pode ser usado como agente antimicrobiano, aditivo em rações animais, aditivo aromatizante e matéria-prima para indústrias químicas e de biocombustíveis (HUANG *et al.*, 2014 e CAVALCANTE *et al.*, 2017) e apresenta propriedades mais favoráveis à separação da água que os ácidos acético e butírico, por exemplo (PERIMENIS *et al.*, 2018). A produção de ácido caprótico era esperada a partir da degradação do GB (SILVESTRE *et al.*, 2015) e da degradação do trub (PERIMENIS *et al.*, 2018). No entanto, elevado consumo deste ácido já foi observado em sistemas com atividade metanogênica e sulfetogênica (ERDIRENCELEBI; OZTURK 2006). Gêneros que utilizam ácido caprótico como doador de elétrons foram identificados nos sistemas estudados (seção 5.3), como *Desulfoglaeba*, *Desulfovirg* e *Desulfosporosinus*. De acordo com os resultados obtidos e as informações obtidas sobre sistemas similares, é possível inferir que o ácido caprótico tenha sido produzido e consumido nestes sistemas.

O gênero *Zymophilus* pode ser favorecido com ambos os subprodutos avaliados (0,2 e 0,1% com GB e trub – seção 5.3). *Zymophilus* são produtores dos ácidos acético e propiônico (MATOULKOVÁ; KUBIZNIAKOVÁ, 2014), os quais foram acumulados a partir do GB e do trub. Propionato e acetato também são produzidos pelo gênero *Pectinatus* (PARADH, 2015 e KRAMER *et al.*, 2020), representado no sistema com GB (0,3%) e altamente favorecido com trub (18,4%). *Selenomonas* é um gênero degradador de aminoácido (metionina) e glicose com produção de ácido acético, propiônico e láctico (TAKESHITA *et al.*, 2012 e SCHLEIFER *et al.*, 1990). Este gênero foi mais representado nos sistemas com GB (0,6%) e com trub (0,8%), os quais apresentam açúcares e proteínas em sua composição e a partir dos quais foram acumulados tais ácidos. Estes mesmos ácidos podem ser produzidos por *Lactobacillus* (MAMUAD *et al.*, 2017), gênero com 8,5 e 29% de abundância relativa com GB e trub, respectivamente. Os ácidos acético e láctico também são formados por *Clostridium*, além de butirato (BAXTER *et al.*, 2019 e GUO *et al.*, 2017). O gênero *Clostridium* teve elevada representatividade na presença de GB (67,5%) e trub (5,1%). Os gêneros *Desulfovibrio*, *Treponema* e *Blautia* são produtores de ácido acético (NAKASAKI *et al.*, 2019 e DORDEVIC *et al.*, 2020) e também tiveram representatividade com GB (0,24; 0,25 e 0,06%, respectivamente). Com trub *Desulfovibrio* e *Treponema* foram representativos (0,37 e 0,12%, respectivamente).

A relação que se observa entre o acúmulo destes ácidos e a representatividade destes gêneros pode indicar que eles estejam associados à tendência à acidificação dos sistemas alimentados com estes subprodutos obtidas em alguns dos modos de operação testados nesta pesquisa. Apesar deste fato gerar uma dificuldade de operação, a qual foi superada pelo modo de FFFC, há a vantagem de que estes ácidos acumulados apresentem valor agregado e a possibilidade de serem isolados, proporcionando um pós-tratamento sustentável.

Como o tratamento com adição imediata de trub no início da batelada não foi satisfatório em remover sulfato e DQO, não houve avaliação da concentração de ácidos neste sistema. Porém, quanto ao sistema com GB, foi possível observar que houve diferença nos ácidos que foram mais acumulados com cada modo de fornecimento de substrato. Com adição imediata de substrato o maior acúmulo foi de ácido fórmico, propiônico e butírico. Com FFFC o maior acúmulo se deu com os ácidos glucurônico, láctico e acético. Ou seja, a distribuição do fornecimento da mesma quantidade e do mesmo substrato ao longo do tempo altera as rotas metabólicas nas quais eles serão oxidados.

Os AGV que foram identificados no efluente da metanogênese são apresentados na Tabela 5.18. O ácido succínico foi identificado pela primeira vez, tendo sido acumulado apenas no efluente da mistura que havia recebido trub como substrato. O ácido láctico e o propiônico ainda foram identificados, porém em concentrações inferiores às que entraram no reator metanogênico.

Tabela 5.18 - Ácidos orgânicos acumulados no efluente da metanogênese.

Ácidos orgânicos (mg.L ⁻¹)	Trub	GB
Succínico	19,2±0,5	<LD
Láctico	23,2±0,5	33,1±7
Propiônico	<LD	24,7±3

LD: limite de detecção.

Conforme mencionado, a presença de *Pectinatus* parece relacionada com o fornecimento de trub, e este gênero produz ácido succínico (KRAMER *et al.*, 2020). O ácido succínico é doador de elétrons para espécies de BRS identificadas nos sistemas sulfetogênicos, como *Desulfovibrio* e *Desulfocarbo* (Tabela 5.9). O consumo deste ácido por estes gêneros na etapa anterior pode ter proporcionado o fato de que ele não havia sido acumulado no efluente da etapa sulfetogênica, mas pôde continuar sendo produzido e se acumulado no efluente da etapa metanogênica. Nesta etapa poucos ácidos foram acumulados e encontrados em baixa concentração no efluente, mostrando que a metanogênese foi efetiva no consumo dos intermediários metabólicos acumulados pela etapa sulfetogênica. Conclui-se que existem duas possibilidades de destino adequado para a DQO residual como etapa de pós-tratamento, a produção de biogás e a recuperação de AGV de valor agregado.

6 CONCLUSÕES

Os subprodutos trub e glicerol bruto avaliados na presente pesquisa apresentaram potencial para serem utilizados como doadores de elétrons em co-tratamento com DM, promovendo eficiências na remoção de sulfato semelhantes aos doadores de elétrons utilizados como parâmetros positivos, etanol e glicerol puro. A estratégia operacional de fornecimento fracionado de fonte de carbono mostrou-se decisiva, com possibilidade de obtenção de moléculas de valor agregado produzidas pelo sistema anaeróbio de degradação das fontes de carbono.

Embora a eficiência na remoção de sulfato com os diferentes substratos tenha sido estatisticamente considerada a mesma, os seus efeitos sobre os diferentes grupos microbianos apresentados no lodo foram distintos. O favorecimento das BRS não esteve diretamente relacionado com melhores eficiências na remoção de sulfato, a qual parece ter sofrido interferência da abundância relativa dos grupos BOE e *Archaeas*. A utilização dos substratos GP, GB e trub como doadores de elétrons no tratamento de DM proporcionou diminuição na abundância relativa das BRS no lodo, enquanto com etanol este grupo foi favorecido. Com GP, GB e, principalmente, com trub houve diminuição na abundância de *Archaeas*, domínio que abriga as metanogênicas, competidoras das BRS por substrato. Com estes substratos, as BOE também foram desfavorecidas. Com etanol houve favorecimento das BRS, porém as BOE e *Archaeas* também foram favorecidas.

A exposição do inóculo à presença de DM real proporcionou rápida adaptação à redução de sulfato. Este fato pode estar relacionado com o efeito da DM na abundância relativa dos diferentes grupos presentes no lodo, favorecimento de BRS e *Archaeas* e desfavorecimento de BOE. Embora sejam competidoras das BRS por substratos, as *Archaeas* metanogênicas auxiliaram na manutenção das condições de pH e alcalinidade adequadas ao tratamento.

A eficiência do sistema mediante diferentes relações DQO/SO_4^{2-} esteve relacionada com o modo de adaptação do inóculo e o modo de fornecimento do substrato. Quando o inóculo foi adaptado apenas com DM por menor período (um mês), chamado rápida adaptação, o sistema se tornou mais rapidamente apto à redução de sulfato, porém mais propenso à falha por acidificação. Quando o inóculo foi adaptado em longo prazo (4 meses), com aumento gradativo da concentração inicial de substrato, chamado adaptação lenta, o sistema tendeu ao maior

acúmulo de AGV e maior resistência ao baixo pH efluente obtido. Nessa condição, a relação DQO/SO₄²⁻ de 5 proporcionou a maior eficiência na remoção de sulfato.

Com base nos resultados experimentais, a operação em batelada alimentada é recomendável. O fracionamento no aporte de substrato ao longo do período de batelada foi eficiente em prevenir falhas causadas por acidificação. Com este modo de operação o sistema apresentou boa eficiência na remoção de sulfato, metais e metaloides e manutenção do pH próximo à neutralidade com alcalinidade favorável ao pós-tratamento com produção de biogás.

O efluente da etapa sulfetogênica realizada com o inóculo adaptado à presença de DM e fornecimento fracionado de substrato pôde ser aplicado ao pós-tratamento com geração de metano sem demanda de adição de reagentes alcalinos. Com trub houve maior produção de metano enquanto com GB, a manutenção da alcalinidade e pHs adequados à degradação anaeróbia foram mais facilmente obtidos. Ocorreu acúmulo principalmente dos ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico no sistema com trub, e de ácido fórmico, acético, propiônico e butírico no sistema com GB.

REFERÊNCIAS

- ADELSKOV J.; PATEL B. K. C. Draft genome sequence of *Cellulosilyticum* sp. I15G10I2, a novel bacterium isolated from a coal seam gas water treatment pond. *Genome Announc.*, v. 5, n. 7, 2017.
- AGLER, M.T.; WRENN, B.A.; ZINDER, S.H.; ANGENENT, L.T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnol.* V. 29, p. 70–78, 2011.
- AHMANN D.; ROBERTS A. L.; KRUMHOLZ, L. R.; MOREL, F. M. M. Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, v. 371, p. 750-750, 1994.
- ALBUQUERQUE, M. F. G. *Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano*. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, 2014.
- ANDRÉ, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: Production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind. Crop. Prod.* v. 31, p. 407–416, 2010.
- ALTUN M.; SAHINKAYA E.; DURUKAN I.; BEKTAS S.; KOMNITSAS K. Arsenic removal in a sulfidogenic fixed-bed column bioreactor. *J Hazard Mater* 269(0):31–37, 2014.
- ALVES, A. S.; PAQUETE, C. M.; FONSECA, B. M.; AND LOURO, R. O. Exploration of the ‘cytochrome’ of *Desulfuromonas acetoxidans*, a Marine Bacterium Capable of Powering Microbial Fuel Cells. *Metallomics*, v. 3, p. 349–353, 2011.
- AN, T. T.; PICARDAL, F. W. *Desulfocarbo indianensis* gen. nov., sp. nov., a benzoate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from water extracted from a coal bed. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. Pt 8, 2907–2914, 2014.
- ANDRIAMANOHIARISOAMANANA, F. J.; SAIKAWA, A; KAN, T; QI, G; PAN, Z; YAMASHIRO, T; IWASAKI, M; IHARA, I; NISHIDA, T; UMETSU, K. Semi-continuous anaerobic co-digestion of dairy manure, meat and bone meal and crude glycerol: Process performance and digestate valorization. *Renewable Energy*, v. 128, p. 1-8, 2018.
- APHA, American Public Health Association, American Water Works Association, WATER Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22. ed. Washington, D.C., 2012.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. DE L. F.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para Determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 02, 2007.
- ASANO, R.; HIROOKA, K.; NAKAI, Y. Middle-thermophilic sulfur-oxidizing bacteria *Thiomonas* sp. RAN5 strain for hydrogen sulfide removal. *Journal of the Air & Waste Management Association*, v. 62, n. 1, p. 38–43, 2011.
- BABA, Y; TADA, C; WATANABE, R; FUKUDA, Y; CHIDA, N; NAKAI, Y. Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. *Bioresource Technology*, v. 140, p. 342-348, 2013.

- BAËTA, B. E. L.; AQUINO, S. F.; SILVA, S. Q.; RABELO, C. A. Anaerobic degradation of azo dye Drimaren blue HFRL in UASB reactor in the presence of yeast extract a source of carbon and redox mediator. *Biodegradation*, v. 23, p. 199–208, 2012.
- BAO, P.; HU, Z. -Y.; WANG, X. -J.; CHEN, J.; BA, Y. -X.; HUA, J.; ZHU C. -Y.; ZHONG, M.; WU, C. -Y. Dechlorination of p,p'-DDTs coupled with sulfate reduction by novel sulfate-reducing bacterium *Clostridium* sp. BXM. *Environmental Pollution*, v. 162, p. 303–310, 2012.
- BATTAGLIA-BRUNET, F.; CROUZET, C.; BURNOL, A.; COULON, S.; MORIN, D.; JOULIAN, C. Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. *Water Research*, v. 46, n. 12, p. 3923–3933, 2012.
- BAXTER, N. T.; SCHMIDT, A. W.; VENKATARAMAN, A.; KIM, K. S.; WALDRON, C.; SCHMIDT, T. M. Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions with Three Fermentable Fibers. *mBio*, v. 10, 2019.
- BEAULIEU, S.; ZAGURY, G. J.; DESCHENES, L.; SAMSON, R. Bioactivation and bioaugmentation of a passive reactor for acid mine drainage treatment. In: Singhal RK, Mehrotra AK (eds) Environmental issues and management of waste in energy and mineral production. *Rotterdam, Netherlands*, p. 533–537, 2000.
- BEHROOZ, M.; BORDEN, R. C. Waste Glycerol Addition to Reduce AMD Production in Unsaturated Mine Tailings. *Mine Water Environ.* v.31, p. 161–171, 2012.
- BERG, J. S.; JÉZÉQUEL, D.; DUVERGER, A.; LAMY, D.; LABERTY-ROBERT, C.; MIOT, J. Microbial diversity involved in iron and cryptic sulfur cycling in the ferruginous, low-sulfate waters of Lake Pavin. *PLOS ONE*, v. 14, n. 2, 2019.
- BERTOLINO, S. M.; MELGAÇO, L. A., SÁ, R. G.; LEÃO, V. A. Comparing lactate and glycerol as a single-electron donor for sulfate reduction in fluidized bed reactors. *Biodegradation*, v. 25, n. 5, p. 719–733, 2014.
- BERTOLINO, S. M.; RODRIGUES, I. C. B.; GUERRA-SÁ, R.; AQUINO, S. F.; LEÃO, V. A. Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. *Journal of Environmental Management*, v. 103, p. 15-23, 2012.
- BEZSUDNOVA, E. Y.; SOROKIN, D. Y.; TIKHONOVA, T. V.; POPOV, V. O. Thiocyanate hydrolase, the primary enzyme initiating thiocyanate degradation in the novel obligately chemolithoautotrophic halophilic sulfur-oxidizing bacterium *Thiohalophilus thiocyanoxidans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1774, p. 1563–1570, 2007.
- BHATIA, S. K.; YANG, Y.-H. Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 16(2), p. 327–345, 2017.
- BOMBERG, M.; ARNOLD, M.; KINNUNEN, P. Characterization of the bacterial and sulphate reducing community in the alkaline and constantly cold water of the closed kotalahti mine. *Minerals*, v. 5, p. 452-472, 2015.
- BONIOLO, M.R. Remoção de urânio em águas de drenagem ácida de minas por técnicas de biossorção. 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado). Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista Instituto de Geociências e Ciências Exatas; 2016.
- BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. Á. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *R. Esc. Minas*, v. 57, p. 45-51, 2004.

- BOSSHARD, P. P.; ALTWEGG, M.; ZBINDEN, R. *Turicibacter sanguinis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, Gram-positive bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 1263–1266, 2002.
- BROCK, N. L.; CITRON, C. A.; ZELL, C.; BERGER, M.; WAGNER-DÖBLER, I.; PETERSEN, J.; ... DICKSCHAT, J. S. Isotopically labeled sulfur compounds and synthetic selenium and tellurium analogues to study sulfur metabolism in marine bacteria. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 9, p. 942–950, 2013.
- BUKHTIYAROVA, P. A.; ANTSIFEROV, D. V.; BRASSEUR, G.; AVAKYAN, M. R.; FRANK, Y. A.; IKKERT, O. P.; KARNACHUK, O. V. Isolation, characterization, and genome insights into an anaerobic sulfidogenic *Tissierella* bacterium from Cu-bearing coins. *Anaerobe*. V. 56, p. 66-77, 2019.
- CAI, S.; LI, J.; HU, F. Z.; ZHANG, K.; LUO, Y.; JANTO, B.; DONG, X. *Cellulosilyticum ruminicola*, a Newly Described Rumen Bacterium That Possesses Redundant Fibrolytic-Protein-Encoding Genes and Degrades Lignocellulose with Multiple Carbohydrate- Borne Fibrolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 12, 3818–3824, 2010.
- CAO, B.; MA, T.; REN, Y.; REN, Y.; LI, G.; LI, P.; GUO, X.; FENG, L. Complete Genome Sequence of *Pusillimonas* sp. T7-7, a Cold-Tolerant Diesel Oil-Degrading Bacterium Isolated from the Bohai Sea in China. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 15, p. 4021–4022, 2011.
- CASTRO, H.; OGRAM, A.; REDDY, K. R. Phylogenetic Characterization of Methanogenic Assemblages in Eutrophic and Oligotrophic Areas of the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 11, p 6559–6568, 2004.
- CASTRO NETO, E. S.; AGUIAR, A. B. S.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. Acid mine drainage treatment and metal removal based on a biological sulfate-reducing process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 35, p. 543–552, 2018.
- CHELACK, B. J.; INGLEDEW W. M. Anaerobic Gram-Negative Bacteria in Brewing—A Review. *ASBC Journal*, v. 45, n. 4, p. 123-127, 1987.
- CHEN, H.; CHANG, S. Impact of temperatures on microbial community structures of sewage sludge biological hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 502–510, 2017.
- CHERNICHARO, C.A.L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios. 2 ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, v. 5, p. 379, 2016.
- CHO, K.; HIRAI, M.; SHODA, M. Degradation of Hydrogen Sulfide by *Xanthomonas* sp. Strain DY44 Isolated from Peat. *Environmental Microbiology*, v. 58, n. 4, p. 1183-1189, 1992.
- CHOU, Y. -C.; SU, J. -J. Biogas Production by Anaerobic Co-Digestion of Dairy Wastewater with the Crude Glycerol from Slaughterhouse Sludge Cake Transesterification. *Animals*, v. 9, n. 9, p. 618, 2019.
- CHOUDHARY, R. P.; SHEORAN, A. S. Comparative study of cellulose waste versus organic waste as substrate in a sulfate reducing bioreactor. *Bioresource Technology*. v. 102, n. 6, p. 4319-4324, 2011.
- CHOUDHARY, R. P.; SHEORAN, A. S. Performance of single substrate in sulphate reducing bioreactor for the treatment of acid mine drainage. *Miner. Eng.* v. 39, p. 29–35, 2012.
- CME Group, Chicago Mercantile Exchange, (2020) <
<https://www.cmegroup.com/trading/energy/ethanol/chicago-ethanol-platts-swap.html> >
accessed on April 2, 2020.

- COELHO, M. M. H.; MORAIS, N. W. S.; FERREIRA, T. J. T.; SILVA, F. S. S.; PEREIRA, E. L.; DOS SANTOS, A. B. Carboxylic acids production using residual glycerol as a substrate in anaerobic fermentation: A kinetic modeling study. *Biomass & Bioenergy*, v. 143, p. 105874, 2020.
- COLIPAI, C.; SOUTHAM, G.; OYARZÚN, P.; GONZÁLEZ, D.; DÍAZ, V.; CONTRERAS, B.; NANCUCHEO, I. Synthesis of Copper Sulfide Nanoparticles Using Biogenic H₂S Produced by a Low-pH Sulfidogenic Bioreactor. *Minerals*, v. 8, p. 35, 2018.
- COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams, *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 67, p. 29–46, 1995.
- CORBETT, C. *Development of the Rhodes BioSURE Process in the treatment of acid mine drainage wastewaters*. 2001. 111 f. MSc thesis, Rhodes University, 2001.
- COSTA, P. F.; MATOS, L. P.; LEÃO, V. A.; TEIXEIRA, M. C. Bioremoval of arsenite and sulfate by a mixed culture with sulfate-reducing capacity growing on powdered chicken feathers. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, p. 70-75, 2014.
- CUNHA, M. P.; FUESSA, L. T.; RODRIGUEZ, R. P., LENS, P. N. L., ZAIAT, M. Sulfidogenesis establishment under increasing metal and nutrient concentrations: An effective approach for biotreating sulfate-rich wastewaters using an innovative structured-bed reactor (AnSTBR). *Bioresource Technology Reports*, v. 11, 2020.
- DAVIDOVA, I. A.; DUNCAN, K. E.; CHOI, O. K.; SUFLITA, J. M. *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov., an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 2737–2742, 2006.
- DE SOUSA E S. A.; SALES M. N. W.; MACIEL H. C. M.; LOPES P. E.; BEZERRA DOS S., A. Potentialities of biotechnological recovery of methane, hydrogen and carboxylic acids from agro-industrial wastewaters. *Bioresource Technology Reports*, v. 10, p. 100406, 2020.
- DEPPENMEIER, U.; MULLER, V. *Bioenergetics*, ed. G. Schäfer and H. Penefsky, Springer, Berlin Heidelberg. v. 45, n. 26, p. 123–152, 2008.
- DESCHAMPS, E.; CIMINELLI, V. S. T.; LANGE, F. T.; MATSCHULLAT, J.; RAUE, B.; SCHMIDT, H. Soil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil. *J Soils & Sediments*, v. 2, p. 216-222, 2002.
- DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, L. Optimization of the operation of packed bed bioreactor to improve the sulfate and metal removal from acid mine drainage. *Journal of Environmental Management*, v. 200, p. 135-144, 2017.
- DINH, H. T.; KUEVERT, J.; MUBMANN, M. Iron corrosion by novel anaerobic Microorganisms. *Nature*, v. 427, p. 829-832, 2004.
- DOLLA, A.; FURNIER, M.; DERMOUN, Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 126, p. 87-100, 2006.
- DONG, Y. -R.; DI, J. -Z.; WANG, M. -X.; REN, Y. -D. Experimental study on the treatment of acid mine drainage by modified corn cob fixed SRB sludge particles. *RSC Advances*, v. 9, p. 19016–19030, 2019.
- DORDEVIĆ, D.; JANČÍKOVÁ, S.; VÍTEŽOVÁ, M.; KUSHKEVYCH, I. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. *Journal of Advanced Research*, 2020.

- DUBININA, G.; GRABOVICH, M.; LESHCHEVA, N.; RAINEY, F. A.; GAVRISH, E. *Spirochaeta perfilievii* sp. nov., an oxygen-tolerant, sulfide-oxidizing, sulfur- and thiosulfate-reducing spirochaete isolated from a saline spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 110–117, 2010.
- DUSKOVA, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 159–163, 2001.
- ENGELS, C.; RUSCHEWEYH, H. -J.; BEERENWINKEL, N.; LACROIX, C.; SCHWAB, C. The Common Gut Microbe *Eubacterium hallii* also Contributes to Intestinal Propionate Formation. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 713, 2016.
- ERDIRENCELEBI, D.; OZTURK, I. A Comparative Study of Sulfidogenic and Methanogenic Activities During the Treatment of Landfill Leachate: Part I. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 41, n.4, p. 687–701, 2006.
- EREGOWDA, T.; MATANHIKE, L.; RENE, E. R.; LENS, P. N. L. Performance of a biotrickling filter for anaerobic utilization of gas-phase methanol coupled to thiosulphate reduction and resource recovery through volatile fatty acids production. *Bioresource Technology*, v. 263, p. 591–600, 2018.
- ESPAÑA J. S.; PAMO E. L.; SANTOFIMIA E. Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (Odiel river watershed, Huelva, SW Spain): Geochemistry, mineralogy and environmental implications. *Applied Geochemistry*, v. 20, n. 7, p. 1320–1356, 2005.
- FALAGÁN, C.; YUSTA, I.; SÁNCHEZ-ESPANA, J.; JOHNSON, D. B. Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. *Minerals Engineering*, v. 106, p. 79–85, 2017.
- FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente. F981c Cadastro de minas paralisadas e abandonadas no Estado de Minas Gerais / Fundação Estadual do Meio Ambiente. Belo Horizonte. 38 p. il., 2016.
- FLORENTINO, A. P. Physiology and application of sulfur-reducing microorganisms from acidic environments, 2017. 264 p. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, 2017.
- FUKUSHIMA, T.; WHANG, L. -M.; CHEN, P. -C.; PUTRI, D. W.; CHANG, M. -Y.; WU, Y. -J.; LEE, Y. -C. Linking TFT-LCD wastewater treatment performance to microbial population abundance of *Hyphomicrobium* and *Thiobacillus* spp. *Bioresource Technology*, v. 141, p. 131–137, 2013.
- GACITÚA, M. A.; MUÑOZ, E.; GONZÁLEZ, B. Bioelectrochemical sulphate reduction on batch reactors: Effect of inoculum-type and applied potential on sulphate consumption and pH. *Bioelectrochemistry*, v. 119, p. 26–32, 2018.
- GALLARDO-BENAVENTE, C.; CARRIÓN, O.; TODD, J. D.; PIERETTI, J. C.; SEABRA, A. B.; DURÁN, N.; RUBILAR, O.; PÉREZ-DONOSO, J, M.; QUIROZ A. Biosynthesis of CdS Quantum Dots Mediated by Volatile Sulfur Compounds Released by Antarctic *Pseudomonas fragi*. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1866, 2019.
- GIBERT, O.; PABLO, J.; CORTINA, J. L.; AYORA, C. Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Research*, v. 38, p. 4186–4196, 2004.

- GLASSING, A.; DOWD, S. E.; GALANDIUK, S.; DAVIS, B.; JORDEN, J. R.; CHIODINI, R. J. Changes in 16s RNA Gene Microbial Community Profiling by Concentration of Prokaryotic DNA. *Journal of Microbiological Method*, v. 119, p. 239-242, 2015.
- GODOI, L. A. G. DE; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. *Journal of Environmental Management*, v. 197, 597–604, 2017.
- GODOI, L. A. G.; SANTOS, C. E. D.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Evaluating and refining alkalinity calculations due to sulfide and bicarbonate accessed by titration in anaerobic sulfate-reducing bioreactors. *Water Air Soil Pollut.* v. 228, n. 322, 2017.
- GROUZDEV, D. S.; SEMENOVA, E. M.; SOKOLOVA, D. S.; TOUROVA, T. P.; POLTARAUS, A. B.; NAZINA, T. N. Draft Genome Sequence of *Geotoga petraea* Strain HO-Geo1, Isolated from a Petroleum Reservoir in Russia. *Microbiology Resource Announcements*, v. 8, n. 29, 2019.
- GU, J. -D.; MITCHELL, R. Biodeterioration. *The Prokaryotes*, v. 1 p. 864–903, 2006.
- GUO, Y.; DAI, L.; XIN, B.; TAO, F.; TANG, H.; SHEN, Y.; XU, P. 1,3-Propanediol production by a newly isolated strain, *Clostridium perfringens* GYL. *Bioresource Technology*, v. 233, p. 406–412, 2017.
- GUSTAFSSON, H. E. The Swedish Acid Mine Drainage Experience: Research, Development, and Practice. *Environmental Impacts of Mining Activities*, p. 203-228, 1999.
- HAN, C.; KOTSYURBENKO, O.; CHERTKOV, O.; HELD, B.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; DETTER, J. C. Complete genome sequence of the sulfur compounds oxidizing chemolithoautotroph *Sulfuricurvum kujense* type strain (YK-1T). *Standards in Genomic Sciences*, v. 6, p. 94–103, 2012.
- HAN, Y.; YOUM, S.; OH, C.; CHO, Y.; AHN, J. S. Geochemical and eco-toxicological characteristics of stream water and its sediments affected by acid mine drainage. *Catena*. v. 148, p. 52-59, 2017.
- HAO, T.; XIANG, P.; MACKEY, H. R. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Res.* v. 65, p. 1-21, 2014.
- HARMSSEN, H.J.; VAN-KUIJK, B.L.; PLUGGE, C.M.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, W.M., STAMS, A.J. *Syntrophobacter furnaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfatereducing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, n. 4, p. 1383-1387, 1998.
- HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. Remediation and Selective Recovery of Metals from Acidic Mine Waters Using Novel Modular Bioreactors. *Environ. Sci. Technol.*, v. 48, p. 12206–12212, 2014.
- HERLIHY, A. H.; MILLS, A. L. Sulfate Reduction in Freshwater Sediments Receiving Acid Mine Drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 179-186, 1985.
- HERNANDEZ-EUGENIO, G.; FARDEAU, M.L; CAYOL, J.L; BHARAT, K.C.; PATEL, P.T.; MACARIE, H.; GARCIA, J.L.; OLLIVIER, B. *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 1217–1223, 2002.
- HERRMANN, E.; YOUNG, W.; REICHERT-GRIMM, V.; WEIS, S.; RIEDEL, C.; ROSENDALE, D.; ... EGERT, M. In Vivo Assessment of Resistant Starch Degradation by the

Caecal Microbiota of Mice Using RNA-Based Stable Isotope Probing—A Proof-of-Principle Study. *Nutrients*, v. 10, n. 2, p. 179, 2018.

HU, Y.; JING, Z.; SUDO, Y.; NIU, Q.; DU, J.; WU, J.; YOU, Y. Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. *Chemosphere*, v. 130, p. 24-33, 2015.

HUANG, K.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W.; MIAO, M. Characterization of a thermostable arginase from *Rummeliibacillus pycnus* SK31.001. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, n. 1, p. 68–75, 2016.

HUANG, W. C.; TSAI, T. H.; CHUANG, L. T.; LI, Y. Y.; ZOUBOULIS, C. C.; TSAI, P. J. Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid. *Journal of Dermatological Science*, v. 73, n. 3, p. 232-240, 2014.

HUBER, R.; WOESE, C. R.; LANGWORTHY, T. A.; FRICKE, H.; STETTER, K. O. *Thermosipho africanus* gen. nov., Represents a New Genus of Thermophilic Eubacteria within the “*Thermotogales*.” *Systematic and Applied Microbiology*, v. 12, p. 32–37, 1989.

HULTBERG, M.; BODIN, H. Fungi-based treatment of real brewery waste streams and its effects on water quality. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 42, p. 1317-1324, 2019.

HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. New York: Academic Press, 1966. 544 p.

HUSSAIN, A.; QAZI, J. I. Application of sugarcane bagasse for passive anaerobic biotreatment of sulphate rich wastewaters. *Appl Water Sci*, v. 6, p. 205–211, 2016.

HWANG, S.K.; JHO, E.H. Heavy metal and sulfate removal from sulfate-rich synthetic mine drainages using sulfate reducing bacteria. *Science of the Total Environment*. v. 635, p. 1308-1316, 2018.

JADHAV, K.; JADHAV, I. Sulfur oxidation by *Achromobacter xylosoxidans* strain wsp05 reveals ecological widening over which thiotrophs are distributed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 192, 2017.

JAMIL, I. N.; CLARKE, W. P. Bioremediation for acid mine drainage: organic solid waste as carbon sources for sulfate-reducing bacteria: a review. *Journal of Mechanical Engineering and Sciences*. v. 5, p. 569-58, 2013.

JANG, Y.-S.; KIM, B.; SHIN, J.H.; CHOI, Y.J.; CHOI, S.; SONG, C.W.; LEE, J.; PARK, H.G.; LEE, S.Y. Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnol. Bioeng*. V. 109, p. 2437–2459, 2012.

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

JOMNONKHAOW, U.; UWINEZA, C.; MAHBOUBI, A.; WAINAINA, S.; REUNGSANG, A.; TAHERZADEH, M. J. Membrane bioreactor-assisted volatile fatty acids production and in situ recovery from cow manure. *Bioresource Technology*, v. 321, 124456, 2021.

JONES, R. J.; MASSANET-NICOLAU, J.; MULDER, M. J. J.; PREMIER, G.; DINSDALE, R.; GUWY, A. Increased biohydrogen yields, volatile fatty acid production and substrate utilisation rates via the electro dialysis of a continually fed sucrose fermenter. *Bioresource Technology*, v. 229, p. 46-52, 2017.

- JUNGHARE, M.; SPITELLER, D.; SCHINK, B. Anaerobic degradation of xenobiotic isophthalate by the fermenting bacterium *Syntrophorhabdus aromaticivorans*. *The ISME Journal*, v. 13, p. 1252–1268, 2019.
- JUVONEN, R. *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikaræ* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56(4), p. 695–702, 2006.
- KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Sulfate reduction based process for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Engineering in Life Science*, v. 7, n. 6, p. 541–564, 2007.
- KATO, H.; YOSHIDA, A.; AWANO, S.; ANSAI, T.; TAKEHARA, T. Quantitative detection of volatile sulfur compound-producing microorganisms in oral specimens using real-time PCR. *Oral Diseases*, v. 11, n. 1, p. 67–71, 2005.
- KEFENI, K. K.; MSAGATI, T. A. M.; MAMBA, B. B. Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. *Journal of Cleaner Production*. v. 151, p. 474–493, 2017.
- KIM, S.-H.; KIM, I. H.; LEE, W. J.; LEE, J. -H. Characterization of thiosulfate-oxidizing *Enterobacter hormaechei* JH isolated from barnyard manure. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 25, n. 5, p. 1131–1135, 2008.
- KO, J.-J.; SHIMIZU, Y.; IKEDA, K.; KIM, S.-K.; PARK, C.-H.; MATSUI, S. Biodegradation of high molecular weight lignin under sulfate reducing conditions: Lignin degradability and degradation by-products. *Bioresource Technology*, 100(4), 1622–1627, 2009.
- KOMAGATA, K.; IINO, T.; YAMADA, Y. The Family *Acetobacteraceae*. *The Prokaryotes*, 3–78, 2014.
- KRAMER, T.; KELLEHER, P.; VAN DER MEER, J.; O’SULLIVAN, T.; GEERTMAN, J. -M. A.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.; LOUIS, P. Comparative genetic and physiological characterisation of *Pectinatus* species reveals shared tolerance to beer-associated stressors but halotolerance specific to pickle-associated strains, *Food Microbiology*, v. 90, n. 103462, 2020.
- KRONECK, P.M.H.; TORRES, M.E.S. *The Metal-Driven Biogeochemistry of Gaseous Compounds in the Environment*. Metal Ions in Life Sciences, 14. Dordrecht, 2014.
- KUEVER, J.; RAINEY, F. A.; WIDDEL, F. *Desulfobacteraceae* fam. nov. *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–3, 2015.
- KUCEK, L.A., XU, J., NGUYEN, M., ANGENENT, L.T. Waste conversion into n-caprylate and n-caproate: resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction. *Front. Microbiol.* v. 7, 2016.
- KUMAR, N.; OMOREGIE, E. O.; ROSE, J.; MASON, A.; LLOYD, J. R.; DIELS, L.; BASTIAENS, L. Inhibition of sulfate reducing bacteria in aquifer sediment by iron nanoparticles. *Water Research*, v. 51, p. 64–72, 2014.
- KUMAR, P; SHARMA, R; RAY, S; MEHARIYA, S; PATEL, S. K. S.; LEE, JK; KALIA, V. C. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*, v. 182, p. 383–388, 2015.
- KUMAR, R. N.; MCCULLOUGH, C. D.; LUND, M. A. Sourcing Organic Materials for Pit Lake Bioremediation in Remote Mining Regions. *Mine Water Environ.* v. 30, p. 296–301, 2011.

- LAN, W.; YANG, C. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of The Total Environment*, v. 654, p. 1270-1283, 2018.
- LANGMAN, J. B.; SINCLAIR, S.; AMOS, R. T.; WILSON, D.; PTACEK, C. J.; SEGO, D. C.; BLOWES, D. W. Alkalinity generation from weathering of accessory calcite and apatite and acid drainage neutralization in an Archean granitoid waste rock. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 205, 2019.
- LENS, P. N. L.; KUENEN, J. G. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*, v. 44, n. 8, p. 57-66, 2001.
- LENS, P. N. L.; VAN DEN BOSH, M. C.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Effect of staging on volatile fatty acid degradation in a sulfidogenic granular sludge reactor. *Water Research*, v. 32, n. 4, p. 1178-1192, 1998.
- LEWIS, A. M. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, 104, 222-234, 2010.
- LI, L., XUE, S., XI, J. Anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction: Consortium characteristics and application in co-removal of H₂S and methane. *Journal of Environmental Sciences*, 2018.
- LIN, S. H. R. Mackey, T. Hao., 2018. Biological sulfur oxidation in wastewater treatment: A review of emerging opportunities. *Water Research*. v. 143, p. 399-415, 2010.
- LI, X.; CANIBE, N.; JENSEN, B. B.; JENSEN, R. L.; HØJBERG, O. *Olsenella scatoligenes* sp. nov., a 3-methylindole- (skatole) and 4-methylphenol- (p-cresol) producing bacterium isolated from pig faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 1227-1233, 2015.
- LI, Y.; ZHAO, S.; WANG, Y. Microbial Desulfurization of Ground Tire Rubber by *Sphingomonas* sp.: A Novel Technology for Crumb Rubber Composites. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 20, p. 372-380, 2011.
- LIANG, F.; XIAO, Y.; ZHAO, F. Effect of pH on sulfate removal from wastewater using a bioelectrochemical system. *Chemical Engineering Journal*, v. 218, p. 147-153, 2013.
- LIEN, T.; BEEDER, J. *Desulfobacter vibrioformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. *International journal of systematic bacteriology*, v. 47, n. 4, p. 1124-1128, 1997.
- LIN, S.; MACKAY, H.R.; HAO, T. Biological sulfur oxidation in wastewater treatment: A review of emerging opportunities. *Water Research*. v.143, p. 399-415, 2018.
- LINEHAN B.; SCHEIFINGER C. C.; WOLIN, M. J. Nutritional Requirements of *Selenomonas ruminantium* for Growth on Lactate, Glycerol, or Glucose. *Environmental Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 317-22, 1978.
- LIU, Y.; BALKWILL, D. L.; ALDRICH, H. C.; DRAKE, G. R.; BOONE, D. R. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 545-556, 1999.
- LONGO, S.; KATSOU, E.; MALAMIS, S.; FRISON, N.; RENZI, D.; FATONE, F. Recovery of volatile fatty acids from fermentation of sewage sludge in municipal wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 436-444, 2015.

- MACY, J. M.; SANTINI, J. M.; PAULING, B. V.; O'NEILL, A. H.; SLY, L. I. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Archives of Microbiology*, v. 173, n. 1, p. 49–57, 2000.
- MADIGAN, M. T., RESNICK, S. M., KEMPER, M. L., DOHNALKOVA, A. C., TAKAICHI, S., WANG-OTOMO, Z.-Y., TSUKATANI, Y. *Blastochloris tepida*, sp. nov., a thermophilic species of the bacteriochlorophyll b-containing genus *Blastochloris*. *Archives of Microbiology*, 2019. doi:10.1007/s00203-019-01701-4
- MAMUAD, L. L.; KIM, S. H.; CHOI, Y. J.; SORIANO, A. P.; CHO, K. K.; LEE, K.; ... LEE, S. S. Increased propionate concentration in *Lactobacillus mucosae* -fermented wet brewers grains and during in vitro rumen fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 123, n. 1, p. 29–40, 2017.
- MAO, B.; GU, J.; LI, D.; CUI, S.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Effects of Different Doses of Fructooligosaccharides (FOS) on the Composition of Mice Fecal Microbiota, Especially the *Bifidobacterium* Composition. *Nutrients*, v. 10, n. 1105, 2018.
- MARIETOU, A.; RØY, H.; JØRGENSEN, B. B.; KJELDTSEN, K. U. Sulfate Transporters in Dissimilatory Sulfate Reducing Microorganisms: A Comparative Genomics Analysis. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. 309, p. 1-21, 2018.
- MARTINS, M.; SANTOS, E. S.; PIRES, C.; BARROS, R. J.; COSTA, M. C. Production of irrigation water from bioremediation of acid mine drainage: comparing the performance of two representative systems. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, p. 248–253, 2010.
- MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Caracterização de resíduos cervejeiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20. Florianópolis. Anais eletrônicos. Florianópolis: ABEQ, 2014. p. 1-8, 2014.
- MATOS, L. P.; COSTA, P. F.; MOREIRA M.; GOMES, P. C. S.; SILVA, S. Q.; GURGEL, L. V. A.; TEIXEIRA, M. C. Simultaneous removal of sulfate and arsenic using immobilized non-traditional SRB mixed culture and alternative low-cost carbon sources. *Chemical Engineering Journal*. v. 334, p. 1630-1641, 2018.
- MATOULKOVÁ D.; KUBIZNIAKOVÁ P. Microbiology of brewing - Strictly anaerobic bacteria *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Zymophilus* and *Selenomonas* and methods for their detection. *Kvasný Průmysl*, v. 60, p. 285-294, 2014.
- MCGREGOR, R.; BLOWES, D.W. The physical chemical and mineralogical properties of three cemented layers within sulfide - bearing mine tailings. *Journal of Geochemical Exploration*. v76(3) p.195-207, 2002.
- MELLO, J. W. V. Avaliação preliminar de drenagem ácida no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v. 30, n. 2, p. 365-375, 2006.
- MENERT, A.; PAALME, V.; JUHKAM, J.; VILU, R. Characterization of sulfate-reducing bacteria in yeast industry waste by microcalorimetry and PCR amplification. *Thermochimica Acta*, v. 420, p. 89–98, 2004.
- METCALF; EDDY. Wastewater engineering: treatment and reuse. McGraw Hill; 2003 1408 pp.
- MILLER, S.; STEWART, W.; RUSDINAR, Y. Methods for estimation of long-term non-carbonate neutralization of acid rock drainage. *Science of The Total Environment*, v. 408, p. 2129–2135, 2010.

- MOCKAITIS, G.; PANTOJA, J. L. R.; RODRIGUES, J. A. D. Continuous anaerobic bioreactor with fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. *Bioproc. Biosyst. Eng.* v. 37, p. 1361-1368, 2014.
- MOHAJERI, M. H.; BRUMMER, R. J. M.; RASTALL, R. A.; WEERSMA, R. K.; HARMSSEN, H. J. M.; FAAS, M.; EGGERSDORFER, M. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition*, v. 57, p. 1–14, 2018.
- MOLLAEI, MONIR; SLEUTELS, TOM H. J. A.; STAMS, A. J. M.; PLUGGE, CAROLINE M. Syntrophic cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Syntrophobacter fumaroxidans* growing on propionate and Fe (III) or a solid electrode as electron acceptors. Microbiology Centennial Symposium 2017 - Exploring Microbes for the Quality of Life (Book of Abstracts). Wageningen, The Netherlands, Oct 18-20, 73, 2017. ISBN: 978-94-6343-808-7
- MOODLEY, I.; SHERIDANA, C. M.; KAPPELMEYER, U. Environmentally sustainable acid mine drainage remediation: Research developments with a focus on waste/by-products. *Minerals Engineering*. v. 126, p. 207-220, 2017.
- MORA, M.; LAFUENTE, J.; GABRIEL, D. Screening of biological sulfate reduction conditions for sulfidogenesis promotion using a methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, v. 210, p. 557-566, 2018.
- MORAIS, N. W. S.; COELHO, M. M. H.; FERREIRA, T. J. T.; PEREIRA, E. L.; LEITÃO, R. C.; DOS SANTOS, A. B. A kinetic study on carboxylic acids production using bovine slaughterhouse wastewater: a promising substrate for resource recovery in biotechnological processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020. doi:10.1007/s00449-020-02440-3
- MORI, K.; SUZUKI, K. -I. *Thiofaba tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium of the *Gammaproteobacteria* isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 1885–1891, 2008.
- MORI, K.; YAMAGUCHI, K.; SAKIYAMA, Y.; URABE, T.; SUZUKI, K. -I. *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 *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 11, p. 2894–2898, 2009.
- MOTTERAN, F.; NADAI, B. M.; BRAGA, J. K.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Metabolic routes involved in the removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) employing linear alcohol ethoxylated and ethanol as co-substrates in enlarged scale fluidized bed reactor. *Science of The Total Environment*, v. 640-641, p. 1411–1423, 2018.
- MUHAMMAD, S. N.; KUSIN, F. M.; ZAHAR, M. S. M.; HALIMOON, N.; YUSUF, F. M. Passive treatment of acid mine drainage using mixed substrates: batch experiments. *Procedia Environmental Sciences*, v. 30, p. 157–161, 2015.
- MURAKAMI-NITTA, T.; KURIMURA, H.; KIRIMURA, K.; KINO, K.; USAMI, S. Continuous degradation of dimethyl sulfoxide to sulfate ion by *Hyphomicrobium denitrificans* WU-K217. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 1, p. 52–56, 2002.
- MUYSER G; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, v. 6, n. 6, p. 441-454, 2008.

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

NAGPAL, S.; CHUICHULCHERM, S.; PEEVA, L.; LIVINGSTON, A. Microbial sulfate reduction in a liquid–solid fluidized bed reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70, n. 4, p. 370–380, 2000.

NAKASAKI, K.; NGUYEN, K. K.; BALLESTEROS, F. C.; MAEKAWA, T.; KOYAMA, M. Characterizing the microbial community involved in anaerobic digestion of lipid-rich wastewater to produce methane gas. *Anaerobe*, p. 102082, 2019.

NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy*, v. 25, n. 4, 2014.

NASCIMENTO, M. R. L. Remoção e recuperação de urânio de águas ácidas de mina por resina de troca iônica, 1998. 93f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 1998.

NECULITA C. M.; ZAGURY G. J. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials*, v. 157, p. 358-366, 2008.

NETO, R. R.; CROCETTA, M. S.; SOUZA, M.G.R. Combined treatment of acid mine drainage and sewage in the State of Santa Catarina-Brazil. In: Wolkersdorfer C and Freund A (eds.). *Mine Water and Innovative Thinking*; Sydney, Nova Scotia, 2010.

NOGUEIRA, E. W.; LICONA, F. M.; GODOI, L. A. G.; BRUCHA G.; DAMIANOVIC M. H. R. Z. Biological treatment removal of rare earth elements and yttrium (REY) and metals from actual acid mine drainage. *Water Science & Technology*, v. 80, n. 8, p. 1485-1493, 2019.

ODDÓ D.; DÍAZ Y. Retrato microbiológico: *Sarcina Ventriculi*. *Revista Chilena de infectologia*, v. 36, n. 1, p. 41-42, 2019.

OKAMURA, K.; HISADA, T.; KANBE, T.; HIRAIISHI, A. *Rhodovastum atsumiense* gen. nov., sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from paddy soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 55, p. 43–50, 2009.

OLIVEIRA, J. V.; ALVES, M. M.; COSTA, J. C. Biochemical methane potential of brewery by-products. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 20, n. 2, p. 435-440, 2018.

OMIL, F.; LENS, P.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA G. Effect of Upward Velocity and Sulphide Concentration on Volatile Fatty Acid Degradation in a Sulphidogenic Granular Sludge Reactor. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 7, p. 699-710, 1996.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L. W.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 15, p. 119–136, 1994.

PALANIAPPAN, K.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; TESHIMA, H.; NOLAN, M.; LAPIDUS, A.; TICE, H.; ... WOYKE, T. Genome sequence of the moderately thermophilic sulfur-reducing bacterium *Thermanaerovibrio velox* type strain (Z-9701T) and emended description of the genus *Thermanaerovibrio*. *Standards in Genomic Sciences*, v. 9, p. 57–70, 2013.

PAPIRIO S.; ESPOSITO G.; PIROZZI F. Biological inverse fluidized-bed reactors for the treatment of low pH- and sulphate-containing wastewaters under different COD/SO₄²⁻ conditions. *Environ Technol.*, v. 34, p. 1141-1149, 2013.

- PARADH, A. D. Gram-negative spoilage bacteria in brewing. *Brewing Microbiology*, p. 175–194, 2015.
- PAULO, L. M.; STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z. Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 14(4), p. 537–553, 2015.
- PEDIZZI, C.; REGUEIRO, L.; RODRIGUEZ-VERDE, I.; LEMA, J. M.; CARBALLA, M. Effect of oxygen on the microbial activities of thermophilic anaerobic biomass. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 765-768, 2016.
- PERIMENIS, A.; NICOLAY, T.; LECLERCQ, M.; GERIN, P. A. Comparison of the acidogenic and methanogenic potential of agroindustrial residues. *Waste Management*, v. 72, p. 178–185, 2018.
- PESTER, M.; BITTNER, N.; DEEVONG, P.; WAGNER, M.; LOY, A. A ‘rare biosphere’ microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *ISME J*, v. 4, p. 1591–1602, 2010.
- PLACE, D.L., FIGUEROA, L., WILDEMAN, T. Characterizing and tracking reactive mixture alteration: new tools for passive treatment design and monitoring. Proceedings of the 7th ICARD, St. Louis, MO, p 25–30, 2006.
- PODOSOKORSKAYA, O. A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A.; NOVIKOV, A. A.; KOLGANOVA, T. V.; KUBLANOV, I. V. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 86–92, 2012.
- POZO, G.; JOURDIN, L.; LU, Y.; LEDEZMA, P.; KELLER, J.; FREGUIA, S. Methanobacterium enables high rate electricity-driven autotrophic sulfate reduction *RSC Advances*, v. 5, n. 109, p. 89368-89374, 2015.
- PRICE, W.A. Prediction Manual of drainage chemistry from Sulphidic Geologic Materials. Smithers (BC): MEND Report, 2009.
- QATIBI, A. I.; BORIES, A.; GARCIA, J. Sulfate Reduction and Anaerobic Glycerol Degradation by a Mixed Microbial Culture. *Current Microbiology*, v. 22, p. 47-52, 1991.
- QUIJANO, G.; FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; BUITRÓN, G. Fully aerobic two-step desulfurization process for purification of highly H₂S-laden biogas. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 93, n. 12, p. 3553-3561, 2018.
- QUISPE, C. A. G.; CORONADO C. J. R.; CARVALHO JR J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 475–493, 2013.
- RAGHUNANDAN, K.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas* spp. *3 Biotech*, v. 8(1), 2018.
- REES, G. N.; PATEL B. K. *Desulforegula conservatrix* gen. nov., sp. nov., a long-chain fatty acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 1911–1916, 2001.
- REIS, M. A. M.; LEMOS, P. C.; ALMEIDA, J. S.; CARRONDO, M. J. T. Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology Letters*, v. 12, n. 2, p. 145–148, 1990.

- REISMAN, D. J.; GUSEK, J. J.; BISHOP, M. A pre treatability study to provide data for construction of a demonstration bioreactor. In: The proceedings of the 10th international conference on tailings and mine waste. p305–315, 2003.
- REYES, L.; NIKITINE, C.; VILCOCQ, L.; FONGARLAND, P. Green is the new Black – A review of technologies for carboxylic acids recovery from black liquor. *Green Chemistry*, 2020. doi:10.1039/d0gc02627a
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.
- RODRIGUEZ, R.P. *Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas*. 2010. 198 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 2010.
- RODRIGUEZ, R. P.; OLIVEIRA, G. H. D. ; RAIMUNDI, I. M. ; ZAIAT, M. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 74, p. 48-53, 2012.
- RODRIGUEZ-FREIRE, L.; SIERRA-ALVAREZ, R., ROOT, R.; CHOROVER, J.; J. A. FIELD. Biomineralization of arsenate to arsenic sulfides is greatly enhanced at mildly acidic conditions. *Water Research*. V. 66(5), p242-253, 2014.
- RODRIGUEZ-FREIRE, R. L., MOORE, S. E., SIERRA, A. R.; ROOT, R. A.; CHOROVER, J.; FIELD, J. A. Arsenic remediation by formation of arsenic sulfide minerals in a continuous anaerobic bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 113, p. 522-530, 2015.
- ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C.; GOUET, P. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Current Microbiology*, v. 25, p. 197–201, 1992.
- ROOS, S.; ENGSTRAND, L.; JONSSON, H. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 77–82, 2005.
- RÜFFEL, V.; MAAR, M.; DAMMBRÜCK, M. N.; HAURÖDER, B.; NEU, T. R.; MEIER, J. *Thermodesulfobium* sp. strain 3baa, an acidophilic sulfate reducing bacterium forming biofilms triggered by mineral precipitation. *Environmental Microbiology*, v. 20, p. 3717-3731, 2018.
- SADHUKHAN, S.; VILLA, R.; SARKAR, U. Microbial production of succinic acid using crude and purified glycerol from a *Crotalaria juncea* based biorefinery. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 84–93, 2016.
- SAMPAIO, G. F.; DOS SANTOS, A. M.; DA COSTA, P. R.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. High rate of biological removal of sulfate, organic matter and metals in uabs reactor to treat synthetic acid mine drainage and cheese whey wastewater as carbon source. *Water Environment Research*. v. 92, p. 245-254, 2019.
- SAMUDRALA, S. P. Glycerol Transformation to Value-Added 1,3-Propanediol Production: A Paradigm for a Sustainable Biorefinery Process. *Glycerine Production and Transformation - An Innovative Platform for Sustainable Biorefinery and Energy*, 2019.
- SAMUDRALA, S. P.; KANDASAMY, S.; BHATTACHARYA, S. Turning Biodiesel Waste Glycerol into 1,3-Propanediol: Catalytic Performance of Sulphuric acid-Activated Montmorillonite Supported Platinum Catalysts in Glycerol Hydrogenolysis. *Scientific Reports*, v. 8, p. 7484, 2018.

- SÁNCHEZ, I.; SANZ, J. L.; BIJMANS, M. F. M.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, v. 269, p. 98–109, 2014.
- SANTOS, A. L.; JOHNSON, D. B. Design and Application of a Low pH Upflow Biofilm Sulfidogenic Bioreactor for Recovering Transition Metals From Synthetic Waste Water at a Brazilian Copper Mine. *Frontiers in Microbiology*, v.9, p. 2051, 2018.
- SANTOS, A. L.; JOHNSON, D. B. The effects of temperature and pH on the kinetics of an acidophilic sulfidogenic bioreactor and indigenous microbial communities. *Hydrometallurgy*, v. 168, p. 116–120, 2017.
- SANTOS, S. C.; LIEBENSTEINER, M. G.; SOUZA, L. C. S. V.; RAMOS, C. L. S.; BATISTA, L. L. F.; MATOS, J. B. T. L.; QUINTELLA, C. M.; ALMEIRDA, P. F. Crude Glycerol as a Substrate for Sulfate-reducing Bacteria from a Mature Oil Field and its Potential Impact on Souring. *Journal of Petroleum Science and Technology*, v. 5, p. 01-09, 2015.
- SARRET, G., AVOSCAN, L.; CARRIÈRE, M.; COLLINS, R.; GEOFFROY, N.; CARROT, F.; COVÈS, J.; GOUGET, B. Chemical Forms of Selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Appl Environ Microbiol* 71 (5): 2331-2337, 2005.
- SCOTT, A.; KNOTT. MCluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. *Biometrics*, 30, 507-512, 1974.
- SCHLEIFER, K. H.; LEUTERITZ, M.; WEISS, N.; LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G.; SEIDEL-RUFER, H. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: amended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 40, n. 1, p. 19–27, 1990.
- SHAH, A. F.; MAHMOOD, Q.; MAROOF SHAH, M.; PERVEZ, A.; AHMAD ASAD, S. Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 1–21, 183752, 2014.
- SHAN, L.; ZHANG, Z.; YU, Y.; AMBUCHI, J. J.; FENG, Y. Performance of CSTR–EGSB–SBR system for treating sulfate-rich cellulosic ethanol wastewater and microbial community analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 14387–14395, 2017.
- SHI, J.; ZHANG, B.; QIU, R.; LAI, C.; JIANG, Y.; HE, C.; GUO, J. Microbial Chromate Reduction Coupled to Anaerobic Oxidation of Elemental Sulfur or Zerovalent Iron. *Environmental Science & Technology*, v. 53, p. 3198-3207, 2019.
- SHIM, M.J.; CHOI, B.Y.; LEE, G. Water quality changes in acid mine drainage streams in Gangneung, Korea, 10years after treatment with limestone. *Journal of Geochemical Exploration*. v159 p.234-242, 2015.
- SILES, J. A.; MARTÍN, M. A.; CHICA, A. F.; MARTÍN, A. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource technology*, v. 101, n. 16, p. 6315–6321, 2010.
- SILVA, A. J.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E. Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 9, p. 927-935, 2002.
- SILVA, A. J.; DOMINGUES, M. R.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI E.; ZAIAT, M. Kinetic modeling and microbial assessment by fluorescent in situ hybridization in

anaerobic sequencing batch biofilm reactors treating sulfate-rich wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 2, 2011.

SILVAS, S.P.C.; BUZZI, D.C.; BERNARDES, A.M. Caracterização e neutralização de drenagens ácidas de minas provenientes da mineração de carvão em Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*. v.20 p.23-32, 2011.

SIMATE, G. S.; CLUETT, J.; IYUKE, S. E.; MUSAPATIKA, E. T.; NDLOVU, S.; WALUBITA, L. F.; ALVAREZ, A. E. The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. *Desalination*, v. 273, p. 235–247, 2011.

SIMATE, G.S.; NDLOVU, S. Acid mine drainage: Challenges and opportunities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, p. 1785–1803, 2014.

SINGH, A. L.; SINGH, P. K.; KUMAR, A.; SINGH, M. P. Desulfurization of Selected Hard and Brown Coal Samples from India and Indonesia with *Ralstonia* Sp and *Pseudoxanthomonas* sp. *Energy Exploration & Exploitation*, v. 30, n. 6, p. 985–998, 2012.

SINGH, R.; MOON, C.; VEERAVALLI, S.; SHANMUGAM, S.; CHAGANTI, S.; LALMAN, J. Using a Statistical Model to Examine the Effect of COD: SO₄²⁻ Ratio, HRT and LA Concentration on Sulfate Reduction in an Anaerobic Sequencing Batch Reactor. *Water*, v. 6, p. 3478–3494, 2014.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, v. 145, p. 166-174, 2013.

SKOUSEN, J.; ZIPPER, C. E.; ROSE, A. Review of Passive Systems for Acid Mine Drainage Treatment. *Mine Water Environ*, v. 36, p. 133–153, 2017.

SMYNTEK, P. M.; CHASTEL, J.; PEER, R. A. M.; ANTHONY, E.; MCCLOSKEY, J. Assessment of sulphate and iron reduction rates during reactor *start-up* for passive anaerobic co-treatment of acid mine drainage and sewage. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, v. 18, p. 76–84, 2018.

SONG, Y. L.; LIU, C. X.; MCTEAGUE, M.; SUMMANEN, P.; FINEGOLD, S. M. *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. *Anaerobe*, v. 10, n. 3, p. 179–184, 2004.

SRINIVASAN, S.; BEAMER, M. A.; FIEDLER, T. L.; AUSTIN, M. N.; SIZOVA, M. V.; STRENK, S. M.; HILLIER, S. L. Characterization of novel megasphaera species from the female reproductive tract. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 219, p. 648–649, 2018.

STEER, T.; COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R.; HIPPE, H.; LAWSON, P. A. *Clostridium hathewayi* sp. nov., from Human Faeces. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 24, p. 353–357, 2001.

STOFFELS, L.; KREHENBRINK, M.; BERKS, B. C.; UNDEN, G. Thiosulfate Reduction in *Salmonella enterica* Is Driven by the Proton Motive Force. *Journal of Bacteriology*, v. 194, p. 475–485, 2011.

STROSNIDER, W. H. J.; NAIRN, R. W.; PEER, R. A. M.; WINFREY, B. K. Passive co-treatment of Zn-rich acid mine drainage and raw municipal. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 125, p. 110–116, 2013.

- SUZUKI, D.; LI, Z.; CUI, X.; ZHANG, C.; KATAYAMA, A. Reclassification of *Desulfobacterium anilini* as *Desulfatiglans anilini* comb. nov. within *Desulfatiglans* gen. nov., and description of a 4-chlorophenol-degrading sulfate-reducing bacterium, *Desulfatiglans parachlorophenolica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 3081–3086, 2014.
- TAKADA, T.; WATANABLE, K.; MAKINO, H.; KUSHIRO, A. Reclassification of *Eubacterium desmolans* as *Butyricicoccus desmolans* comb. nov., and description of *Butyricicoccus faecihominis* sp. nov., a butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 10, 2016.
- TAKESHITA, T.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; YASUI, M.; YONEDA, M.; SHIMAZAKI, Y.; ... YAMASHITA, Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Scientific Reports*, v. 2, n. 215, 2012.
- TANAKA, K.; STACKEBRANDT, E.; TOHYAMA, S.; EGUCHI, T. *Desulfovirga adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, Gram-negative, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 639–644, 2000.
- TAOUS, K.; JOONG K. The structure and physical properties of glucuronic acid oligomers produced by a *Gluconacetobacter hansenii* strain using the waste from beer fermentation broth *Carbohydrate Polymers*. v. 73, p. 438-445, 2008.
- TAUSEEF S.M.; ABBASI T.; ABBASI S.A. Energy recovery from wastewaters with high-rate anaerobic digesters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 19, 704-741, 2013.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, v. 22, p. 261–265, 2006.
- UMRANIA, V. V. Role of acidothermophilic autotrophs in bioleaching of mineral sulfides ores. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 451-464, 2003.
- USHER, K. M.; KAKSONEN, A. H.; MACLEOD, I. D. Marine rust tubercles harbour iron corroding archaea and sulphate reducing bacteria. *Corrosion Science*, v. 83, p. 189–197, 2014.
- VAN LIS, R.; NITSCHKE, W.; DUVAL, S.; SCHOEPP-COTHENET, B. Arsenics as bioenergetic substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1827, n. 2, p. 176–188, 2013.
- VAN DEN HOECKE, S.; VERHELST, J.; VUYLSTEKE, M.; SAELENS, X. Analysis of the genetic diversity of influenza A viruses using next-generation DNA sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 79, 2015. doi:10.1186/s12864-015-1284-z
- VARON-LOPEZ MARYEIMY. Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais. 2013. 109 f. Tese (doutorado) – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.
- VERAS, S. T. S. Produção de compostos com valor agregado a partir da degradação anaeróbia do glicerol. 2019. 192 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2019.
- VERSLYPPE, B.; DE SMET, W.; DE BAETS, B.; DE VOS, P.; DAWYNDT P. StrainInfo introduces electronic passports for microorganisms. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 37, p. 42-50, 2014.
- VIEIRA, B. F.; COUTO, P. T.; SANCINETTI, G. P.; KLEIN, B.; ZYL, D.; RODRIGUEZ, R. P. The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic

- process in anaerobic reactor. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 51, p. 793–797, 2016.
- WASHIO, J.; SHIMADA, Y.; YAMADA, M.; SAKAMAKI, R.; TAKAHASHI, N. Effects of pH and Lactate on Hydrogen Sulfide Production by Oral *Veillonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 14, p. 4184–4188, 2014.
- WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; TOMII, Y.; SASAMOTO, M.; MAKINO, H.; KUDO, Y.; OKADA, S. *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 754–760, 2009.
- WENDT-POTTHOFF, K.; NEU, T. R. Microbial processes for potential in situ remediation of acidic lakes. *Acidic mining lakes*, p. 269–284, 1998.
- WISOTZKY, F.; LENK, S. Darstellung und Evaluierung der Minderungsmaßnahmen zur Kippenwasserversauerung im Tagebau Garzweiler der RWE Power AG (Rheinisches Braunkohlrevier, Germany). *Wissenschaftliche Mitteilungen*, v. 31, p. 133-138, 2006.
- YANO, T.; FUKAMACHI, H.; YAMAMOTO, M.; IGARASHI, T. Characterization of L-cysteine desulfhydrase from *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 24, p. 485–492, 2009.
- ZAMZOW, K.; TSUKAMOTO, T. K.; MILLER, G. C. Biodiesel waste fluid as inexpensive carbon source for bioreactors treating acid mine drainage. IMWA Symposium 2007: *Water in Mining Environments*, R. Cidu & F. Frau (Eds) 27th. Cagliari, Italy, 2007.
- ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.
- ZHANG, X; YAN, S; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Energy balance of biofuel production from biological conversion of crude glycerol. *Journal of Environmental Management*, v. 170, p. 169-176, 2016.
- ZHOU, M.; YAN, B.; WONG, J. W. C.; ZHANG, Y. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource Technology*, v. 248, p. 68-78, 2017.