

ANGELICA MARCIA DOS SANTOS

**EFEITOS DA RELAÇÃO  $DQO/SO_4^{-2}$  E DOS  
DOADORES DE ELÉTRONS NA RIQUEZA  
MICROBIANA DE REATORES UTILIZADOS  
NO TRATAMENTO DE ÁGUAS  
RESIDUÁRIAS ÁCIDAS RICAS EM SULFATO**

Poços de Caldas/MG

2016

ANGELICA MARCIA DOS SANTOS

**EFEITOS DA RELAÇÃO  $DQO/SO_4^{-2}$  E DOS  
DOADORES DE ELÉTRONS NA RIQUEZA  
MICROBIANA DE REATORES UTILIZADOS NO  
TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS ÁCIDAS  
RICAS EM SULFATO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas *campus* Poços de Caldas. Área de concentração: Tratamento de águas residuárias  
Orientadora: Renata Piacentini Rodriguez

Poços de Caldas/MG

2016

S237e Santos, Angelica Marcia dos.

Efeitos da relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> e dos doadores de elétrons na riqueza microbiana de reatores utilizados no tratamento de águas residuárias ácidas ricas em sulfato / Angelica Marcia dos Santos. – Poços de Caldas, 2016.

78 f. –

Orientadora: Renata Piacentini Rodriguez.

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

Bibliografia.

1. Aguas residuais. 2. Demanda química de oxigênio. 3. Sulfatos.  
I. Rodriguez, Renata Piacentini. II. Título.

CDD: 628.1

ANGELICA MARCIA DOS SANTOS

**EFEITOS DA RELAÇÃO  $DQO/SO_4^{-2}$  E DOS  
DOADORES DE ELÉTRONS NA RIQUEZA  
MICROBIANA DE REATORES UTILIZADOS NO  
TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS ÁCIDAS  
RICAS EM SULFATO**

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

Orientadora: Renata Piacentini Rodriguez

Trabalho aprovado. Poços de Caldas/MG, 13 de dezembro de 2016:



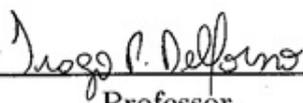
---

Renata Piacentini Rodriguez  
Orientadora



---

Professor  
Dr. Marcelo Zaiat



---

Professor  
Dr. Tiago Palladino Delforno

Poços de Caldas/MG

2016

*Aos meus pais, Ivo e Cida.*

# AGRADECIMENTOS

A Deus a quem me proporcionou o dom da vida e forças para que tudo ocorresse da melhor forma, colocando pessoas especiais no meu caminho, colaboradoras desta conquista, que sem eles, nada teria acontecido.

Aos melhores pais do mundo, Ivo e Cida, que nunca mediram esforços para me ver bem e sempre estiveram presentes nas horas que mais precisei. Pai e mãe, vocês são exemplos e alicerce de vida, os quais me inspiram e serei eternamente grata. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Meiri e Aline, e meus cunhados, Marquinho e Amarildo, por todo carinho, incentivo constante e sempre dispostos a me ajudar.

Meu namorado Gilberto por estar sempre ao meu lado, pela paciência, apoio e amor.

Gratidão eterna pela minha orientadora professora Dra. Renata, que desde a iniciação científica me acolheu com muita paciência, carinho, dedicação e me fez acreditar que somos capazes de sermos cada vez melhores. Obrigada pelo tamanho conhecimento adquirido e pela confiança. Minha admiração e respeito.

À pós-doutoranda Elize Hayashi pela paciência, dedicação e pelos ensinamentos de biologia molecular.

Aos professores Marcos, Gunther, Leonardo, Rogers, Marcelo, Rafael e Giselle pelos conhecimentos transmitidos que ajudaram na minha formação.

Aos colegas de laboratório Rafael, Marina, Josiel, Bia, Patrícia e Alessandra por compartilhar momentos de desesperos e aflições, de reatores entupidos, semana de prova, preparo de soluções, curva de calibração, lavagem de fracos de NMP e agitações de frascos de extração de DNA. Juntos, sempre tornávamos mais fácil e prazeroso as horas de laboratório. Obrigada por tudo e sucesso para vocês!

À Mirabelle, amiga que a UNIFAL me concedeu. Meus agradecimentos pela paciência, apoio nas horas difíceis, conselhos e sempre pronta para ajudar. Já sinto falta das nossas comilanças, das andanças na Assis, do condomínio Pajuçara, da rotina do Biotec... Foram momentos bons que jamais serão esquecidos, obrigada por tudo Mira!

À Deborah, amiga de longa data, desde o técnico em química ao mestrado. Obrigada “Caroline” pela amizade, companheirismo, pelos anos que moramos juntas na Dona Má e no apê. Tempos que serão sempre lembrados. Obrigada!

Aos amigos Bruno e Layde, por compartilhar momentos tristes e alegres durante todo período de UNIFAL, vocês foram essenciais.

Deixo aqui meu agradecimento a todos vocês que proporcionaram mais uma conquista para minha vida.

*É preciso estudar muito para saber um pouco.*  
*Montesquieu*

# RESUMO

A redução biológica de sulfato tem sido aplicado com sucesso no tratamento de águas residuárias industriais cujos despejos contém elevadas concentrações de sulfato. Nesta pesquisa, a redução biológica de sulfato foi avaliada de acordo com a relação de demanda química de oxigênio ( $DQO$ )/sulfato ( $SO_4^{-2}$ ) e diferentes doadores de elétrons utilizando reatores em batelada operados por 88 dias. Os reatores foram alimentados com água residuária ácida sintética em pH 4,0 e os doadores de elétrons foram etanol, lactato de sódio e soro de leite, sendo individualmente analisados nas relações  $DQO/SO_4^{-2}$  de 1 e 2. Na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0, as taxas de remoções para DQO e sulfato para todos os doadores de elétrons estiveram acima de 68% para DQO e 73% para o sulfato. No entanto, na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2,0, apenas o lactato resultou em altas taxas de remoções de DQO e sulfato ( $71 \pm 17\%$  e  $90 \pm 6\%$ , respectivamente). A técnica de NMP foi utilizada para quantificação de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e os resultados demonstraram que a população de BRS aumentou  $10^2$  vezes na presença de etanol e  $10^3$  na presença de lactato, na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0. Porém, a população de BRS diminuiu com aumento da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  nos doadores de elétrons etanol e lactato, enquanto o soro de leite não promoveu crescimento de BRS nas relações  $DQO/SO_4^{-2}$  estudadas. A biomassa foi caracterizada utilizando-se a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Para o *Domínio Bactéria* e o grupo das BRS, uma alta riqueza microbiana e baixa similaridade foi obtida em comparação ao inóculo, enquanto para o *Domínio Arqueia*, observaram-se poucas mudanças quando comparadas com mesmo inóculo e entre as diferentes condições avaliadas nos reatores. A filogenia do grupo das sulfato redutoras mostraram predominância da espécie *Desulfovibrio* para todos os substratos estudados, sendo todas as espécies encontradas caracterizadas como oxidadoras incompletas da matéria orgânica. No entanto, na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0 e lactato como doador de elétrons, foi também encontrada a espécie *Desulfacinum*, que desempenha um papel importante na oxidação completa da matéria orgânica.

**Palavras-chave:** Relação  $DQO/SO_4^{-2}$ . Etanol. Lactato. Soro de Leite. Riqueza Microbiana. Águas Residuárias Ricas em Sulfato.

# ABSTRACT

Biological sulfate reduction is widely used for treating sulfate-containing wastewaters. In this research, the biological reduction of sulfate was evaluated according to the chemical oxygen demand (*COD*)/sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) ratio and electron donors using batch reactors operated over 88 days. The reactors were fed with synthetic acidic wastewater at pH 4.0 and the electron donors were ethanol, sodium lactate and cheese whey analyzed individually on the  $COD/SO_4^{2-}$  ratio of 1 and 2. On the  $COD/SO_4^{2-}$  ratio of 1, the *COD* and sulfate removal raised high levels to all electron donors, above 68% for *COD* and 73% for sulfate. However, on the  $COD/SO_4^{2-}$  ratio of 2, only lactate resulted in high removals rates of *COD* and sulfate ( $71 \pm 17\%$  and  $90 \pm 6\%$ , respectively). MPN technique was used for sulfate-reducing bacteria (SRB) quantification and the results demonstrated that the SRB population increased  $10^2$  times in the presence of ethanol and  $10^3$  in the presence of lactate, on the  $COD/SO_4^{2-}$  ratio of 1.0. However, the SRB population decreased with the increase in the  $COD/SO_4^{2-}$  ratio for ethanol and lactate while cheese whey has not promoted the growth of SRB in any  $COD/SO_4^{2-}$  studied. The biomass was characterized using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). For the *Bacteria Domain* and SRB group, a high microbial richness and low similarity were obtained compared to the inoculum while in the *Archaea Domain* no major changes could be observed when compared to even inoculum or among the evaluated conditions. The phylogeny of the sulfate reducing group showed predominance of *Desulfovibrio* species for all substrates studied, whereas all species were found to conduct the incomplete oxidation of organic matter. However, on  $COD/SO_4^{2-}$  ratio of 1.0 and lactate, SRB species such as *Desulfacinum* were found, responsible to perform a key role in the complete oxidation of organic matter.

**Keywords:**  $COD/SO_4^{2-}$  ratio. Ethanol. Lactate. Cheese Whey. Microbial Richness. Sulfate Rich Wastewater.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo do Enxofre. . . . .	21
Figura 2 – Etapas da degradação da matéria orgânica. . . . .	22
Figura 3 – Detalhamento das etapas realizadas no trabalho. . . . .	31
Figura 4 – Reator anaeróbio em batelada. . . . .	32
Figura 5 – Esquema da diluição seriada utilizando água de diluição e inoculação em meio de cultura. . . . .	35
Figura 6 – Distribuição das espécies de sulfeto em função do pH. . . . .	46
Figura 7 – Porcentagens de sulfeto de hidrogênio e hidrogenossulfeto no efluente dos reatores. . . . .	47
Figura 8 – Porcentagens de remoção de ferro nos diferentes reatores estudados. Os números 1 e 2 ao lado dos doadores de elétrons indicam o valor da relação $DQO/SO_4^{2-}$ . . . . .	49
Figura 9 – Variação do pH afluente e efluente nos reatores, com incerteza de 5%. ( $\square$ ) Afluente, ( $\bullet$ ) $DQO/SO_4^{2-}$ :1 e ( $\triangle$ ) $DQO/SO_4^{2-}$ :2. . . . .	50
Figura 10 – NMP de BRS em 100 mL da cultura do inóculo e biomassa dos reatores nas diferentes condições. . . . .	52
Figura 11 – Imagem do gel de agarose 1, 5% . Amostras: I: Inóculo, E1: Etanol na relação DQO/Sulfato=1, E2: Etanol na relação DQO/Sulfato=2, L1: Lactato na relação DQO/Sulfato=1, L2: Lactato na DQO/Sulfato=2, S1: Soro de leite na relação DQO/Sulfato=1, S2: soro de leite na relação DQO/Sulfato=2, P: Padrão 100bp DNA Ladder. . . . .	54
Figura 12 – Dendrograma e imagem negativa do gel de DGGE com gradiente desnaturante 40-60% para o <i>Domínio Bactéria</i> . . . . .	55
Figura 13 – Imagem do gel de agarose 1, 5% . Amostras: I: Inóculo, E1: Etanol na relação DQO/Sulfato=1, E2: Etanol na relação DQO/Sulfato=2, L1: Lactato na relação DQO/Sulfato=1, L2: Lactato na DQO/Sulfato=2, S1: Soro de leite na relação DQO/Sulfato=1, S2: soro de leite na relação DQO/Sulfato=2, P: Padrão 100bp DNA Ladder. . . . .	56
Figura 14 – Dendrograma e imagem negativa do gel de DGGE com gradiente desnaturante 50-65% para <i>Domínio Archaea</i> . . . . .	57
Figura 15 – Imagem do gel de agarose 1, 5% . Amostras: I: Inóculo, E1: Etanol na relação DQO/Sulfato=1, E2: Etanol na relação DQO/Sulfato=2, L1: Lactato na relação DQO/Sulfato=1, L2: Lactato na DQO/Sulfato=2, S1: Soro de leite na relação DQO/Sulfato=1, S2: soro de leite na relação DQO/Sulfato=2, P: Padrão 100bp DNA Ladder. . . . .	58

Figura 16 – Dendrograma e imagem negativa do gel de DGGE com gradiente des-naturante 40-60%. . . . .	58
Figura 17 – Representação das bandas recortadas para sequenciamento. Amostras:, P: Padrão low mass ladder. . . . .	60
Figura 18 – Representação das bandas recortadas para sequenciamento. . . . .	61
Figura 19 – (a) Imagem do DGGE com todas as bandas e bandas sequenciadas indicadas. (b) Árvore filogenética pelo método de distância <i>Neighbor-joining</i> demonstra relação entre gene <i>dsrB</i> e as sequências referente ao GenBank. Nós representam valores de bootstrap para 1000 repetições. Barra de escala, 5 mutação por 100 nucleotídeos. . . . .	63

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das BRS em relação ao gênero e oxidação da matéria orgânica. . . . .	24
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens do etanol, lactato e soro de leite como substratos para BRS. . . . .	25
Tabela 3 – Composição da água residuária sintética. . . . .	33
Tabela 4 – Composição do meio de cultura Postgate C utilizado para a análise NMP (POSTGATE, 1984). . . . .	34
Tabela 5 – Composição da água de diluição. . . . .	35
Tabela 6 – <i>Primers</i> utilizados na análise de PCR. . . . .	37
Tabela 7 – Concentração final dos reagentes para o preparo do mix do grupo <i>BRS</i> . . . . .	37
Tabela 8 – Concentração final dos reagentes para o preparo do mix do domínio <i>Bactéria</i> . . . . .	37
Tabela 9 – Concentração final dos reagentes para o preparo do mix do domínio <i>Arqueia</i> . . . . .	38
Tabela 10 – Reagentes para preparo das soluções estoque de policriamida 7,5%. . . . .	39
Tabela 11 – Tabela com a relação entre o valor de qualidade (Q) e o nível de confiança de cada base. . . . .	40
Tabela 12 – Remoção de DQO, sulfato e ferro, produção de sulfeto e variação do pH durante a operação dos reatores em batelada. . . . .	42
Tabela 13 – Médias e desvio padrão do sulfeto total dissolvido (STD) e pH dos efluentes dos reatores, durante todo o período de operação. Os números 1 e 2 ao lado dos doadores de elétrons indicam o valor da relação $DQO/SO_4^{-2}$ . . . . .	46
Tabela 14 – Quantificação da população de BRS por meio da técnica de NMP. . . . .	52
Tabela 15 – Comparação das bandas sequenciadas utilizando o BLAST e a base de sequencias do NCBI. . . . .	60

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRS	Bactéria Redutora de Sulfato
DAM	Drenagem Ácida de Mina
DGGE	Eletroforese em Gel Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
NMP	Número Mais Provável
APS	Enzima adenosina-fosfossulfato
<i>dsrB</i>	Gene sulfito redutase dissimilatória da subunidade B
<i>dsrAB</i>	Gene sulfito redutase dissimilatória da subunidade A e B
DNAr 16S	Ácido Desoxirribonucleico da porção 16S ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleico da porção 16S ribossomal
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
RNAr16S	Ácido Ribonucleico da porção 16S ribossomal
$SO_4^{2-}$	Sulfato
$S^{-2}$	Sulfeto
MeS	Sulfeto metálico
TDH	Tempo de detenção hidráulica
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i> (Taq DNA Polimerase)
TAE	(Tris/Acetato/EDTA)- Tampão de Eletroforese
TEB	(Tris/Borate/EDTA)- Tampão de Eletroforese
TEMED	Tetramethylethylenediamine

UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo
UV	Ultravioleta
V	Volts

# LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama, gramas
mg/L	miligrama por litro
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mM	milimolar
m/v	massa por volume
ng	nanograma, nonogramas
ng/ $\mu$ L	nanograma por microlitro
$^{\circ}C$	Graus Celsius
pb	Pares de base
U	Unidades
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
rpm	Rotações por minuto

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivo específicos	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
3.1	Ciclo biológico do enxofre	20
3.2	Tratamento biológico de águas residuárias ricas em sulfato	21
3.2.1	Bactérias Redutoras de Sulfato - BRS	22
3.2.2	Doadores de elétrons	25
3.3	Ecologia Microbiana	27
3.3.1	Reação de polimerase em cadeia - PCR	28
3.3.2	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - DGGE	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1	Fluxograma Experimental	31
4.2	Reator em batelada alimentada e inóculo	32
4.3	Composição da água residuária sintética	32
4.4	Análises físico-químicas	33
4.5	Análise microbiológicas	34
4.5.1	Avaliação da população de BRS	34
4.6	Riqueza Microbiana	36
4.6.1	Extração e Purificação de DNA	36
4.6.2	Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	36
4.6.3	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - DGGE	38
4.6.4	Sequenciamento do gene <i>dsrB</i>	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
5.1	Operação dos reatores	42
5.1.1	Remoção de sulfato e DQO	42
5.1.2	Produção de Sulfeto	45
5.1.3	Remoção de Ferro	48
5.1.4	pH	50
5.2	Análises microbiológicas	51
5.2.1	Quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	51

<b>5.3</b>	<b>Determinação da riqueza microbiana por meio da técnica PCR/DGGE</b>	<b>53</b>
	.....	
5.3.1	<i>Domínio Bactéria</i> .....	54
5.3.2	<i>Domínio Arqueia</i> .....	56
5.3.3	Grupo das redutoras de sulfato .....	57
<b>5.4</b>	<b>Sequenciamento e identificação do gene <i>dsrB</i></b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES</b> .....	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>71</b>
	<b>ANEXO A – PROTOCOLO EXTRAÇÃO - KIT PROMEGA <i>PURIFICATION</i></b> .....	<b>72</b>
	<b>ANEXO B – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO - KIT PROMEGA <i>DNA CLEAN UP</i></b> .....	<b>74</b>
	<b>ANEXO C – PROCEDIMENTO PARA PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA- DGGE</b> .....	<b>75</b>
	<b>ANEXO D – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO - PCR CLEAN UP SYSTEM</b> .....	<b>77</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A contaminação dos corpos hídricos por sulfato pode se dar de maneira natural ou por meio de emissões antropogênicas. De forma natural, a contaminação pode ocorrer pela oxidação de mineral sulfetado de drenagem ácida de minas e também por dissolução de mineral sulfato. As emissões antropogênicas são geradas e descartadas por efluentes domésticos e efluentes industriais. A concentração de sulfato de efluentes domésticos é pequena. Porém, efluentes industriais podem gerar altas concentrações de sulfato, são exemplos, indústrias de papel e celulose, nas quais compostos de enxofre são utilizados como agentes branqueadores e seus efluentes podem apresentar concentrações de 50 a 3000 mg  $SO_4^{2-}/L$ . Outros exemplos são a vinhaça gerada na produção de álcool, que pode conter concentrações entre 500 a 3000 mg  $SO_4^{2-}/L$ , e as indústrias químicas e petroquímicas, que geram efluentes ricos em sulfato de acordo com o processo produtivo e podem ser responsáveis pela produção de efluentes com até 50 g  $SO_4^{2-}/L$  (HAO et al., 2014).

A presença de sulfato em águas residuárias com elevadas concentrações pode causar sérios danos ao meio ambiente. Na falta de oxigênio e nitrato, o sulfato atua como aceptor de elétrons e sendo convertido em sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). O sulfeto de hidrogênio produz odor, corrosão e é altamente tóxico ao seres humano, e também altera o ciclo natural do enxofre (LENS et al., 1998). Portanto, efluentes ricos em sulfato requerem tratamento antes de ser lançado ao meio ambiente, muitos países já estabeleceram limites de sulfato que variam entre 250 e 500 mg  $SO_4^{2-}/L$  para drenagem ácida de minas e efluentes industriais (BATTERHAM, 2003). No Brasil, de acordo com CONAMA nº 357/05, a quantidade de sulfato estabelecida pela lei para água doce - classe 1, é de 250 mg  $SO_4^{2-}/L$ .

O tratamento biológico utilizando Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) é considerado uma das alternativas mais promissoras no tratamento de vários tipos de águas residuárias complexas ricas em sulfato, em função de sua eficácia e economicidade. As BRS são microrganismos anaeróbios que utilizam sulfato como aceptor de elétrons para degradação da matéria orgânica, tendo como produto a geração de alcalinidade (na forma de bicarbonato) e sulfeto. A alcalinidade aumenta o pH do efluente e o sulfeto pode precipitar metais gerando sulfetos metálicos, que em função de suas baixas solubilidades podem ser recuperado (ZHANG; WANG; HAN, 2016). Para promover a remoção de sulfato via BRS é necessária uma fonte de carbono e de elétrons (MUYZER; STAMS, 2008; ZHOU et al., 2014). Algumas águas residuárias são deficientes em doadores de elétrons, neste caso a adição externa de doadores de elétrons é necessário para que ocorra o tratamento.

Doadores de elétrons utilizados por BRS são usualmente de baixo peso molecular compostos como lactato, etanol e hidrogênio. Uma alternativa é a utilização do soro de

leite como doador de elétrons, este substrato é proveniente das indústrias lácteas que transformam o leite cru em produtos como iogurte, sorvete, manteiga, queijo e vários tipos de sobremesas por diferentes processos. O volume gerado e as características do efluentes lácteos é bastante variável dependendo dos diferentes tipos de indústria, técnicas, processos e equipamentos. Porém, os efluentes lácteos apresentam carga de matéria orgânica e nutrientes que são características importantes para serem utilizados como substrato.

A razão da demanda química de oxigênio por sulfato ( $DQO/SO_4^{-2}$ ) é um importante parâmetro que afeta a competição entre BRS e outros microrganismos anaeróbios levando ao consumo da matéria orgânica. Na estequiometria, a razão  $DQO/SO_4^{-2}$  de 0,67 preconiza que a quantidade de receptor de elétrons (sulfato) é suficiente para que ocorra a oxidação completa da matéria orgânica exclusivamente pela rota bioquímica de redução de sulfato. Porém, outros fatores podem influenciar em riquezas microbiana distintas, o que pode afetar a performance dos reatores, como pH, tempo de detenção hidráulica (TDH), carga aplicada de sulfato e matéria orgânica (KAKSONEN et al., 2004; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; POL et al., 1998).

O presente estudo avaliou a riqueza microbiana e a população de bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios operados em batelada para as relações  $DQO/SO_4^{-2}$  (1,0 e 2,0) e na presença de três doadores de elétrons (etanol, lactato e soro de leite). Para caracterizar a biomassa proveniente de cada reator utilizou-se a técnica PCR/DGGE e o sequenciamento de bandas do gene dissimilatório da sulfito redutase subunidade B (*dsrB*).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi avaliar a performance e a riqueza microbiana de reatores em bateladas utilizados no tratamento de águas ácidas residuárias ricas em sulfato em relação aos parâmetros fonte de carbono e relação  $DQO/SO_4^{-2}$ .

### 2.2 Objetivo específicos

- Determinar a eficiência da remoção de DQO e sulfato dos reatores nas relações  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1 e 2, utilizando separadamente as fontes de carbono: etanol, lactato e soro de leite;
- Comparar o crescimento microbiano de BRS após a operação dos reatores por meio da técnica de Número Mais Provável (NMP) em função da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  e da fonte de carbono;
- Comparar o perfil da microbiota dos microrganismos dos domínios *Bactéria* e *Archeia* e do grupo de Bactérias Redutoras de Sulfato nos reatores por meio da técnica de biologia molecular PCR/DGGE;
- Identificar os principais grupos de BRS baseado no sequenciamento do gene dissimilatório da sulfito redutase *dsrB*.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Ciclo biológico do enxofre

O ciclo do enxofre tem como característica a sua versatilidade, sendo proveniente dos múltiplos estados de oxidação e redução deste elemento, resultado das inúmeras conversões que podem envolver a presença de microrganismos. Os compostos de enxofre são abundantes no meio ambiente e são necessários para à vida na Terra, sendo alguns compostos de grande importância biológica. No meio ambiente, os compostos de enxofre estão presentes principalmente na forma de enxofre reduzido ( $S^{-2}$ ) sendo nutriente chave para manutenção da vida (integridade estrutural de proteínas), enxofre oxidado ( $SO_4^{2-}$ ) como o segundo ânion mais abundante nos rios e oceanos e na forma de sulfeto metálicos ( $MeS$ ) em solos, sedimentos e minerais.

As principais formas de utilização dos compostos de enxofre estão associadas à processos industriais e a agricultura. Com o aumento das atividades antropogênicas, o ciclo do enxofre tem sofrido várias interferências tendo como efeito a poluição, entre elas, a chuva ácida, geração de sulfetos que são altamente tóxicos e liberação de metais pesados presentes na atividade de mineração.

As reações de oxidação e redução do ciclo do enxofre, podem ser realizadas tanto quimicamente quanto biologicamente, e modificam o estado de de oxidação do enxofre desde  $(-2)$  no caso de sulfetos ( $S^{-2}$ ) até  $(+6)$  no caso de sulfatos ( $SO_4^{-2}$ ). Dentro do ciclo do enxofre, ocorre uma importante etapa de redução de sulfato, conhecida como redução dissimilativa do sulfato, onde ocorre a redução do sulfato a sulfeto em condições anaeróbias, realizada principalmente por Bactéria Redutoras de Sulfato (BRS). O ciclo fecha com a oxidação do sulfeto a enxofre elementar, entre outros intermediários de reação ou ainda a sulfato, conforme Figura 1 (CAMILOTI et al., 2013). A redução dissimilatória do sulfato é importante para o tratamento biológico de águas residuárias ricas em sulfato e em sistemas anaeróbios de tratamento de esgoto sanitários.

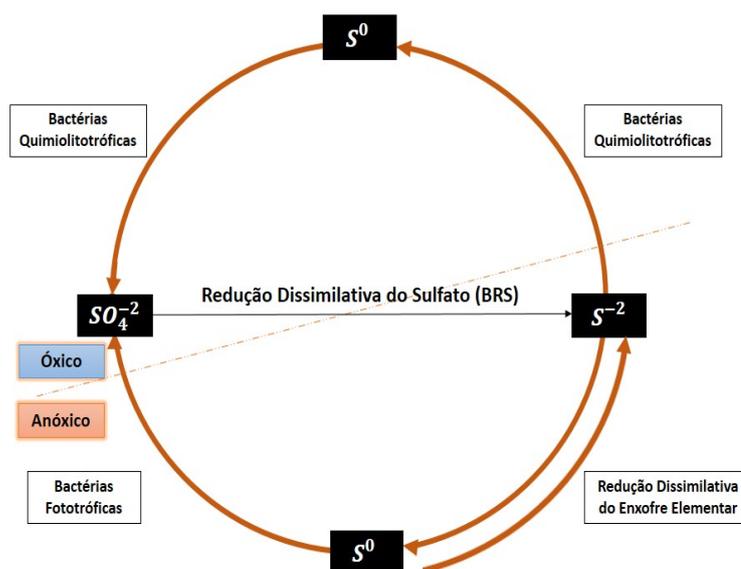


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo do Enxofre.

Fonte: Adaptado de (LENS; KUENEN, 2001).

## 3.2 Tratamento biológico de águas residuárias ricas em sulfato

Dentre as propostas utilizadas no tratamento de efluentes contendo sulfato, destacam-se as alternativas biotecnológicas utilizando as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS). A rota metabólica utilizada é a sulfetogênese, cujo produto final é o  $H_2S$  e o  $CO_2$ , conforme Figura 2 .

No processo sulfetogênico, as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) utilizam o sulfato como receptor de elétrons, desviando a rota metabólica da produção do metano para produção de sulfeto, assim impondo a coexistência de arqueias metanogênicas e a competição pelos mesmos substratos, em especial o acetato e hidrogênio.

Sendo um processo biológico, na maioria das vezes a riqueza microbiana é influenciada pelas condições operacionais utilizadas, como a natureza do substrato, a relação ( $DQO/SO_4^{-2}$ ), a carga de sulfato aplicada, o tempo de detenção hidráulica (TDH), dentre outras. O tratamento de águas residuárias ricas em sulfato tem sido estudado em algumas configurações de biorreatores, entre eles, os reatores em batelada (NECULITA; ZAGURY, 2008), leito fluidizado (SAHINKAYA et al., 2011), leito fixo (MOCKAITIS et al., 2014) e UASB (uplow anaerobic sludge blanket) (RODRIGUEZ et al., 2012), assim como em relação ao substrato e à relação  $DQO/SO_4^{-2}$  (ZHOU et al., 2014; CAMILOTI et al., 2013; ZHANG; WANG; HAN, 2016).

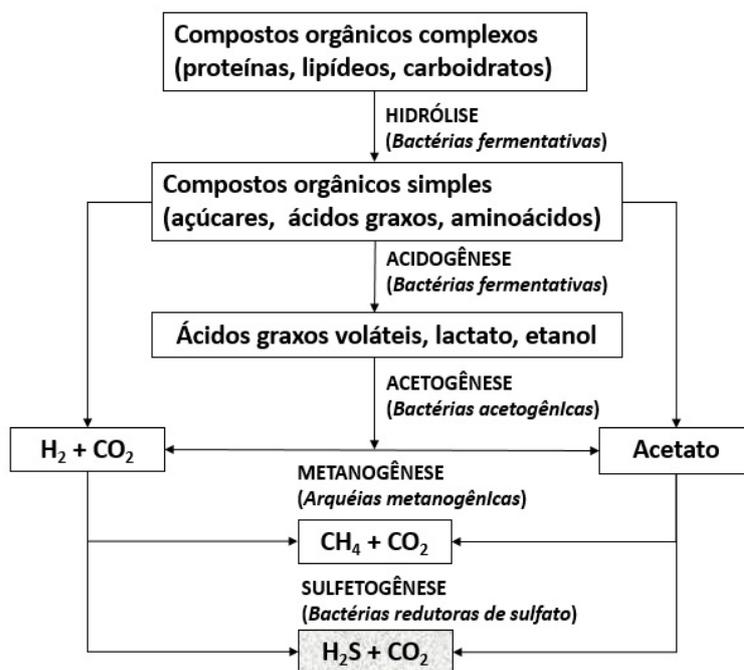


Figura 2 – Etapas da degradação da matéria orgânica.

Fonte: Adaptado de (MUYZER; STAMS, 2008).

A predominância do gênero *Desulfovibrio* foi observada em estudos para a identificação dos microrganismos presentes no tratamento de águas residuárias ricas em sulfato utilizando como doadores de elétrons resíduos de indústria de vinho, soro de leite, lactato e etanol (MARTINS et al., 2009; KAKSONEN et al., 2004).

De modo geral, os trabalhos envolvendo a atividade de BRS têm sido realizados de forma a entender os fundamentos do processo e aperfeiçoar, por meio dos estudos de diferentes parâmetros, o conhecimento das principais comunidades microbianas, objetivando sempre a maior remoção de sulfato, maior consumo de compostos orgânicos e a viabilidade econômica.

### 3.2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato - BRS

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) pertencem ao grupo de procariontes que contribuem para uma variedade de funções essenciais em muitos ambientes anaeróbios. Além da grande importância para o ciclo do enxofre, as BRS exercem funções importantes em uma variedade de processos nos solos das zonas úmidas, incluindo ciclagem de matéria orgânica, a biodegradação de poluentes clorados aromáticos em solos anaeróbios e sedimentos, a remoção de sulfato e a metilação de mercúrio. Devido a sua importância para o funcionamento do ecossistema e remediação ambiental, o interesse neste grupo microbiano tem aumentado nos últimos anos (ATKINSON; SHERWOOD, 1995; CASTRO;

WILLIAMS; OGRAM, 2000).

Com o desenvolvimento da análise filogenética utilizando a sequência dos genes *dsrAB* que codificam enzimas importantes na respiração dissimilatória do sulfato e estão presentes em todas as BRS, novas espécies têm sido descobertas e foram divididas em quatro grupos distintos: (1) BRS mesófilas Gram negativas não formadoras de esporos, (2) BRS Gram positivas formadoras de esporos, (3) BRS termofílicas e (4) RS Arqueia. A predominância das bactérias redutoras de sulfato nos últimos anos pertence ao grupo das BRS Gram negativas mesófilas não formadoras de esporos, nesse grupo duas famílias são incluídas: Desulfovibrionaceae e Desulfobacteriaceae. Ambas pertencentes a classe Delta-Proteobacteria. A família Desulfovibrionaceae inclui o gênero *Desulfovibrio*, que é comum de ser encontrado em tratamento de efluentes ricos em sulfato. A característica comum dessa família é a oxidação incompleta dos compostos orgânicos, sendo o principal gênero, *Desulfotomaculum*. A morfologia das bactérias desse gênero incluem formas de bastonetes para as células livres e formato de cocos para os seus esporos. Em relação a temperatura, as BRS na sua maioria são mesófilas, mas grupos psicrofílicos e termófilos têm sido encontrados (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).

A importância das BRS no tratamento de águas residuárias está associada ao seu metabolismo, que também pode ser dividido em dois grupos. O primeiro grupo é caracterizado pela oxidação incompleta do composto orgânico até acetato e o segundo, realiza a mineralização completa da matéria orgânica até  $CO_2$ . A oxidação incompleta da matéria orgânica ocorre devido a ausência de um mecanismo para oxidação do acetil-CoA, sendo as principais espécies representadas na Tabela 1.

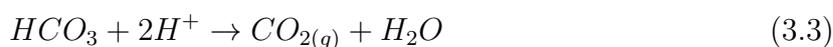
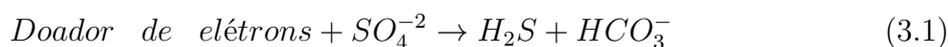
O processo metabólico da redução do sulfato engloba inúmeras enzimas oxirredutoras. Inicia-se com a oxidação do doador de elétrons liberando elétrons e prótons. Os compostos são enviados para uma hidrogenase citoplasmática para geração de  $H_2$ . O hidrogênio molecular formado se difunde pelo periplasma onde é reoxidado liberando elétrons que são enviados pelo citocromo e em seguida, enviados pela cadeia transportadora de elétrons ao receptor de elétrons. No periplasma são formados íons  $H^+$ , que são responsáveis pela produção de energia (ATP) e na ativação de enzimas que atuam na redução de sulfato intracelular.

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que as bactérias redutoras de sulfato (BRS) tem grande aplicabilidade em processos de biorremediação, como exemplo, efluentes de mineração e áreas poluídas por efluentes industriais. A biorremediação utilizando BRS é baseada na produção biológica de sulfeto de hidrogênio (Equação 3.1), na precipitação dos metais pela formação de sulfetos metálicos (*MeS*) (Equação 3.2) e na neutralização da água decorrente ao íons bicarbonato liberados como produto da reação (Equação 3.3).

Tabela 1 – Classificação das BRS em relação ao gênero e oxidação da matéria orgânica.

Grupo BRS	Gênero	Oxidação da matéria orgânica
<b>Gram-negativa</b>		
Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	incompleta
	<i>Desulfomicrobium</i>	incompleta
	<i>Desulfomonas</i>	incompleta
	<i>Desulfohalobium</i>	incompleta
Desulfobacteriacea	<i>Desulfobulbus</i>	incompleta
	<i>Desulfobacter</i>	completa
	<i>Desulfobacterium</i>	completa
	<i>Desulfococcus</i>	completa
	<i>Desulfosarcina</i>	completa
	<i>Desulfomonile</i>	completa
	<i>Desulfonema</i>	completa
	<i>Desulfobotulus</i>	incompleta
	<i>Desulfobacula</i>	completa
	<i>Desulfospira</i>	completa
	<i>Desulfocella</i>	completa
	<i>Desulfoacinum</i>	completa
	<i>Desulfocapsa</i>	incompleta
	<i>Desulfohorpalus</i>	incompleta
	<i>Desulfofutis</i>	incompleta
	<i>Desulfotalea</i>	incompleta
<i>Desulfofrigus</i>	completa	
<i>Desulfofaba</i>	incompleta	
<i>Desulfomusa</i>	incompleta	
BRS termófila	<i>Termodesulfovibrio</i>	incompleta
<b>Gram-positiva</b>	<i>Desulfotomaculum</i>	indefinida
	<i>Desulfosporosinus</i>	incompleta
<b>Archaea</b>	<i>Archaeoglobus</i>	completa

Fonte: Adaptado de (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000).



Entretanto, o pH ótimo para o crescimento de muitas BRS é entre pH 5-9, ou seja, o crescimento desses microrganismos é desfavorecido em condições ácidas. Contudo, algumas BRS têm sido isoladas de regiões que apresentam pH 3,0, tanto em ambientes naturais quanto em biorreatores (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

### 3.2.2 Doadores de elétrons

Os doadores de elétrons são essenciais para o tratamento biológico de águas residuárias ricas em sulfato, pois fornecem a energia necessária para o crescimento das BRS. Algumas águas residuárias ricas em sulfato, por exemplo, drenagem ácida de minas, são deficientes em doadores de elétrons e uma adição externa é necessária neste caso.

A deficiência de demanda química de oxigênio (DQO) ou de doador de elétrons resulta em redução incompleta do sulfato (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Em termos estequiométricos, para a conversão de 1 mol de sulfato são necessários 0,67 de demanda química de oxigênio.

Na ausência de sulfato como receptor de elétrons, algumas espécies de BRS podem fermentar substratos como piruvato, formato ou lactato. Os doadores de elétrons utilizados para redução do sulfato variam de acordo com os gêneros das BRS. Estes doadores consistem em ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato, lactato), açúcares (piruvato, malato), álcoois (metanol, etanol, propanol) e  $H_2$ . Vários tipos de substâncias orgânicas têm sido empregadas como doadores de elétrons e fonte de carbono, incluindo esterco animal, produtos agrícolas, resíduo da indústria de vinho, soro de leite, dentre outros, constituindo-se uma alternativa promissora por se tratarem de compostos orgânicos considerados de baixo custo. Entretanto, para serem plenamente aproveitados pelas BRS, outros microrganismos que degradam esses substratos em substratos para BRS deverão estar presentes (CHOUDHARY; SHEORAN, 2011; COSTA et al., 2009).

Entre os doadores de elétrons que podem ser utilizados nos processos de remoção biológica de sulfato, selecionaram-se etanol, lactato e soro de leite como objetos de estudo deste trabalho, cujas vantagens e desvantagens estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens do etanol, lactato e soro de leite como substratos para BRS.

Doadores de elétrons	Vantagem	Desvantagem
Etanol	Relativamente barato Facilmente convertido por BRS	Baixo crescimento de BRS Oxidação incompleta a acetato (elevada DQO efluente)
Lactato	Convertido por várias espécies de BRS Geração de alcalinidade Menos suscetível a toxicidade de sulfeto Fonte de carbono preferencial	Custo alto
Soro de Leite	Fonte de carbono de baixo custo Nenhum impacto negativo para as BRS	Necessita de bactérias fermentativas Pode causar alta DQO efluente

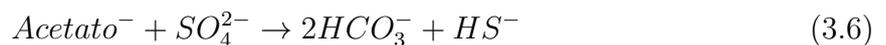
Fonte: Adaptado de (HAO et al., 2014).

O etanol é um doador de elétrons e fonte de carbono comumente utilizado na redução de sulfato, em função de ser uma fonte de carbono relativamente barata e facilmente degradada por BRS. A oxidação do etanol pelas BRS pode se dar por via completa ou

incompleta. Algumas culturas de BRS responsáveis pela oxidação completa do etanol foram relatadas, como as espécies *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfobacter postgatei*.

Contudo, outros microrganismos degradam o etanol, como bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas. Uma desvantagem do etanol é o baixo crescimento de BRS que são inibidas pelo sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) não dissociado, tornando-se tóxico ao consórcio microbiano. Na oxidação incompleta, o produto da reação é o acetato que resulta no aumento da DQO efluente, problema este que pode ser resolvido pela utilização do acetato por arqueias metanogênicas e BRS (NAGPAL et al., 2000; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007).

As BRS tem preferência pelo uso de lactato como doador de elétrons, por fornecer energia e rendimento de biomassa superior a muitos outros, tal como etanol,  $H_2$ , propionato e acetato (NAGPAL et al., 2000). O lactato é utilizado como substrato para o cultivo e enriquecimento de BRS, e também como substrato de partida dos reatores, a fim de acelerar o início do processo. Dentre as vantagens do lactato, destacam-se a produção de 3 mol de bicarbonato (alcalinidade) por mol de substrato (Eq. 3.4 e Eq. 3.6) na completa oxidação via BRS, enquanto que, por exemplo, a oxidação completa do etanol produz somente 2 mol (Eq. 3.5 Eq. e 3.6). Além disso, a oxidação do lactato via BRS produz alcalinidade mesmo que a oxidação seja incompleta, ao passo que é necessária a oxidação completa do etanol para geração de alcalinidade. Em relação às vantagens, os processos que utilizam lactato podem ser superiores àqueles com etanol no tratamento de efluentes ácidos, uma vez que seriam mais eficientes na neutralização da acidez deste tipo de água residuária. Porém, o lactato é um substrato relativamente caro para utilização no tratamento de águas residuais em larga escala (KAKSONEN et al., 2004).



O soro de leite é um subproduto da fabricação de queijo e possui alto teor de matéria orgânica. É considerado o poluente mais grave na indústria de produtos lácteos, não só pela elevada carga orgânica, mas também pelo volume gerado. Enquanto o soro de leite pode ter outras utilizações, muitas indústrias de laticínios não têm conhecimento técnico e nem incentivo econômico para realizá-lo, tornando o tratamento deste efluente inviável e descartando-o como resíduo. O parâmetro demanda química de oxigênio do soro de leite encontram-se entre valores de  $50 - 102gDQO/L$ . Também, altos níveis de nutrientes são encontrados nesse substrato, incluindo nitrogênio ( $0,5 - 10,8mg/L$ ) e fósforo

(6 – 280mg/L), compostos que se lançados aos corpos d'água sem tratamento, tornam-se nocivos ao meio ambiente e resultam no aparecimento de fenômenos como a eutrofização (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; MOCKAITIS et al., 2006).

O uso de soro de leite como substrato pelas BRS não tem sido relatado na literatura, porém, este efluente possui características que podem torná-lo uma alternativa promissora por utilizar resíduo industrial, com alta carga de matéria orgânica e presença de nutrientes. Para o tratamento de DAM utilizando soro de leite como fonte de carbono para BRS, foram observadas remoções de 84,7% e 74% de DQO e sulfato, respectivamente (SAMPAIO, 2015). Taxas de remoções de 68,1% para DQO e 55,4% para sulfato foram observadas por (JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

### 3.3 Ecologia Microbiana

Em todo o mundo, inclusive no Brasil, as preocupações com a conservação do meio ambiente incentivaram estudos moleculares sobre a ecologia microbiana de ecossistemas contaminados por produtos de origem antropogênica. Neste sentido, estudos da microbiológicos também são de grande importância para se conhecer as comunidades microbianas presentes em águas residuárias ricas em sulfato.

Os métodos moleculares são importantes ferramentas para estudar a riqueza microbiana em amostras ambientais a partir da análise de fragmentos específicos de DNA. Com a evolução da biotecnologia surgiram novas técnicas, baseadas na sequência do gene do RNA ribossomal 16S (RNAr 16S) ou de genes cromossômicos que os codificam, como DNAr 16S. Tais sequências tem como características importantes:

- Estão presentes em todos os organismos, pois são essenciais para a síntese de proteínas;
- São conservadas estrutural e funcionalmente;
- Apresentam tanto regiões conservadas como variáveis e altamente variáveis, nas estruturas primária e secundárias;
- Apresentam aparente ausência de transferência gênica horizontal;
- Têm tamanho satisfatório, com cerca de 1500 nucleotídeos, suficientes para fazer inferências filogenéticas.

Nas últimas décadas, estudos reportaram falhas na análise filogenética das BRS baseada exclusivamente no RNAr 16S. Isso deve-se ao grupo diverso em relação ao metabolismo e polifilia, que não apresenta um único oligonucleotídeo iniciador que possa detectar todas as BRS. Também, a análise do RNAr 16S não apresenta informações sobre a

capacidade metabólica das BRS, importante no estudo da biorremediação. Uma alternativa encontrada foi o uso de enzimas responsáveis na respiração dissimilatória do sulfato que estão presentes em todas as BRS, como exemplo, as enzimas hidrogenases, adeninafosfo sulfato redutase (APS) e sulfito redutase (FAORO, 2006; RAMPINELLI et al., 2008). No presente estudo, utilizou-se a enzima sulfito redutase que codifica as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (*dsrAB*) da região 1.9-Kb do DNA.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para analisar a estrutura da comunidade microbiana. Atualmente, a utilização de métodos moleculares independentes de cultivo têm sido fundamentais para o entendimento da degradação de inúmeros compostos por microrganismos, facilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias de biorremediação de águas residuais. Por exemplo, a combinação das técnicas de PCR-DGGE-sequenciamento é uma das alternativas para avaliar a filogenia das espécies de BRS presentes no tratamento de águas residuárias ricas em sulfato. Estas técnicas oferecem um caminho rápido, independente do meio de cultivo dos microrganismos e possibilitam a identificação da riqueza microbiana presente no tratamento (MUYZER; STAMS, 2008).

### 3.3.1 Reação de polimerase em cadeia - PCR

A PCR é um método de biologia molecular introduzido por Saiki e colaboradores em 1985, com a finalidade de produzir uma quantidade apresentável de um segmento específico de DNA, a partir do DNA molde extraído de uma amostra. O método utiliza uma enzima termoestável com atividade polimerase, isto é, que tem capacidade de polimerização de ácidos nucleicos através de seus monômeros (SAIKI et al., 1985). Esta técnica pode ser utilizada para detectar patógenos e doenças genéticas, para determinar a fonte de um cabelo em cena de crime ou, ainda, recuperar genes fósseis (VICH, 2006). A importância nos estudos microbiológicos está no fato dessa técnica permitir a amplificação de genes específicos em amostras de grande diversidade microbológica.

A reação de PCR é baseada em três etapas ou ciclos, cada ciclo contém um ou mais passos e duas variáveis em cada passo: temperatura e duração. A etapa inicial é a desnaturação (94°C - 100°C, 4 - 10 min), que consiste de um único passo, no qual seu objetivo é separar a dupla fita de DNA, através do calor. A segunda etapa é o anelamento (40°C - 70°C, 30 s - 2 min), este é o passo que habilita um par de iniciadores ou *primers* (uma fita de DNA específica para o gene que se quer estudar) a complementar a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada, ou seja, um deles é complementar à sequência em uma fita da dupla hélice de DNA e o outro à sequência na outra fita. O molde é determinado pela posição dos iniciadores que se anelam a fita e a temperatura varia conforme os *primers* utilizados. Na terceira etapa, extensão (94°C), ocorre a adição de bases complementares ao molde já identificado pela enzima DNA-polimerase, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de DNA. Assim, ocorrem

duplicações em escala exponencial do DNA após 30-40 ciclos em apenas algumas horas, resultando em  $2^n$  cópias da sequência original.

O sucesso da PCR está na capacidade de amplificar uma sequência precisa de DNA com simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade, uma vez que a especificidade é dada pelos *primers*. Assim, não é necessário isolar o DNA que será amplificado, mesmo que se encontre em grande diversidade de DNA. Porém, tem limitações, como a necessidade de se conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados *primers* específicos, facilidade de contaminação, limitação da extensão da sequência maiores que 5kb, e incorporação errônea de bases durante a replicação (BELI, 2015).

### 3.3.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - DGGE

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi introduzida na ecologia microbiana por Muyzer em 1993 e a partir de então muitos estudos têm sido realizados a fim de se conhecer comunidades microbianas responsáveis pela biorremediação.

O método DGGE permite analisar produtos de PCR de fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com diferentes sequências de pares de bases. Isto possibilita a avaliação da diversidade genética das comunidades microbiana e também a identificação filogenética por meio do sequenciamento (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

O DGGE se baseia na mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA em um gel de poliacrilamida que contém gradiente linear desnaturante (ureia e formamida). Quando sequências contendo os mesmos pares de bases atingem a desnaturação a uma determinada posição no gel, a migração praticamente cessa. As sequências de pares de bases diferentes, portanto, irão parar de migrar em diferentes posições devido à variação de gradiente de desnaturação. As cadeias de DNA se separam em gradiente específico, dependendo das pontes de hidrogênio formadas entre as duas fitas, por exemplo, ligações citosina (C) e guanina (G) possuem três pontes de hidrogênio, enquanto que timina (T) e adenina (A) possuem duas pontes de hidrogênio. Nesse caso, quanto maior a porcentagem de pareamentos GC, maior será a resistência à desnaturação, conseqüentemente, mais abaixo em um gel de DGGE esta banda aparecerá (BELI, 2015; NISHIO, 2010).

O DGGE é uma técnica de impressão digital (*fingerprinting*) rápida, metodologia simples, taxa e sensibilidade elevadas e possibilita a análise simultânea de amostras múltiplas, permitindo o estudo das mudanças da comunidade no tempo e por mudanças ambientais. Também permite a identificação dos membros da comunidade a partir da recuperação e sequenciamento dos produtos amplificados. Técnicas de clonagem, ao contrário, não permitem a análise simultânea de muitas amostras diferentes e são técnicas demoradas, de metodologia mais complexa e mais caras. Porém, o DGGE apresenta limitações, uma das maiores é que somente fragmentos de até 500 bp podem ser separados no gel de

acrilamida, o que limita a inferência filogenética no posterior sequenciamento, requer a compra de equipamento específico, o uso de *primers* que são caros e o método envolve, ainda, produtos químicos tóxicos (formamida e acrilamida) (BELI, 2015; MUYZER, 1999; YU; MORRISON, 2004).

Entretanto, a técnica apresenta potencial para avaliar a riqueza microbiana presente no tratamento de águas residuais ricas em sulfato. A predominância da comunidade microbiana pode ajudar a entender o processo que está ocorrendo no biorreator e as melhores condições de operação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma Experimental

A Figura 3 apresenta o fluxograma com as etapas da metodologia, descritas nesta seção.

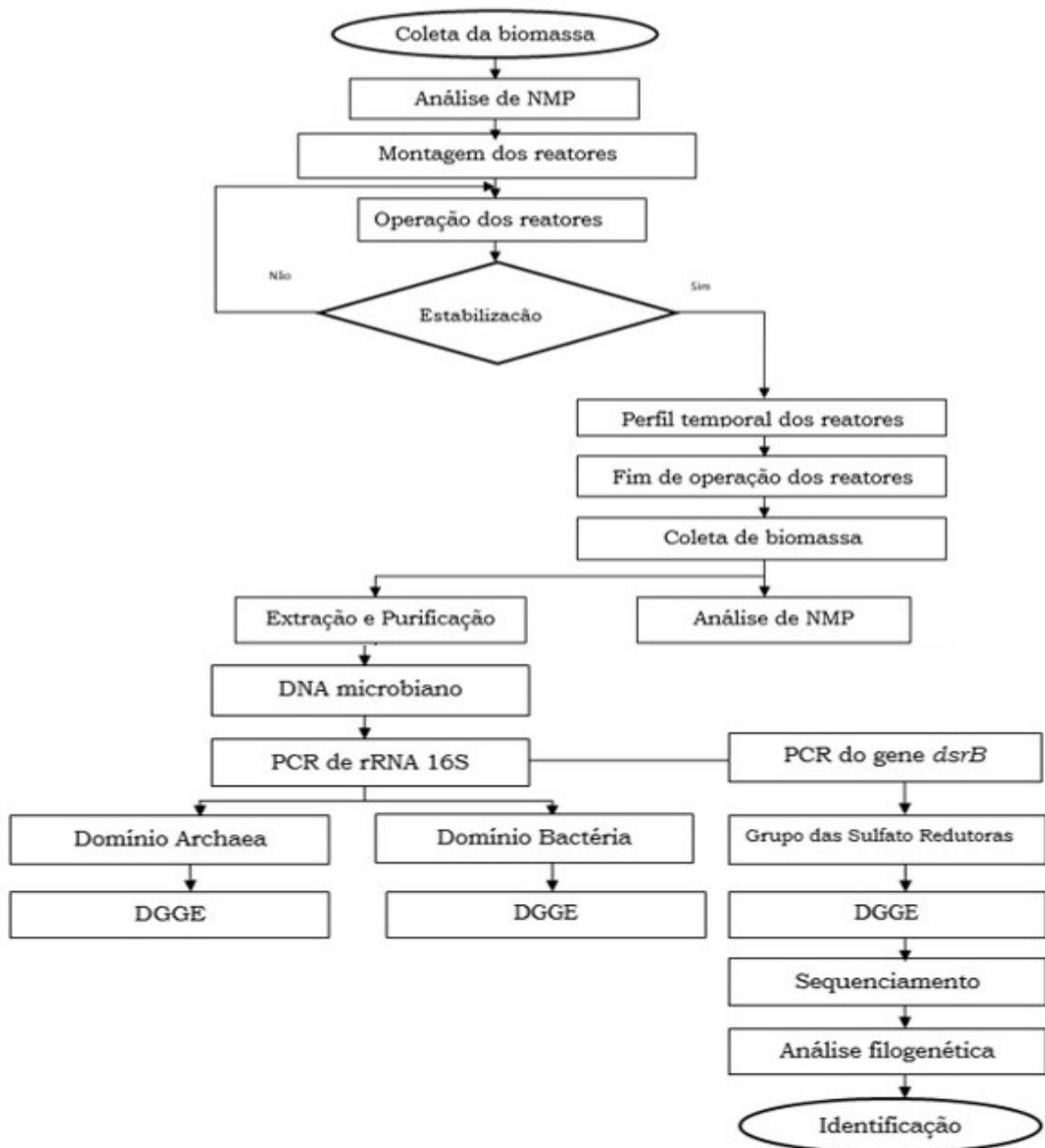


Figura 3 – Detalhamento das etapas realizadas no trabalho.

Fonte: Da autora.

## 4.2 Reator em batelada alimentada e inóculo

Foram montados seis reatores em batelada alimentada em frascos de vidro borossilicato, com volume total de 1,0 L. A cada reator foi adicionado 50 mL de lodo granular e 700 mL de água residuária sintética, Figura 4. O lodo granular utilizado como inóculo foi obtido de um reator em batelada sequencial operado em escala laboratorial para o estudo da biorremediação de drenagem ácida de minas, durante 200 dias, com etanol como fonte exclusiva de carbono e energia.

Durante 88 dias, os reatores foram operados e mantidos em condições mesofílicas de 30°C, agitação de 100 rpm com auxílio de shaker orbital e tempo de ciclo de 48 h. Os reatores foram alimentados e drenados três vezes na semana (segunda, quarta e sexta-feira).

A configuração experimental incluiu um reator para cada sistema proposto. Os doadores de elétrons etanol, lactato de sódio e soro de leite foram utilizados separadamente nas relações  $DQO/SO_4^{2-}$  de 1,0 e 2,0 para cada substrato. A concentração de sulfato no início de cada ciclo foi mantido a  $1500\text{ mgL}^{-1}$  e DQO  $1500\text{ mgL}^{-1}$  para relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1,0 e  $3000\text{ mgL}^{-1}$  para relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 2,0. O pH inicial de cada ciclo foi ajustado a 4,0 com HCl 4M.

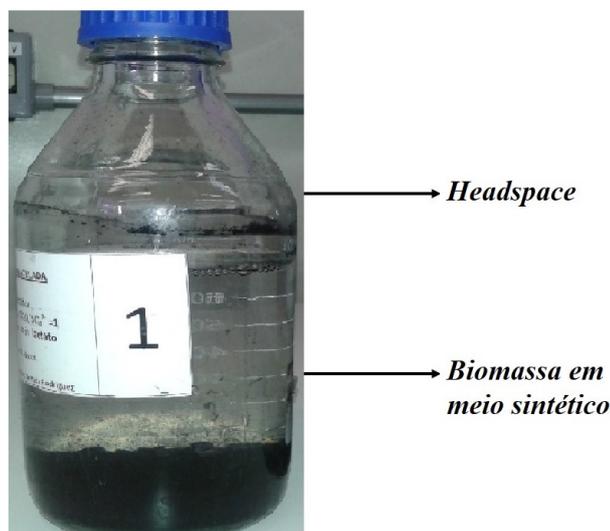


Figura 4 – Reator anaeróbico em batelada.

Fonte: Da autora.

## 4.3 Composição da água residuária sintética

A composição foi adaptada de forma a simular água residuária sintética ácida rica em sulfato com presença de metais, conforme a Tabela 3. A concentração inicial dos metais foi ( $mg/L$ ): Fe (100), Zn (20) e Cu (5).

Tabela 3 – Composição da água residuária sintética.

Constituinte	Composição ( $mgL^{-1}$ )
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	213
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	497
$ZnCl_2$	40
$NH_4Cl$	58
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	34
$Na_2SO_4$	1833
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	20

Fonte: Adaptado de (KAKSONEN et al., 2004).

Os substratos etanol e lactato foram adicionados em volume equivalente a DQO correspondente, e o soro de leite foi utilizado em massa (pó) comercial da marca Alibra®, as concentrações de nitrogênio e fósforo do soro de leite foram de 22,2 mg de N-NTK/g de soro e 12000 mg de P/g de soro, respectivamente. Para a DQO de 1500 ( $mg/L$ ) utilizou-se 1,36  $g/L$  e 2,7  $g/L$  para 3000 ( $mg/L$ ) de DQO.

#### 4.4 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas do afluente e efluente dos reatores foram realizadas três vezes na semana seguindo o protocolo descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* para pH, sulfato, sulfeto e DQO (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012). Para determinação da concentração de ferro, utilizou-se o método com agente cromogênico por espectrometria.

O pH foi realizado de acordo com método 4500 –  $H^+B$  e para determinação do sulfato utilizou o método turbidimétrico 4500 –  $SO_4^{-2}$ , onde o íon sulfato em meio aquoso contendo ácido acético é precipitado por cloreto de bário, formando microcristais de sulfato de bário, expresso pela equação 4.1. A determinação da concentração de sulfato na água residuária foi determinada através da absorção da luz a 420 nm medida em espectrofotômetro por comparação com a curva de calibração.



O método para quantificação do sulfeto dissolvido foi colorimétrico por espectrofotômetro no comprimento de onda 510 nm, utilizando-se *Kit Hach* específico para análise de sulfeto. Para DQO foi utilizado o método colorimétrico 5220 D, pela reação com dicromato, em meio ácido, a quente. A concentração é medida através da quantidade produzida de  $Cr^{3+}$ , de coloração azul que é absorvida pela luz do espectrofotômetro no comprimento de 620 nm em comparação com a curva de calibração.

Na determinação de ferro, utilizou-se orto-fenantrolina como agente cromogênico. O método consiste em reduzir os íons férricos a ferrosos por meio de reagentes redutores, em específico, a hidroxilamina e complexá-los por meio da orto-fenantrolina. A orto-fenantrolina é um ligante bidentado comumente usado como agente quelante para íons metálicos. Sendo assim, a reação entre íons ferrosos e a orto-fenantrolina resulta em um complexo  $[Fe(phen)_3]^{2+}$  chamado "ferroína" de cor avermelhada, o qual é usado para a determinação fotométrica de ferro divalente (SKOOG et al., 2013)

## 4.5 Análise microbiológicas

### 4.5.1 Avaliação da população de BRS

A técnica de Números Mais Provável (NMP) foi realizada para quantificar as BRS presentes no inóculo e no fim da operação de cada reator. A técnica de NMP permite avaliar a quantidade de microrganismos, em meio de cultura próprio, e consiste das seguintes etapas: preparo da amostra, diluição seriada da água de diluição, diluição seriada do meio de cultura e incubação.

O meio de cultura é uma solução de nutrientes utilizada para promover o crescimento dos microrganismos fora do seu habitat natural. Para o enriquecimento das BRS utilizou-se o meio de cultura denominado Postgate C, cuja composição está representada na Tabela 4, sendo o meio rico em íons sulfato.

Tabela 4 – Composição do meio de cultura Postgate C utilizado para a análise NMP (POSTGATE, 1984).

Sais e Reagentes	Composição $gL^{-1}$
$NH_4Cl$	1,00
$KH_2PO_4$	0,50
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,10
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,06
$Na_2SO_4$	4,50
$MgSO_4$	0,06
Lactato de Sódio	6,00
Extrato de Levedura	1,00
Citrato de Sódio	0,30
Solução de Resazurina	1,00 mL para cada 1,00 L de solução

Fonte: Da autora.

Para a solubilização dos sais utilizou-se água ultrapurificada e o pH da solução foi ajustado para 7,2 com NaOH. Ao meio Postgate C foi acrescida solução de sulfato ferroso (1,0 % m/v) com a finalidade de precipitar o sulfeto reduzido pelas BRS e sulfeto de sódio (0,4% m/v), que auxilia no processo de redução do meio, sob atmosfera de  $N_2/CO_2$ .

A diluição seriada da biomassa foi realizada em água de diluição específica, conforme a composição na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição da água de diluição.

Reagentes	VOLUME (q.s.p 250 mL)
$K_2HPO_4$ (0,2 M)	1 mL
$KH_2PO_4$ (0,2 M)	0,25 mL

Fonte: Da autora.

Para o preparo da amostra, foi retirada uma alíquota de 5 mL da biomassa e adicionada a esta 70 mL de água ultrapurificada, a fim de obter as mesmas proporções dos reatores, e em seguida, transferida para um cadinho para maceração dos grânulos. Após a maceração, alíquotas de 10 mL foram transferidas para frascos de antibiótico de 30 mL contendo 5 g de pérolas de vidro. O frasco foi fechado com septo de butila e lacre de alumínio, e a biomassa foi desagregada por agitação manual em ângulo de 45° por 20 minutos.

Para este trabalho utilizou-se diluição seriada com fator  $10^{-2}$  a  $10^{-13}$  para o inóculo,  $10^{-6}$  a  $10^{-15}$  para biomassa proveniente da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1 e  $10^{-2}$  a  $10^{-11}$  para biomassa da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2, e cada uma das diluições foi realizada em quintuplicatas de sua solução, conforme Figura 5.

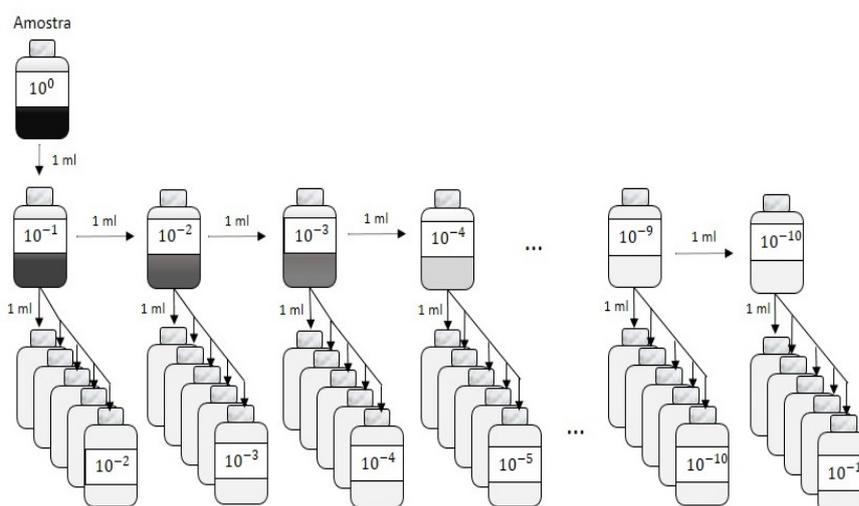


Figura 5 – Esquema da diluição seriada utilizando água de diluição e inoculação em meio de cultura.

Fonte: Da autora.

A quantificação foi realizada após a incubação a 30° C por 30 dias. Após o período de incubação, o crescimento dos microrganismos foi avaliado pela presença de turbidez.

Combinações de respostas positivas foram a base do cálculo para estimar o NMP, usando a tabela padrão de probabilidade, que confere o limite de confiança de 95 % (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012). A equação 4.2 expressa o valor de BRS em Número Mais Provável de células por mililitro de amostra (NMP/mL).

$$NMP/100mL = Valor \text{ de } NMP(Tabelado) * \frac{10}{V} \quad (4.2)$$

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

## 4.6 Riqueza Microbiana

### 4.6.1 Extração e Purificação de DNA

No final da operação dos reatores, cerca de 1,0 g de lodo granular de cada reator foi adicionado em frasco de antibiótico contendo 0,5 g de pérolas de vidro e 1,0 mL de solução de salina tamponada (PBS) 1X e agitado manualmente por 20 min, a fim de se obter uma biomassa homogênea. Por seguinte, 0,5 mL da biomassa homogênea foi utilizado para a extração do DNA. A metodologia de extração seguiu ao protocolo do fabricante Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Após a extração, as amostras foram purificadas seguindo também o protocolo do fabricante utilizando Wizard® DNA Clean Up System (Promega) (Anexos A e B).

### 4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A partir do DNA extraído das amostras foram obtidos fragmentos dos genes RNAr 16S e *dsrB*, utilizando a técnica da amplificação, através da reação de polimerização em cadeia (PCR) com *primers* homólogos às regiões dos genes.

A Tabela 6 descreve os *primers* do Grupo das Sulfato Redutoras e Domínios Bactéria e *Arqueia* utilizados na análise de PCR.

Uma sequência de oligonucleotídeos rica em guanidina e citosina (grampo GC) foi anexada no final 5' do oligonucleotídeos iniciador *forward*, para que na análise de DGGE o fragmento amplificado por PCR possa ser desnaturado, mas permanecendo na sua configuração de dupla fita, impedindo a completa separação da dupla fita de DNA (MYERS et al., 1985).

Para a reação da amplificação foi feita em solução (mix), contendo 10 mM de tampão de PCR, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM para cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Promega), 0,2 umol de cada *primer* e 50-100 ng de DNA e água Milli-Q esterilizada para um volume final de 50  $\mu L$ . As Tabelas 7, 8, 9 apresentam os reagentes na concentração final para análise de PCR.

Tabela 6 – *Primers* utilizados na análise de PCR.

Domínio	Gene	<i>Primers</i> e sequência (5' -> 3')
<i>Grupo das sulfato redutoras</i>	dsrB	<b>DSRp2060F</b> (GC-CAA CAT CGT YCA YAC CCA GGG) <b>DSR4R</b> (GTG TAG CAG TTA CCG CA)
<i>Bactéria</i>	RNAr 16S	<b>968F</b> (GC- AAC GGG AAG AAC CTT AC) <b>1401R</b> (CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG)
<i>Arqueia</i>	RNAr 16S	<b>1100F</b> (GC- AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G) <b>1400R</b> (CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC)
Sêquencia do grampo GC		CGC CCG CCG CGC GCGGCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

Fonte: Da autora.

Tabela 7 – Concentração final dos reagentes para o preparo do mix do grupo *BRS*.

Reagentes	Estoque	Concentração final	Volume para reação de 50 $\mu$ L
Tampão PCR	10 X	1X	5 $\mu$ L
<i>MgCl</i> <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 $\mu$ L
Primer DSRp2060F	20 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	1,25 $\mu$ L
Primer DSR4R	20 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	1,25 $\mu$ L
dNTP	25 mM	0,2 mM	0,4 $\mu$ L
Taq polimerase	5U/ $\mu$ L	0,4 U	0,4 $\mu$ L
Água destilada			q.s.p 50 $\mu$ L

Fonte: Da autora.

Tabela 8 – Concentração final dos reagentes para o preparo do mix do domínio *Bactéria*.

Reagentes	Estoque	Concentração final	Volume para reação de 50 $\mu$ L
Tampão PCR	10 X	1X	5 $\mu$ L
<i>MgCl</i> <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 $\mu$ L
Primer 1100F	20 $\mu$ M	0,2	0,5 $\mu$ L
Primer ARC1400R	20 $\mu$ M	0,2	0,5 $\mu$ L
dNTP	25 mM	0,2	0,4 $\mu$ L
Taq polimerase	5U/ $\mu$ L	0,4 U	0,4 $\mu$ L
Água destilada			q.s.p 50 $\mu$ L

Fonte: Da autora.

Tabela 9 – Concentração final dos reagentes para o preparo do mix do domínio *Arqueia*.

Reagentes	Estoque	Concentração final	Volume para reação de 50 $\mu$ L
Tampão PCR	10 X	1X	5 $\mu$ L
$MgCl_2$	50 mM	1,5 mM	1,5 $\mu$ L
Primer 968 F	20 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L
Primer 1401 R	20 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L
dNTP	25 mM	0,2 mM	0,4 $\mu$ L
Taq polimerase	5U/ $\mu$ L	0,4 U	0,4 $\mu$ L
Água destilada			q.s.p 50 $\mu$ L

Fonte: Da autora.

Para o preparo do mix, adicionou-se ao ependorff de 1,5 mL inicialmente a água, seguida do tampão de PCR, o  $MgCl_2$ , os dNTPs, *primers* e no final a Taq-polimerase. Por seguinte, distribuiu-se 49 $\mu$ L do mix no tubo de PCR e 1 $\mu$ L da amostra de DNA. As reações foram incubadas em um termociclador MaxyGene Gradient (Axigen) e o programa de amplificação consistiu das seguintes etapas:

- *Grupo das Sulfato Redutoras*: 4 minutos a 94°C (desnaturação inicial e ativação da enzima); 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (anelamento dos *primers*) e 1 minuto a 72°C (extensão); 10 minutos a 72°C (extensão final).
- Domínio *Bactéria*: 5 minutos a 94°C (desnaturação inicial e ativação da enzima); 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 58°C (anelamento dos *primers*) e 2 minutos a 72°C (extensão); 1 minutos a 72°C (extensão final).
- Domínio *Arqueia*: 1 minutos e 30 segundos a 94°C (desnaturação inicial e ativação da enzima); 10 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 61°C (anelamento dos *primers*) e 1 minutos e 30 segundos a 72°C (extensão) e 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 56°C (anelamento dos primers) e 1 minutos e 30 segundos a 72°C (extensão) e 3 minutos a 72°C (extensão final). Nos primeiros 10 ciclos de anelamento foi utilizado uma rampa de  $-0,5^\circ\text{C}$ .

Os produtos do PCR foram confirmados em corrida de eletroforese a 120 V por 30 minutos em gel de agarose 1,5%. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotodocumentado pelo transiluminador UV L-Pix STi (Loccus).

#### 4.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante - DGGE

As amplificações dos genes RNAr 16 S e *dsrB* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante, utilizando o sistema da Loccus

Biocologia. Para a formação do gradiente desnaturante foi necessário solução estoque de poli(acrilamida) de 7,5%, conforme os reagentes na Tabela 10.

Tabela 10 – Reagentes para preparo das soluções estoque de poli(acrilamida) 7,5%.

Solução desnaturante de poli(acrilamida) - 7,5 %				
Reagentes	40%	50%	60%	65%
Acrilamida/Bis 40% (mL)	18,8	18,8	18,8	18,8
Tampão TAE 50X (mL)	2	2	2	2
Formamida (mL)	16	20	24	26
Uréia (g)	16,8	21	25,2	27,3
Água MiliQ (q.s.p 100 mL)	46,4	38,2	30	25,9

Fonte: Da autora.

A partir das soluções estoques desnaturantes, preparou-se o gel com gradiente desnaturante em 40 e 60% para o domínio *Bactéria* e grupo das BRS, e 50 e 65% para o domínio *Arqueia*. Adicionou-se 11,5 mL da solução estoque de acrilamida na concentração requerida, seguido de 80  $\mu$ L de persulfato de amônio 10% (m/v) e 5  $\mu$ L de TEMED para acelerar a polimerização dos géis.

Após a polimerização do gel, na câmara eletroforética foi adicionado TAE 0,5 X e toda a câmara foi aquecida a 60° C. As alíquotas, preparadas com a mistura de 15  $\mu$ L de amostra com 6  $\mu$ L de tampão de carregamento (Promega), foram transferidas para os poçinhos do gel. A eletroforese foi realizada por 16 horas a 100 V e para visualização, os géis foram corados com SYBER GOLD I (Molecular Probes) e depois visualizados em transiluminador UV e fotodocumentado.

A análise do DGGE estabelece a riqueza microbiana das diferentes condições estabelecidas das biomassas provenientes dos reatores. A partir do perfil de bandas de ausência e presença nos diferentes géis, foi possível construir dendrogramas que relacionam nível de similaridade entre as amostras. Foi utilizado o coeficiente de Dice pelo método UPGMA, que liga os grupos pela média de similaridade entre suas bandas, com auxílio do software *BioNumerics*®.

O coeficiente de similaridade entre duas amostras considera o número total de bandas no DGGE e o número de bandas comuns, presentes nessas duas amostras. Conforme equação 4.3 (GILLAN et al., 1998).

A variável  $a$  é o número de bandas da primeira amostra,  $b$  é o número de bandas da segunda amostra e  $j$  é o número de bandas comuns. A intensidade das bandas de DGGE não foi considerada fator variável. Para perfis idênticos de DGGE, o valor do coeficiente de similaridade é 100% e perfis totalmente diferentes com valores iguais a 0% de similaridade (BELI, 2015).

$$C_s = \frac{2j}{(a + b).100} \quad (4.3)$$

#### 4.6.4 Sequenciamento do gene *dsrB*

Foram recortadas sete bandas de interesse do gel de DGGE do grupo das bactérias redutoras de sulfato. As bandas foram colocadas em *ependorf* contendo 35  $\mu\text{L}$  de água ultra pura esterilizada e incubadas a 4° C *overnight*.

Após o período de incubação, as bandas foram reamplificadas pela técnica PCR com o mesmo par de *primers* utilizados, porém sem o grampo GC. Os novos produtos de PCR de cada banda foram purificados utilizando Kit *PCR Clean-Up System* da Promega (Anexo D). Para estimar a concentração de DNA de cada banda, os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2% com alíquota de 2  $\mu\text{L}$  de amostra e 1  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento, e com padrão de DNA *low mass ladder* (Invitrogen).

Após a quantificação dos produtos de PCR, as amostras foram enviados ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudo do Genoma Humano (USP) para o sequenciamento. O protocolo utilizado foi ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies), no qual as reações utilizam BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Os resultados do sequenciamento foram recebidos em arquivo ABI e correspondiam a fita singular do *primer* iniciador. A avaliação da sequência foi realizada através do programa Eletropherogram Quality Analysis, pelo link <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>>. Este programa tem como objetivo avaliar a qualidade do sequenciamento, utilizando Phred. O Phred associa um fator de qualidade para cada base da sequência gerada, conforme Eq. 4.4. Os resultados dessa avaliação estão apresentados na Tabela 11.

$$Q = -10 * \log_{10}(Pe) \quad (4.4)$$

Sendo  $Pe$  = Probabilidade da base ser errada.

Tabela 11 – Tabela com a relação entre o valor de qualidade (Q) e o nível de confiança de cada base.

Q	Pe	Segurança
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99,9%
40	1 em 10000	99,99%
50	1 em 100000	99,999%

Fonte: Da autora.

As sequências foram selecionadas para índices de qualidade (Q) maiores que 20. Após a obtenção da sequência consenso do gene *dsrB*, esta foi depositada no banco de dados GenBank (NCBI), com os seguintes números de acesso KX60893, KX60894, KX60895, KX60896, KX60897, KX60898 e KX60899. Em seguida, foi realizado o alinhamento local com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, utilizando o programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Operação dos reatores

### 5.1.1 Remoção de sulfato e DQO

Para avaliar a resposta da atividade das BRS a diferentes tipos de doadores de elétrons e relação  $DQO/SO_4^{-2}$ , a DQO, sulfato, sulfeto, ferro e a variação do pH foram analisadas no afluente e efluente durante 88 dias de observações em cada um dos reatores, conforme Tabela 12.

Tabela 12 – Remoção de DQO, sulfato e ferro, produção de sulfeto e variação do pH durante a operação dos reatores em batelada.

$DQO/SO_4^{-2}$	Etanol		Lactato		Soro de Leite	
	1	2	1	2	1	2
<b>DQO</b>						
Afluente (mg/L)	1453 ± 164	2890 ± 300	1414 ± 221	2564 ± 439	1487 ± 199	2835 ± 286
Efluente (mg/L)	325 ± 197	2515 ± 311	441 ± 277	699 ± 395	488 ± 316	1595 ± 461
Remoção (%)	77 ± 14	13 ± 9	68 ± 19	71 ± 17	68 ± 18	43 ± 19
<b>Sulfato</b>						
Afluente (mg/L)	1494 ± 158	1494 ± 158	1494 ± 158	1494 ± 158	1494 ± 158	1494 ± 158
Efluente (mg/L)	396 ± 119	708 ± 162	332 ± 131	171 ± 123	320 ± 102	580 ± 167
Remoção (%)	73 ± 8	48 ± 10	80 ± 8	90 ± 6	80 ± 6	58 ± 8,3
<b>Sulfeto</b>						
Efluente (mg/L)	143 ± 41	35 ± 23	203 ± 91	281 ± 78	181 ± 55	94 ± 44
<b>Ferro</b>						
Afluente (mg/L)	105 ± 13	105 ± 13	105 ± 13	105 ± 13	105 ± 13	105 ± 13
Efluente (mg/L)	4 ± 3	84 ± 12	4 ± 3	4 ± 3	5 ± 4	56 ± 22
Remoção (%)	96 ± 2	15 ± 6	98 ± 3	97 ± 3	95 ± 5	47 ± 24
<b>pH</b>						
Afluente	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1
Efluente	6,97 ± 0,26	5,14 ± 0,16	7,28 ± 0,24	7,35 ± 0,24	6,55 ± 0,45	4,98 ± 0,13

Fonte: Da autora.

A relação  $DQO/SO_4^{-2}$  é um parâmetro importante na competição entre bactérias redutoras de sulfato (BRS) e microrganismos anaeróbios envolvidos no tratamento de águas residuárias (HU et al., 2015). Neste trabalho, na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0, a remoção de DQO e sulfato esteve acima de 68% e 73%, respectivamente. Com os dados obtidos do efluente, na presença de etanol e relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1, a conversão de 1 mol de sulfato requereu 1,05 mol de DQO, enquanto na presença de lactato e soro de leite, os valores foram próximos de 0,85 quando se utilizou a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1 no afluente. Estes resultados indicaram pouca variação da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  utilizada no afluente e obtida no efluente. Esta é uma razão que assume ter DQO suficiente para

que ocorra a redução de sulfato, visto que, a relação estequiométrica para que toda DQO seja removida via redução de sulfato é 0,67.

Estudos que empregam biorreatores demonstram bons resultados de remoções de sulfato em efluentes ácidos na relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1. A remoção de sulfato atingiu 82,2 % em um reator operado em bateladas contendo etanol como doador de elétrons no tratamento de drenagem ácida de minas sintética (pH afluente 4,0). Nesta mesma condição, a remoção de DQO foi de 100 % (VIEIRA et al., 2016). Em um reator do tipo UASB também utilizando etanol como substrato, a remoção de sulfato foi de 80% quando o reator operava em TDH de 12h, pH afluente 4,0 e relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1 (CUNHA, 2015). Para o mesmo tipo de reator, porém utilizando soro de leite como substrato e TDH de 24h, obteve-se 74% de remoção de sulfato (SAMPAIO, 2015). O uso de lactato para a redução de sulfato em efluente ácido de minas foi avaliado em um reator UASB com relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 0,8 e resultou, ao final da operação, em remoções de sulfato próximas a 84% (ACERBI, 2015). Portanto, a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0 é uma boa alternativa para o tratamento de águas residuais ricas em sulfato, cujos altos valores de remoções de DQO e sulfato são encontrados na literatura e no presente trabalho.

Na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2, somente na presença de lactato, a remoção de sulfato atingiu 70% e a de DQO, 90%. Em termos de energia e crescimento de biomassa, o lactato é superior em comparação com outros doadores de elétrons como etanol,  $H_2$ , propionato e acetato (NAGPAL et al., 2000) e, portanto, na presença deste doador de elétrons, as BRS apresentam maior vantagem competitiva sobre outros grupos microbianos.

Os reatores alimentados com etanol e soro de leite resultaram em baixas valores de remoções de DQO e sulfato quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foi igual a 2. Para o etanol, a remoção de DQO e sulfato foi 13% e 48%, respectivamente. Neste caso, a conversão de DQO foi altamente influenciada, com uma DQO efluente de 2515 mg/L. Uma hipótese seria a oxidação incompleta da matéria orgânica por BRS ou diferentes comunidades microbianas que produzem acetato, o que resulta no aumento de DQO efluente. A presença de acetato no afluente foi observada por estudo utilizando reator UASB e etanol como doador de elétrons na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2 no tratamento de drenagem ácida de minas sintética (ACERBI, 2015). A máxima remoção de DQO encontrada pelo autor foi de 29%, com acúmulo de ácidos no sistema, uma vez que estes compõem parte do oxigênio demandado na medida de DQO.

Para o reator alimentado com soro de leite, a remoção de DQO e sulfato observada foi de 43 % e 58 %, respectivamente, na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  de 2. Na literatura, poucos trabalhos tem sido publicados com a utilização do soro de leite como substrato na biorremediação de águas residuais rica em sulfato, para fins de comparação de dados. Contudo, este trabalho demonstra que o soro de leite sendo um substrato complexo permite a presença de vias fermentativas que resultam em produtos facilmente assimilados pelas

BRS como álcoois e ácidos de cadeia curta, como o lactato.

Neste trabalho, a conversão de DQO pelas BRS variou com as relações  $DQO/SO_4^{-2}$  estabelecidas. Estudos anteriores demonstram que o fluxo de elétrons para BRS diminui com o aumento  $DQO/SO_4^{-2}$ . Em um reator do tipo quimiostato, o efeito do sulfato na degradação anaeróbia de benzoato aumentou com a diminuição da relação  $DQO/SO_4^{-2}$ , alterando o fluxo de elétrons para as arqueias metanogênicas de 99% na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 60, para 13 % na relação 0,75 (LI; LAM; FANG, 1996). No tratamento de drenagem ácida de minas em reator UASB com TDH de 12 h e presença de metais, o fluxo de elétrons para as BRS foi de 64,5% do total de elétrons disponíveis quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foi igual a 1,0 (CUNHA, 2015).

Com os valores de remoções médias de DQO e sulfato, foi possível estimar o balanço de massas das vias de oxidação de DQO e de redução de sulfato quando o etanol e lactato foram utilizados como fonte de carbono, de acordo com as equações 5.1 a 5.4

### Etanol

#### *Oxidação Completa*

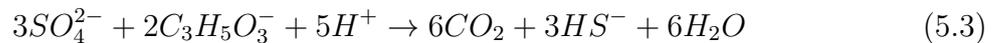


#### *Oxidação Incompleta*

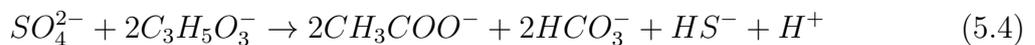


### Lactato

#### *Oxidação Completa*



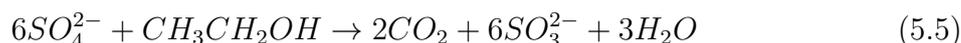
#### *Oxidação Incompleta*



A redução média de sulfato no reator alimentado com etanol na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  1 foi 1098 mg/L, o que requer 732 mgDQO/L. Este valor é inferior ao observado na remoção de DQO, 1128 mgDQO/L. Neste caso, se a oxidação completa do etanol (Eq.5.1) for a via metabólica principal, apenas 65% da DQO foi removida por processo de redução de sulfato e o restante 35%, removido por microrganismos fermentativos. Quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foi de 2,0 no reator alimentado com etanol, nota-se uma maior diferença entre as cargas teóricas e obtidas experimentalmente. A remoção média de sulfato foi 786 mgSO<sub>4</sub><sup>-2</sup>/L, sendo necessários 524 mgDQO/L. No entanto, este valor esteve acima da remoção observada, 375 mgDQO/L. Isto significa que não haviam elétrons suficientes para

reduzir a quantidade de sulfato removida até sulfeto. Uma hipótese para esta observação seria uma redução incompleta do sulfato a intermediários, tais como sulfito, tiosulfato ou enxofre elementar (Eq 5.5 a 5.7). Ademais, muitos microrganismos, incluindo procariotas, utilizam sulfato como uma fonte de enxofre para a biossíntese e em relações  $DQO/SO_4^{-2}$  elevadas, a sulfetogênese não é a rota preferencial, pois favorece a competição com outros microrganismos.

*Redução de sulfato a sulfeto*



*Redução de sulfato a tiosulfato*



*Redução de sulfato a enxofre elementar*



Para os reatores operados com lactato na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0, 1162  $mgSO_4^{-2}/L$  foram removidos, o que requer 775  $mgDQO/L$ . O total removido DQO foi 963  $mgDQO/L$ , o suficiente para fornecer a quantidade de elétrons necessárias para reduzir o sulfato a sulfeto. Se a oxidação completa for considerada a via principal, 80 % da oxidação de DQO ocorreu via sulfetogênese, enquanto 20 % resultaria da oxidação da matéria orgânica por outros microrganismos ou pelos próprios BRS por oxidação incompleta.

Para relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2,0, a redução do sulfato foi 1323  $mgSO_4^{-2}/L$  e 882  $mgDQO/L$  seria a quantidade de DQO necessária para fornecer os elétrons requeridos. Este valor é menor do que observado, que foi de 1895  $mgDQO/L$ . Neste caso, apenas 44% de DQO foi utilizada para redução de sulfato, enquanto 56% foram oxidados por diferentes microrganismos.

Fica evidente, portanto, que o excesso de doador de elétrons disponível promoveu uma mudança na via metabólica de oxidação da matéria orgânica. O aumento da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  favoreceu o metabolismo de outros grupos bacterianos e competição com BRS, deslocando o fluxo de elétrons para os grupos microbianos não redutores de sulfato.

### 5.1.2 Produção de Sulfeto

As espécies de sulfeto dependem do pH e o equilíbrio entre  $H_2S/HS^-/S^{2-}$  está representado pela Figura 6. Em pH neutro, próximo ao  $pK_1$  referente a dissociação do  $H_2S$ , pequenas mudanças no pH entre pH 6,0 e 8,0 alteram significativamente as concentrações de  $H_2S$ . A forma de  $S^{2-}$  é estável entre pH 4,0 e 15,0, com concentrações próximas de zero. Somente em pH acima de 16, a presença de  $S^{2-}$  é relevante.

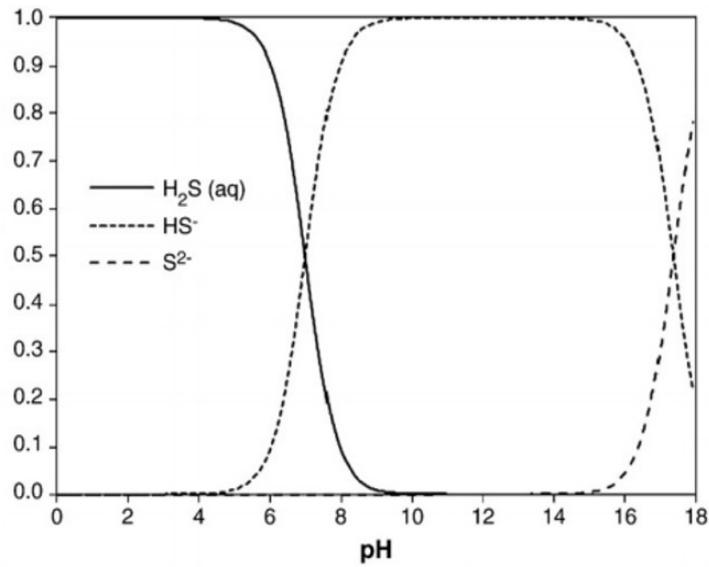


Figura 6 – Distribuição das espécies de sulfeto em função do pH.

Fonte: (LEWIS, 2010).

Com as equações 5.8 e 5.9 foi possível estimar as porcentagem de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e hidrogenosulfeto ( $HS^-$ ) (KALYUZHNYI; FRAGOSO; MARTINEZ, 1997). Considerou-se o pH médio dos efluentes dos reatores e o sulfeto total dissolvido, conforme Tabela 13 e  $pK_1=6,95$  ( $35^\circ C$ ).

Tabela 13 – Médias e desvio padrão do sulfeto total dissolvido (STD) e pH dos efluentes dos reatores, durante todo o período de operação. Os números 1 e 2 ao lado dos doadores de elétrons indicam o valor da relação  $DQO/SO_4^{2-}$ .

	Concentração de sulfeto (mgS/L)	Desvio padrão	pH	Desvio Padrão
<b>Etanol 1</b>	143	41	6,97	0,26
<b>Etanol 2</b>	35	23	5,14	0,16
<b>Lactato 1</b>	203	91	7,28	0,24
<b>Lactato 2</b>	281	78	7,35	0,24
<b>Soro de leite 1</b>	181	55	6,55	0,45
<b>Soro de leite 2</b>	94	44	4,97	0,13

Fonte: Da autora.

$$[H_2S]_{aq} = \frac{1}{1 + 10^{(pH-pK)}} * [STD] \quad (5.8)$$

$$[HS^-]_{aq} = [STD] - [H_2S]_{aq} \quad (5.9)$$

As porcentagens do sulfeto de hidrogênio e do hidrogenosulfeto, em relação ao sulfeto total dissolvido estão apresentadas na Figura 7.

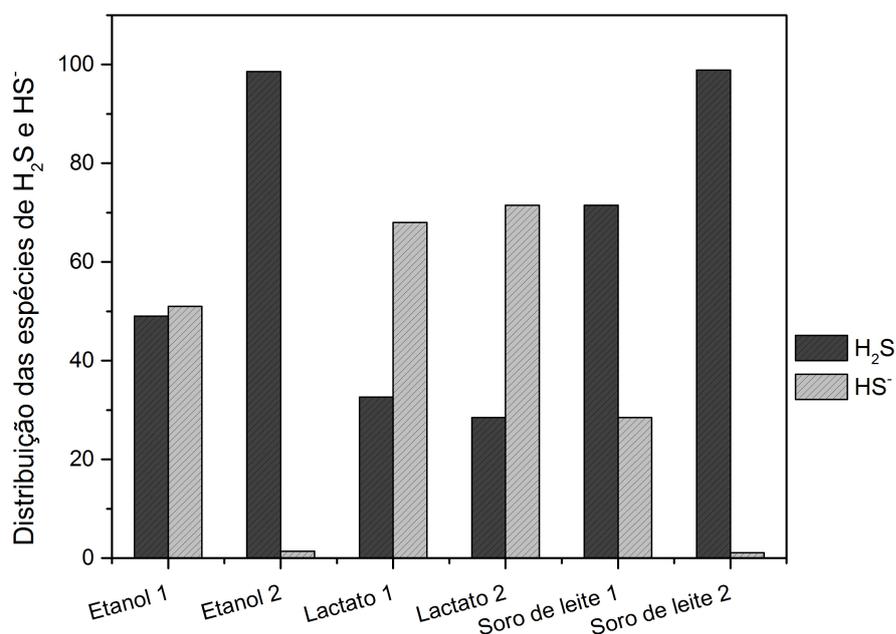


Figura 7 – Porcentagens de sulfeto de hidrogênio e hidrogenosulfeto no efluente dos reatores.

Fonte: Da autora.

Observa-se a predominância de quase 100% de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) nos efluentes dos reatores de pior performance, sendo estes etanol 2 e soro de leite 2, cujos pH efluentes foram  $5,14 \pm 0,16$  e  $4,98 \pm 0,13$ , respectivamente. Abaixo de pH 6, o sulfeto de hidrogênio é a espécie química predominante.

Nos reatores com melhores performance, observou-se baixa predominância de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), 32% (lactato 1) e 29% (lactato 2). Isso deve-se ao pH efluente desses reatores estarem acima de 6, alterando significativamente a concentração de equilíbrio. O reator etanol 1 apresentou concentração próxima do equilíbrio, 49% para sulfeto de hidrogênio e 51% para hidrogenosulfeto, visto que o pH efluente ( $6,97 \pm 0,26$ ) deste reator esteve muito próximo ao  $pK_1$ .

O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) é a espécie de sulfeto mais tóxica aos microrganismos, pois ele impede a passagem de nutrientes na membrana celular prejudicando o bom funcionamento das células. Somente moléculas neutras pode permear a membrana celular e disponibilizar compostos essenciais aos metabolismo microbiano (POL et al., 1998). Entretanto, neste trabalho, as altas concentrações de sulfeto foram observadas na forma

de sulfeto dissolvido e, portanto, não resultaram em toxicidade aos sistemas. Somente nos reatores com baixo desempenho, nos quais ocorreu predominância de ( $H_2S$ ), a toxicidade do sulfeto pode ter sido relevante sobre o metabolismo bacteriano.

Em um estudo relatado por (KAKSONEN; FRANZMANN; PUHAKKA, 2004), observaram-se os efeitos inibitórios do sulfeto em um reator de leito fluidizado utilizando os doadores de elétrons etanol e acetato para redução de sulfato. Os autores relataram valores de inibição para sulfeto de hidrogênio de  $84 \text{ mgH}_2\text{S}/\text{L}$  para o etanol e  $124 \text{ mgH}_2\text{S}/\text{L}$  para o acetato, demonstrando que a oxidação do etanol foi mais inibida pela toxicidade do sulfeto do que a oxidação do acetato. Estes resultados possivelmente explicariam a baixa taxa de remoção de matéria orgânica no reator operado com etanol na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2,0, com  $98,6 \text{ mgH}_2\text{S}/\text{L}$ .

Dados na literatura indicam que a inibição por sulfeto de hidrogênio produzido biologicamente no processo de tratamento anaeróbio de águas residuárias enriquecidas por sulfato podem levar a falhas do processo de tratamento. Vários autores relatam a inibição de diferentes grupos bacterianos em decorrência da toxicidade do sulfeto, incluindo o grupo das arqueias metanogênicas (COLLERAN; FINNEGAN; LENS, 1995; VISSER; POL; LETTINGA, 1996). Contudo, um estudo demonstrou que as BRS não sofrem grande influência de altas concentrações de  $H_2S$ , sendo mais comumente encontrado nas arqueias metanogênicas (ISA; GRUSENMEYER; VERSTRAETE, 1986).

### 5.1.3 Remoção de Ferro

A remoção de metal está associada a produção de sulfeto. A reação do metal e o sulfeto tem como produto sulfetos metálicos que apresentam baixa solubilidade e precipitam dentro do reator. A eficiência de remoção está apresentada na Figura 8.

Observa-se uma elevada eficiência de remoção do ferro, acima de 96%, para reatores com produção de sulfeto entre  $143 \pm 41 \text{ mgS}/\text{L}$  e  $281 \pm 78 \text{ mgS}/\text{L}$ , sendo estes: etanol 1, lactato 1, lactato 2 e soro de leite 1. Para concentrações de sulfeto entre  $35 \pm 23 \text{ mgS}/\text{L}$  e  $94 \pm 44 \text{ mgS}/\text{L}$ , a remoção de ferro foi de 15% e 47%, respectivamente, para os reatores etanol 2 e soro de leite 2. Dessa forma, os dados obtidos confirmam que a remoção de ferro está diretamente associada a produção de sulfeto.

A Resolução CONAMA 430/2011 estabelece padrão de lançamento de ferro de 15 mg/L. A concentração de ferro na alimentação foi estabelecida em 100 mg/L. Após o tratamento biológico, somente os reatores etanol 1, lactato 1, lactato 2 e soro de leite 1 atenderiam os valores estabelecidos pelo órgão ambiental.

Os equilíbrios termodinâmicos envolvidos na precipitação de sulfeto metálico estão expressos nas equações 5.10 a 5.13. As equações expressam duas formas de produção de sulfetos metálicos, em pH neutro (6,99) e alcalino (17,4). Porém, variações de pH

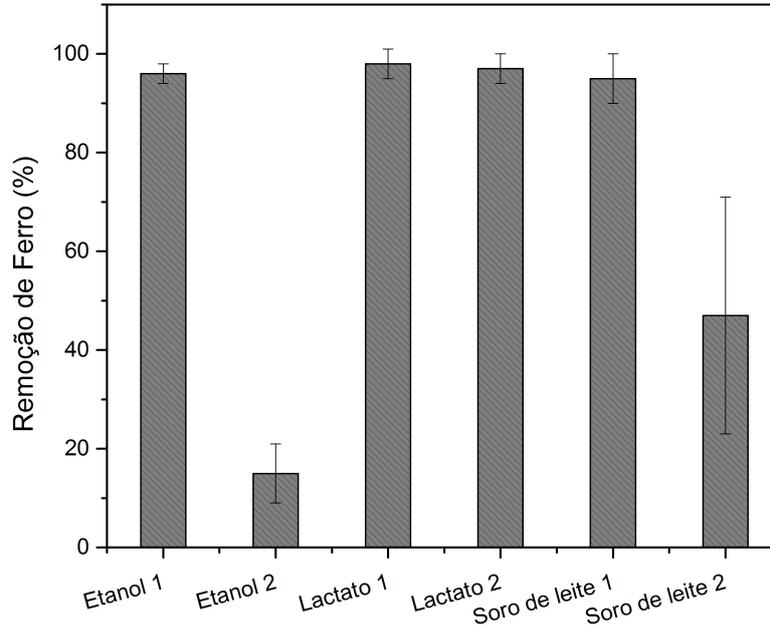
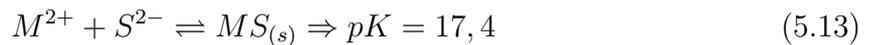
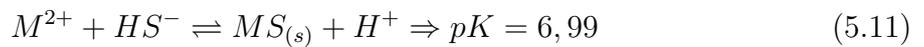


Figura 8 – Porcentagens de remoção de ferro nos diferentes reatores estudados. Os números 1 e 2 ao lado dos doadores de elétrons indicam o valor da relação  $DQO/SO_4^{-2}$ .

Fonte: Da autora.

determinam o deslocamento do equilíbrio.



Os valores de pH no efluente nos diferentes sistemas variou de ácido a neutro. Os reatores com pH efluente ácido (etanol 2 e soro de leite 2) apresentaram menores remoções de ferro, 15 % e 47 %, respectivamente, pois estavam muito abaixo do pH de dissociação do  $H_2S$ , o que resultou em menor quantidade de  $HS^-$  disponível para promover a precipitação de ferro. Por outro lado, os reatores cujo pH efluente estavam acima de 6,55, ou seja, próximos ao  $pK_1$ , alcançaram elevadas remoções de ferro em função da grande disponibilidade de  $HS^-$ .

### 5.1.4 pH

Os valores de pH afluente e efluente durante todo o período de operação dos reatores estão apresentados na Figura 9.

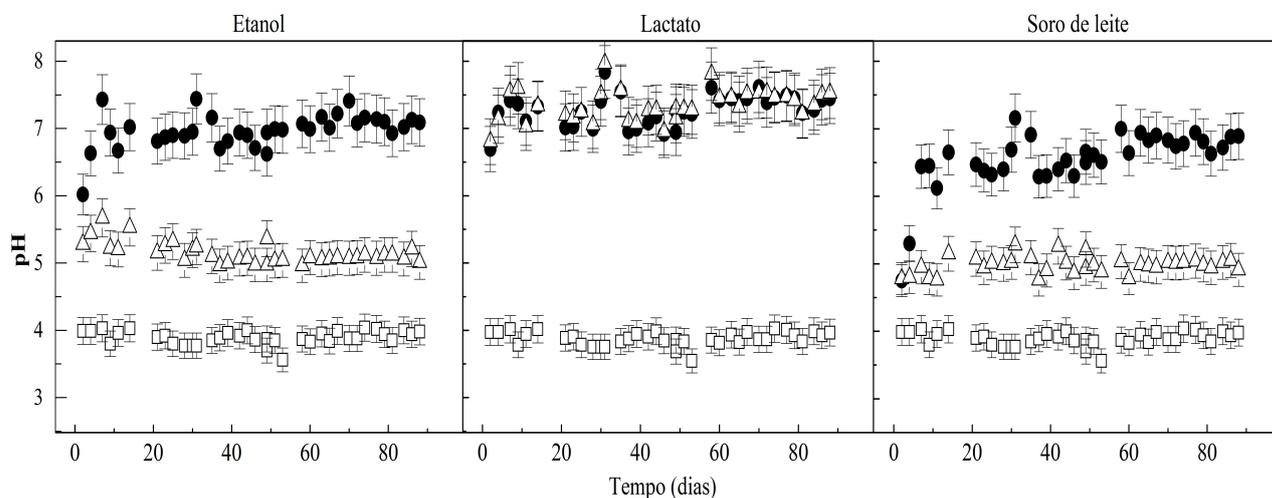
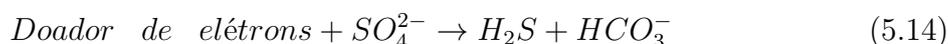


Figura 9 – Variação do pH afluente e efluente nos reatores, com incerteza de 5%. (□) Afluente, (●)  $DQO/SO_4^{2-}$  :1 e (△)  $DQO/SO_4^{2-}$  :2.

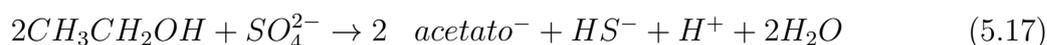
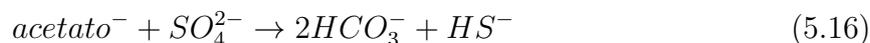
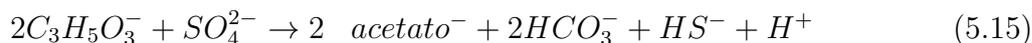
Fonte: Da autora.

Os dados obtidos no pH efluente apresentaram elevada homogeneidade, com baixos valores de desvio padrão e o pH demonstrou ser um parâmetro de estabilização rápida, sendo observada nos primeiros dias de operação e não se verificando mudanças bruscas no pH efluente de cada reator. Observa-se na Figura 9 que todos os sistemas apresentaram o pH efluente maior que o afluente, sendo justificado pela equação 5.14.



A produção do bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) na oxidação do doador de elétrons resulta em alcalinidade que aumenta o pH ácido do afluente. Mas, a produção de alcalinidade se difere em cada sistema proposto.

A relação  $DQO/SO_4^{2-}$  não interferiu no pH efluente quando o lactato foi o doador de elétrons, enquanto que para o etanol e soro de leite observaram-se variações de acordo com a relação  $DQO/SO_4^{2-}$ . A oxidação completa do lactato via sulfetogênese produz 3 mols de alcalinidade de bicarbonato por mol de substrato (Eq. 5.15 e 5.16), enquanto que a oxidação do etanol produz apenas 2 mols (Eq. 5.17 e 5.16). Além disso, a oxidação do lactato produz alcalinidade mesmo que a oxidação seja incompleta (Eq. 5.15), enquanto que isto somente ocorre quando se observa a oxidação completa do etanol (KAKSONEN et al., 2004).



O pH efluente dos reatores alimentados com etanol e soro de leite apresentaram variações de acordo com relação  $DQO/SO_4^{2-}$  empregada. Para a relação igual a 1, a média de pH efluente foi  $6,97 \pm 0,26$  com etanol e  $6,55 \pm 0,45$  com soro de leite, esses reatores apresentaram bons desempenho em relação às remoções de sulfato e DQO. Em ambos, o pH favoreceu a atividade bacteriana das redutoras de sulfato e resultou do consumo de sulfato e geração de alcalinidade.

Na relação  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2, foi observado um baixo pH efluente,  $5,14 \pm 0,16$  para etanol e  $4,98 \pm 0,13$  para soro de leite. Esses sistemas foram caracterizados com maior DQO residual, resultantes da oxidação incompleta da matéria orgânica a acetato. A presença de acetato, mesmo sendo um ácido fraco, contribuiu para o abaixamento de pH do sistema, além de ser resultado da oxidação incompleta, que não necessariamente leva a formação de bicarbonato (CHERNICHARO, 2007). Estudos indicam que acetato na sua forma não dissociada acarretaria a inibição da atividade das BRS em pH ácido ( $\leq 6$ ) (REIS et al., 1992).

Este estudo demonstrou que o pH ácido do afluente  $3,9 \pm 0,1$  não afetou o desempenho dos reatores. O pH ótimo para o crescimento das BRS varia de 5 a 9 (POSTGATE, 1984) e, portanto, o pH baixo significa mais investimento de energia no bombeamento de prótons através da membrana celular, aumentando assim o gasto de energia. No entanto, a existência de bactérias ácido tolerantes e BRS acidofílicas oferece a possibilidade de tratar águas ácidas diretamente, sem neutralização antes do tratamento (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

## 5.2 Análises microbiológicas

### 5.2.1 Quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Para comparação do crescimento de BRS, inicialmente foi determinada a concentração inicial de BRS no inóculo (lodo granular proveniente de um reator em batelada tratando drenagem ácida de minas sintética). Por meio da avaliação de três sequências de diluição consecutivas e a combinação de números positivos e negativos, os valores de NMP correspondentes a cada reator estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Quantificação da população de BRS por meio da técnica de NMP.

Biomassa	Faixa de diluição	Tubos positivos	NMP/100 mL	Limite de confiança (95%)	
				Inferior	Superior
Inóculo	$10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}$	5-3-4	210	70	400
Etanol 1	$10^{-12}, 10^{-13}, 10^{-14}$	3-2-1	17	6,8	40
Etanol 2	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	5-4-1	170	58	400
Lactato 1	$10^{-13}, 10^{-14}, 10^{-15}$	5-2-1	70	22	70
Lactato 2	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$	3-1-0	11	3,5	26
Soro de leite 1	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$	2-1-0	6,8	1,8	17
Soro de leite 2	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	4-4-1	40	14	100

Fonte: Da autora.

A Figura 10, representa os valores obtidos por meio da eq. 4.2 nas amostras dos reatores analisados.

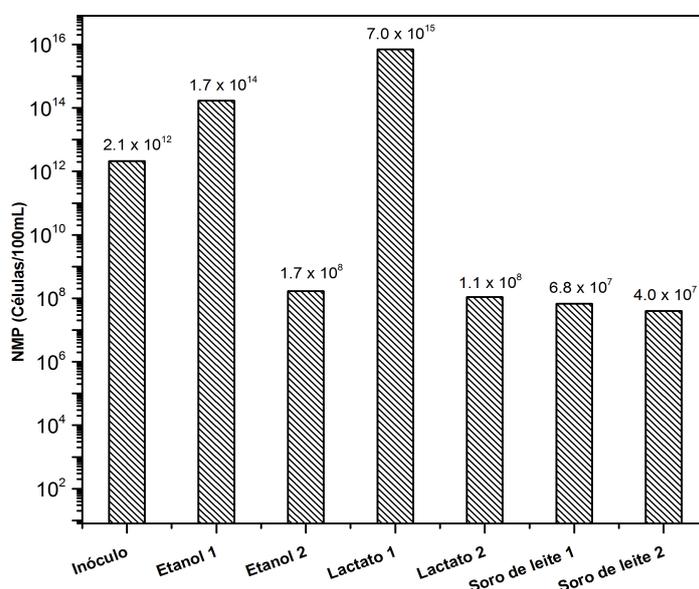


Figura 10 – NMP de BRS em 100 mL da cultura do inóculo e biomassa dos reatores nas diferentes condições.

Fonte: Da autora.

A alta concentração de BRS obtida no inóculo ( $2,1 \times 10^{12}$  células/100 mL) era esperada em função da origem deste ser um reator sulfetogênico que operava em condições favoráveis ao processo de sulfetogênese mediado por BRS.

O número de BRS decresceu com o aumento da relação  $DQO/SO_4^{2-}$  quando se utilizou etanol e lactato. Para o etanol, o aumento de BRS em relação ao inóculo foi  $10^2$  para relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1,0 e  $10^{-4}$  para relação  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2,0. Utilizando lactato como doador de elétrons, observou-se aumento na comunidade de BRS igual a  $10^3$  na relação  $DQO/SO_4^{2-}$  de 1,0 e  $10^{-4}$  para relação  $DQO/SO_4^{2-}$  de 2,0. No caso do soro de

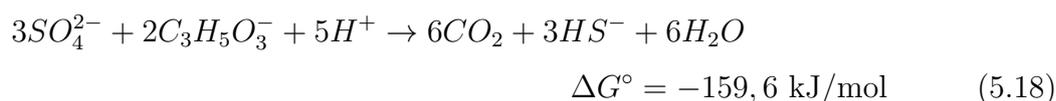
leite, o número mais provável de BRS decresceu  $10^{-5}$  para ambas as relações  $DQO/SO_4^{2-}$  estudadas.

Mesmo com a alta taxa de remoção de DQO e sulfato no reator operado com lactato na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2,0, os resultados de quantificação de BRS demonstraram uma interferência direta da relação  $DQO/SO_4^{2-}$  no crescimento de BRS, resultando em uma população maior somente quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foi igual a 1,0 no caso de etanol e lactato. No entanto, para um substrato complexo como o soro de leite, não foi observada diferença no crescimento entre as relações  $DQO/SO_4^{-2}$  de 1,0 e 2,0.

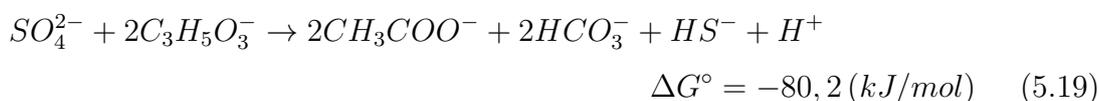
Os valores mais elevados de NMP foram obtidos no reator alimentado com lactato na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 1,0 e justifica-se pelo fato do substrato ser fonte preferencial e também ser utilizado no ensaio de quantificação da população de BRS (WIDDEL, 1988).

Uma hipótese para explicar a redução na população de BRS quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  de 2,0 foi utilizada para o lactato, seria a predominância da via de oxidação incompleta de matéria orgânica. A incompleta oxidação libera menos energia em comparação a completa oxidação do lactato (Eq.5.18 e Eq.5.19), resultando em menor crescimento de BRS (MUYZER; STAMS, 2008; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Assim, considerando a estequiometria da reação, o produto de oxidação incompleta conduz à formação do acetato, o qual foi utilizado como uma fonte de energia e carbono para outros grupos microbianos que conduzem a elevadas taxas de remoção de DQO, por exemplo, como as arqueias metanogênicas.

#### *Oxidação Completa*



#### *Oxidação Incompleta*



### 5.3 Determinação da riqueza microbiana por meio da técnica PCR/DGGE

Para avaliação da riqueza microbiana, as amostras foram coletadas do inóculo inicial e ao final da operação de cada reator. Inicia-se com as extrações de DNA que representam o DNA genômico dos microrganismos presentes nas amostras, seguido do PCR para a amplificação da porção de DNA extraído e por fim, o DGGE. A seguir serão discutidos separadamente os resultados obtidos para domínios *Bactéria*, *Arqueia* e Grupo das redutoras de sulfato.

### 5.3.1 Domínio Bactéria

As amostras provenientes da extração do DNA foram amplificadas utilizando *primers* específico para o *Domínio Bactéria*. Os resultados da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, conforme demonstrado na Figura 11.

Através do gel foi possível observar o tamanho do fragmento amplificado, correspondente a 433 pb, sendo os pares de bases referente aos *primers* utilizados somado aos pares de base do grampo GC. A partir dos produtos de PCR e a garantia das amostras não estarem contaminadas, prosseguiu-se para análise de DGGE, a fim de se avaliar a riqueza de bandas em cada sistema proposto.

A Figura 12, apresenta a imagem do gel do DGGE e o gráfico dendrograma que representa o agrupamento e similaridade entre os diferentes reatores e inóculo, o que permitiu a avaliação das relações genéticas e as variações da riqueza microbiana. O dendrograma foi gerado pelo programa *BioNumerics*, e os perfis de bandas foram combinados e analisados pelo coeficiente de DICE, usando o algoritmo UPGMA.

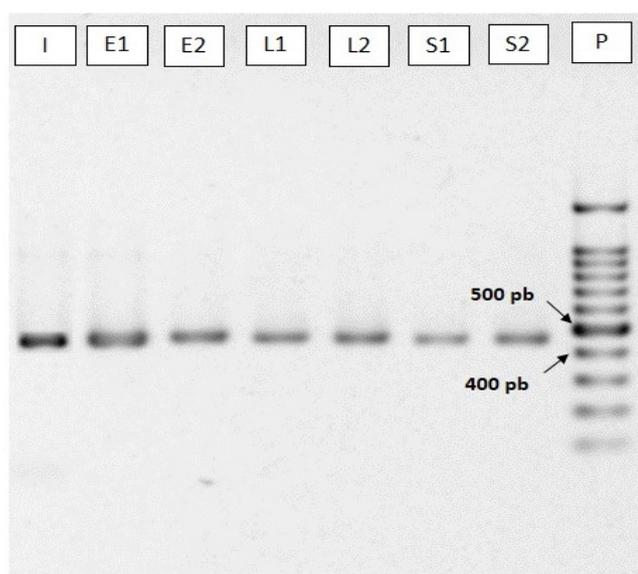


Figura 11 – Imagem do gel de agarose 1,5%. Amostras: I: Inóculo, E1: Etanol na relação DQO/Sulfato=1, E2: Etanol na relação DQO/Sulfato=2, L1: Lactato na relação DQO/Sulfato=1, L2: Lactato na DQO/Sulfato=2, S1: Soro de leite na relação DQO/Sulfato=1, S2: soro de leite na relação DQO/Sulfato=2, P: Padrão 100bp DNA Ladder.

Fonte: Da autora.

No dendrograma obtido, observa-se a presença de um cluster principal, com coeficiente de similaridade inferior a 20% entre os sistemas agrupados, que no caso, estiveram relacionados ao tipo de doador de elétrons utilizado. Diante disso, pôde-se observar que a

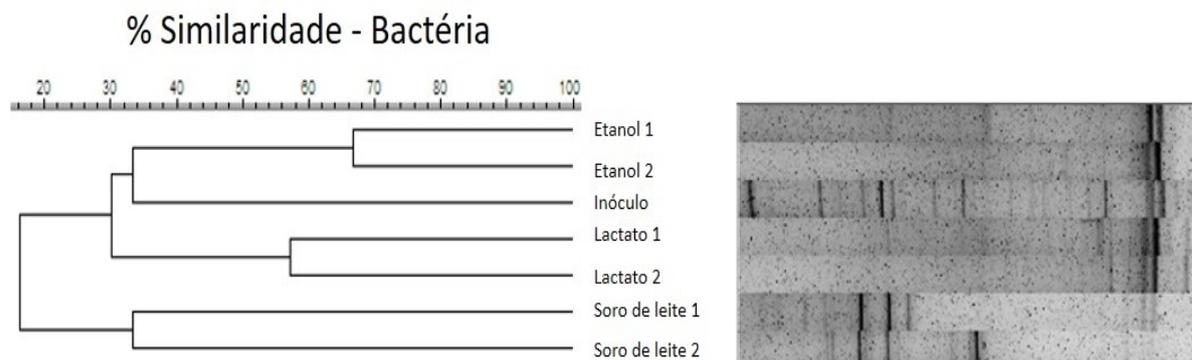


Figura 12 – Dendrograma e imagem negativa do gel de DGGE com gradiente desnaturante 40-60% para o *Domínio Bactéria*.

Fonte: Da autora.

comunidade microbiana pertencente ao *Domínio Bactéria* sofreu, de modo geral, grandes alterações em sua composição quando se comparam cada reator avaliado e o inóculo inicial.

Em um estudo sobre diversidade microbiana de lodo anaeróbico utilizando reator UASB para o tratamento de ácidos graxos de cadeia longa, observou-se similaridades menores de 30% quando se compararam amostras ao longo da operação com inóculo (SOUSA et al., 2007). Em um trabalho sobre a riqueza microbiana de um reator em batelada tratando drenagem ácida de minas e utilizando etanol como substrato, observou-se uma similaridade de 62% no *Domínio Bactéria* entre as etapas de operação que envolveram adição de metais com o inóculo (BELI, 2015).

Por meio da Figura 12, pôde-se observar que os mesmos doadores de elétrons se agruparam independente da relação  $DQO/SO_4^{-2}$ . Amostras dos reatores etanol 1 e etanol 2 apresentaram 68% de similaridade entre si, enquanto as amostras dos reatores lactato 1 e lactato 2 apresentaram 58% de similaridade e 32% de similaridade foi observada nos reatores alimentados com soro de leite 1 e soro de leite 2.

Quando comparam-se os clusters formados pelo mesmo doador de elétrons com o inóculo, observou-se uma similaridade de 32% para amostras provenientes dos reatores alimentados com etanol, 30% para os reatores alimentados com lactato e 16% quando se utilizou soro de leite.

Dessa forma, percebe-se que a comunidade bacteriana sofreu grandes impactos em função dos doadores de elétrons e da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  utilizada. Mesmo quando se compara o mesmo doador de elétrons, os índices de similaridades obtidos estiveram abaixo de 68%, indicando que cada sistema individualmente respondeu com o predomínio de uma comunidade microbiana específica, provavelmente, em função da adaptação bacteriana para cada condição imposta.

### 5.3.2 *Domínio Arqueia*

O DNA extraído das amostras foi amplificado com *primers* 1100F+GC e 1400R específico para *Domínio Arqueia* e o tamanho esperado dos produtos de PCR (300pb + GC) foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1.5%, conforme Figura 13. Por meio do perfil de bandas visualizadas no gel de DGGE, foi possível construir o dendrograma através do programa *Bionumerics*, que possibilitou a avaliação da riqueza de todos os diferentes reatores para o *Domínio Arqueia*, conforme Figura 14.



Figura 13 – Imagem do gel de agarose 1,5% . Amostras: I: Inóculo, E1: Etanol na relação DQO/Sulfato=1, E2: Etanol na relação DQO/Sulfato=2, L1: Lactato na relação DQO/Sulfato=1, L2: Lactato na DQO/Sulfato=2, S1: Soro de leite na relação DQO/Sulfato=1, S2: soro de leite na relação DQO/Sulfato=2, P: Padrão 100bp DNA Ladder.

Fonte: Da autora.

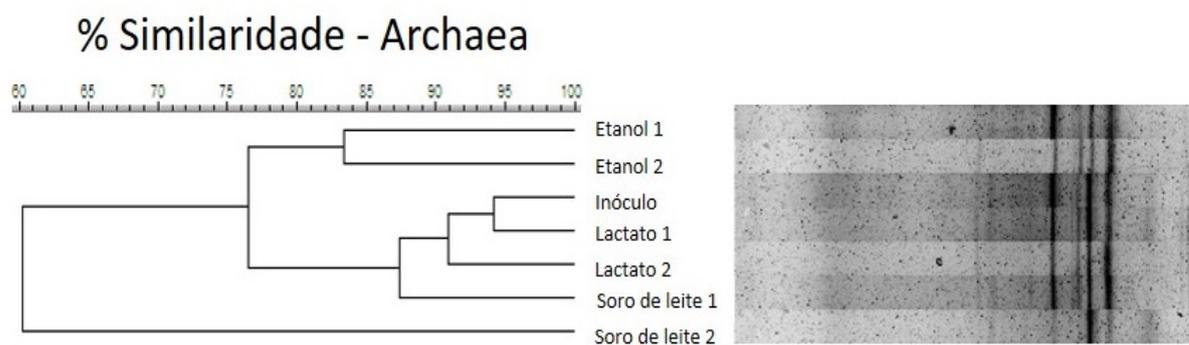


Figura 14 – Dendrograma e imagem negativa do gel de DGGE com gradiente desnaturante 50-65% para *Domínio Archaea*.

Fonte: Da autora.

Como pode-se observar na Figura 14, o dendrograma apresentou um cluster maior em que se observa um coeficiente de similaridade entre as amostras de aproximadamente 76%. De modo geral, a comunidade microbiana preexistente no inóculo sofreu alteração entre os diferentes reatores, porém, menor em comparação ao *Domínio Bactéria*. Pode-se observar que deste cluster predominante, formam-se dois agrupamentos distintos. O primeiro grupo corresponde as amostras etanol 1 e etanol 2, com aproximadamente 83 % de similaridade entre si, e o segundo grupo, pertencente ao inóculo, lactato 1, lactato 2 e soro de leite 1, apresentando 87% de similaridade. A amostra do soro de leite 2 apresentou o menor valor de similaridades entre as demais amostras (60%).

Comparando a riqueza do *Domínio Arqueia* e *Domínio Bactéria*, foi observado, neste estudo, que as amostras de *Bactéria* apresentaram maior riqueza microbiana que as amostras de *Arqueia*. Essa diferença resulta da maior resistência do último grupo a variações de parâmetros operacionais em função de uma grande diversidade metabólica, atributos bioquímicos e estruturais únicos (CARDOSO et al., 2003), ou ainda, a baixa riqueza obtida resulta da inabilidade dos sistemas propostos, neste trabalho, oferecerem condições de metabolismo e crescimento a este grupo.

### 5.3.3 Grupo das redutoras de sulfato

O DNA genômico total extraído e o tamanho dos produtos de PCR através dos primers DSRp2060F+GC e DSR4R para o grupo das redutoras de sulfato foram também confirmados por eletroforese em gel de agarose 1.5%, com tamanho esperado de 350 pb, conforme Figura 15. As amostras foram amplificadas por PCR do gene da enzima sulfito redutase dissimilatória da subunidade B *dsrB* e os produtos foram submetidos à análise de DGGE, conforme Figura 16.

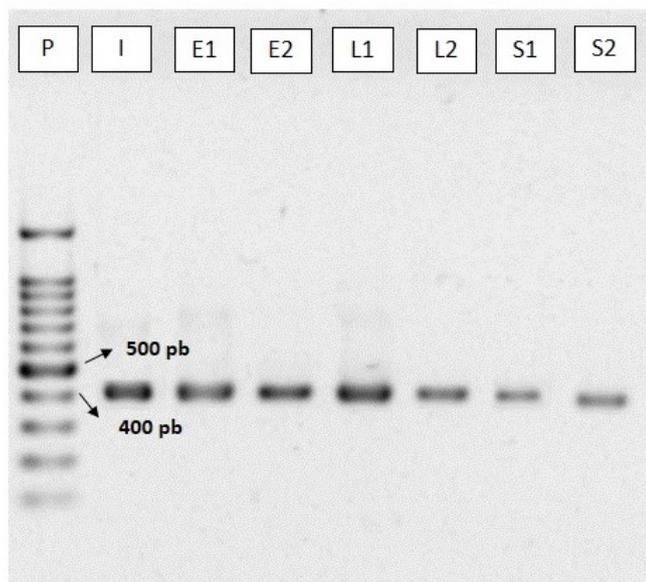


Figura 15 – Imagem do gel de agarose 1,5%. Amostras: I: Inóculo, E1: Etanol na relação DQO/Sulfato=1, E2: Etanol na relação DQO/Sulfato=2, L1: Lactato na relação DQO/Sulfato=1, L2: Lactato na DQO/Sulfato=2, S1: Soro de leite na relação DQO/Sulfato=1, S2: soro de leite na relação DQO/Sulfato=2, P: Padrão 100bp DNA Ladder.

Fonte: Da autora.

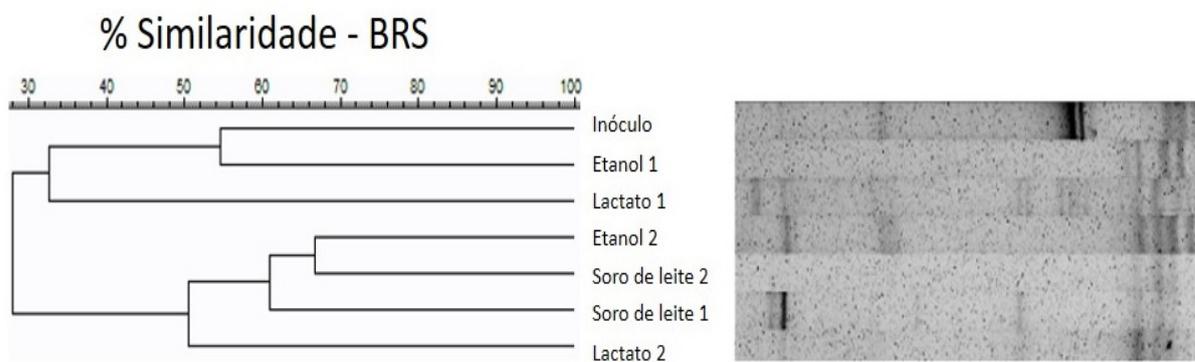


Figura 16 – Dendrograma e imagem negativa do gel de DGGE com gradiente desnaturante 40-60%.

Fonte: Da autora.

Baseado na Figura 16, grandes variações de similaridade entre as diferentes amostras foram observadas no grupo das sulfato redutoras. O resultado demonstrou dois grandes clusters, sendo o primeiro com o inóculo, etanol 1, lactato 1, e o segundo grupo, com etanol 2, soro de leite 1, soro de leite 2 e lactato 2. A similaridade entre esse dois clusters foi menor que 30%.

A biomassa do inóculo e etanol 1 apresentou-se 54% similar, enquanto que o lactato

1 foi 32% similar ao inóculo e etanol 1. Uma vez que o inóculo foi proveniente de reator sulfetogênico alimentado com etanol na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  de 1, eram esperadas maiores similaridades entre o inóculo e o reator com etanol 1.

No segundo cluster, a biomassa do etanol 2 foi 66% similar ao soro de leite 2. Enquanto que o reator soro de leite 1 foi 60 % similar ao etanol 2 e soro de leite 2. A amostra de lactato 2 demonstrou-se 50% similar ao etanol 2, soro de leite 2 e soro de leite 1.

Comparando-se os clusters com os valores de quantificação da população de BRS pela técnica de NMP, observou-se que o primeiro cluster é representado pelas biomassas provenientes dos reatores com maior presença de BRS viáveis, enquanto o segundo cluster, englobou as amostras com menores valores de Número Mais Provável de BRS, Figura 10.

De acordo com os dendrogramas de *Archaea*, *Bactéria* e o grupo das BRS, tem-se que as *Archaea* foram menos influenciadas pelas condições estabelecidas nos diferentes reatores, comparando-se com *Bactéria* e BRS, que sofreram grandes impactos na riqueza microbiana quando submetidos as diferentes relações  $DQO/SO_4^{-2}$  e doadores de elétrons.

## 5.4 Sequenciamento e identificação do gene *dsrB*

Para o estudo de sequenciamento e identificação das espécies de BRS presentes em cada reator, sete bandas foram recortadas do gel de DGGE do grupo das redutoras de sulfato, sendo uma banda representativa de cada reator e inóculo, Figura 17. As amostras foram identificadas como: I - Inóculo, E1 - Etanol na relação  $DQO/SO_4^{-2}=1$ , E2 - Etanol na relação  $DQO/SO_4^{-2}=2$ , L1 - Lactato na relação  $DQO/SO_4^{-2}=1$ , L2 - Lactato na relação  $DQO/SO_4^{-2}=2$ , CW1 - Soro de leite na relação  $DQO/SO_4^{-2}=1$ , CW2 - soro de leite na relação  $DQO/SO_4^{-2}=2$ .

Foram estimadas as concentrações de DNA de 30 ng/ $\mu$ l (I), 25 ng/ $\mu$ l (E1), 20ng/ $\mu$ l (E2), 25 ng/ $\mu$ l (L1), 10ng/ $\mu$ l (L2), 40 ng/ $\mu$ l (CW1) e 50 ng/ $\mu$ l (CW2). A concentração ideal para as amostras é 20 ng/ $\mu$ l, porém a banda 7 apresentou-se menos concentrada que o ideal, mas o sequenciamento foi realizado.

De acordo com a Tabela 15, todas as sequências foram identificadas na classe *Deltaproteobactera*, ordem *Desulfovibrionales*, com a maioria das sequências pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* e somente uma sequência pertencente ao gênero *Desulfacinum*. As espécies dominantes foram *Desulfovibrio carbinolicus*, *Desulfovibrio aerotolerans*, *Desulfovibrio burkinensis*, *Desulfovibrio fructosivorans*, *Desulfovibrio magneticus*, juntas com BRS não cultiváveis.

*Desulfovibrio* foi o gênero dominante em todos os reatores, que consistem com dados da literatura que citam resultados semelhantes em estações de tratamento de águas

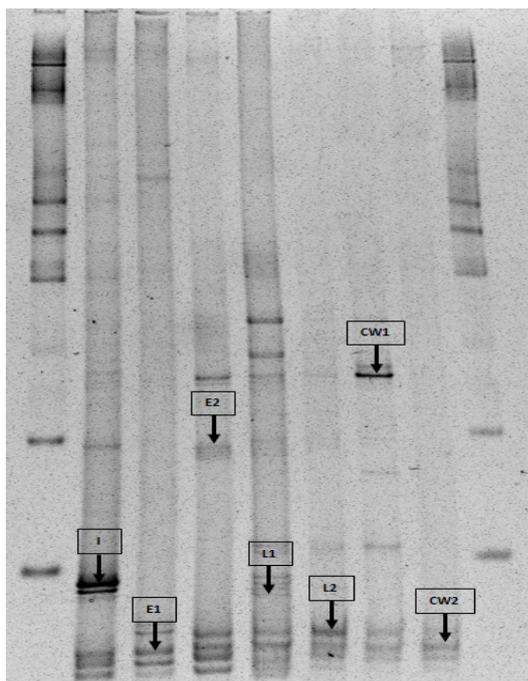


Figura 17 – Representação das bandas recortadas para sequenciamento. Amostras: I, P; Padrão low mass ladder.

Fonte: Da Autora.

Tabela 15 – Comparação das bandas sequenciadas utilizando o BLAST e a base de sequências do NCBI.

Bandas (N°. de Acesso)	Microrganismo mais próximo (N°. de Acesso)	Similaridade (Cobertura)	Filogenia
I (KX608993)	Uncultured bacterium clone RTdsrBU3F10 (KJ499233)	89 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
E1 (KX608994)	<i>Desulfovibrio carbinolicus</i> strain DSM 3852 (AY626026)	92 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Desulfovibrio aerotolerans</i> (AY749039)	92 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
E2 (KX608995)	Uncultured bacterium clone NTUA-2010-DSR47 (HQ640656)	99 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	98 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
L1 (KX608996)	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	98 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Desulfovibrio burkinensis</i> strain DSM 6830 (AF418186)	93 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Desulfacinum infernum</i> strain DSM 9756 (AF482454)	83 (81%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
L2 (KX608997)	Bacterium AMD.C1 (EU086051)	98 (99%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Desulfovibrio fructosivorans</i> JJ (AB061538)	99 (95%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Desulfovibrio magneticus</i> RS-1 DNA (AP010904)	94 (98%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
CW1 (KX608998)	<i>Olavius algarvensis</i> (DQ058667)	81 (79%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
CW2 (KX608999)	Uncultured bacterium clone P5_SRB (EU725475)	98 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Desulfovibrio aerotolerans</i> (AY749039)	92 (100%)	<i>Deltaproteobacteria</i>

Fonte: Da autora.

residuais (DAR; KUENEN; MUYZER, 2005). O gênero *Desulfovibrio* representa um grupo de gram-negativas das redutoras de sulfato e tem como característica a oxidação incompleta da matéria orgânica em todas as suas espécies (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000). Muitas espécies crescem por fermentação do piruvato a acetato e dióxido de carbono ou oxidação do etanol em acetato, mas apenas quando o hidrogênio é consumido pelas

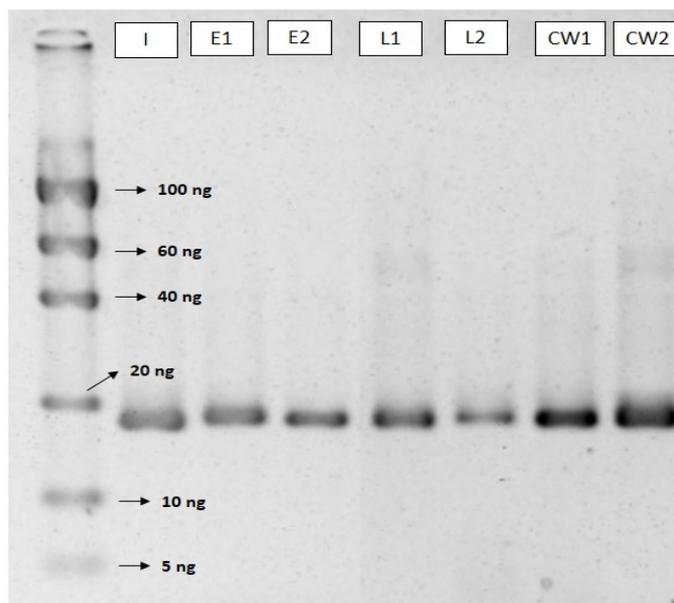


Figura 18 – Representação das bandas recortadas para sequenciamento.

Fonte: Da autora.

metanogênicas (MUYZER; STAMS, 2008).

A Tabela 15 demonstra a similaridade entre bandas recortadas do DGGE do gem *dsrB* e as sequências do GenBank. A banda I (inóculo) foi 89% similar a bactéria clone não cultivável encontrada em um processo de metilação de mercúrio em água da região de Everglades na Flórida. A banda E1 (etanol 1) foi 92% similar a *Desulfovibrio carbinolicus* e *Desulfovibrio aerotolerans*. *D. aerotolerans* foi a espécie dominante isolada a partir de um tubo positivo, da análise de NMP, utilizando uma amostra de lodo ativado. A banda E 2 (etanol 2) foi 99% similar a bactéria clone não cultivável NTUA-2010-DSR47, identificadas em estação de águas residuais de tratamento de efluentes ácidos (pH 3,5) de mineração e metalúrgicos, contendo etanol como único doador de elétrons.

A banda L1 (lactato 1) foi 93% similar a *Desulfovibrio burkinensis* e 83% similar a *Desulfacinum infernum*. O gênero *Desulfacinum* pode utilizar uma grande variedade de ácidos orgânicos e álcoois como doadores de elétrons e oxida-os completamente a  $CO_2$ . Os melhores resultados da operação dos diferentes reatores foram quando lactato foi o doador de elétrons na relação  $DQO/SO_4^{2-}$  igual a 1, e isto pode ser devido à presença de rotas de oxidação completa da matéria orgânica (YAMASHITA; YAMAMOTO-IKEMOTO, 2014).

A banda L2 (lactato 2) foi 99% similar a *Desulfovibrio fructosivorans*, uma espécie que difere de todas as outras espécies de BRS descritas pela capacidade de oxidar frutose e 94% similar a *Desulfovibrio magneticus*, uma espécie capaz de sintetizar intracelularmente partículas de magnetita (MOREAU; ZIERENBERG; BANFIELD, 2010). Curiosamente, *Desulfovibrio* têm sido tradicionalmente estudada para se determinar a

sua função na biocorrosão de metais, biorremediação de compostos tóxicos e recuperação de metais. Combinando a função de biorremediação do *Desulfovibrio* com um fenótipo magnético, poderia-se aumentar sua utilidade no tratamento de águas residuais com metais, melhorando a eficiência de remoção de metais (BYRNE et al., 2010).

As bactérias AMD.C1 isoladas a partir de drenagem ácida de minas (DAM) no Brasil apresentaram similaridade maior que 98%, comparadas com as BRS dos reatores operados com lactato e etanol (bandas E2, L1 e L2). Este clone foi caracterizado pela sua capacidade de redução de sulfato e de neutralização de pH para 5,5 (RAMPINELLI et al., 2008). A banda CW1 (soro de leite 1) foi 81% similar a *Olavius algarvensis*, espécie normalmente encontrada em sedimentos marinhos e que vive em simbiose com bactérias oxidante de enxofre quimioautotróficas. A semelhança filogenética e metabólica das comunidades simbióticas nesta espécie indicam que a sintrofia no ciclo de enxofre proporciona uma forte vantagem seletiva (RUEHLAND et al., 2008). A banda CW2 (soro de leite 2) foi 92% similar a *Desulfovibrio aerotolerans*.

Com os dados das sequências obtidas e as sequências dos microrganismos mais próximo, foi possível construir uma árvore filogenética utilizando o programa Mega 7.0, com o método Neighbor-Joining e modelo de substituição de nucleotídeos *maximum composite likelihood* Figura 19. Observa-se que a árvore não possui uma raiz não demonstrando o caminho evolutivo dos mesmos. Porém, demonstra a similaridade entre sequências.

A análise filogenética indicou dois clados principais, clado I com predomínio do gênero *Desulfovibrio* tornando próximos sequências das bandas E1, E2, CW2, L1, L2 juntamente com diferentes espécies do gene *drsB* publicadas no Genbank. A espécie *Desulfacinum infernum* do gênero *Desulfoacinum* apresentou-se mais distante do clado I e o clado II, porém apresentou 83% de similaridade com a sequência L1. O clado II englobou espécies que não foram classificadas em relação ao seu gênero.

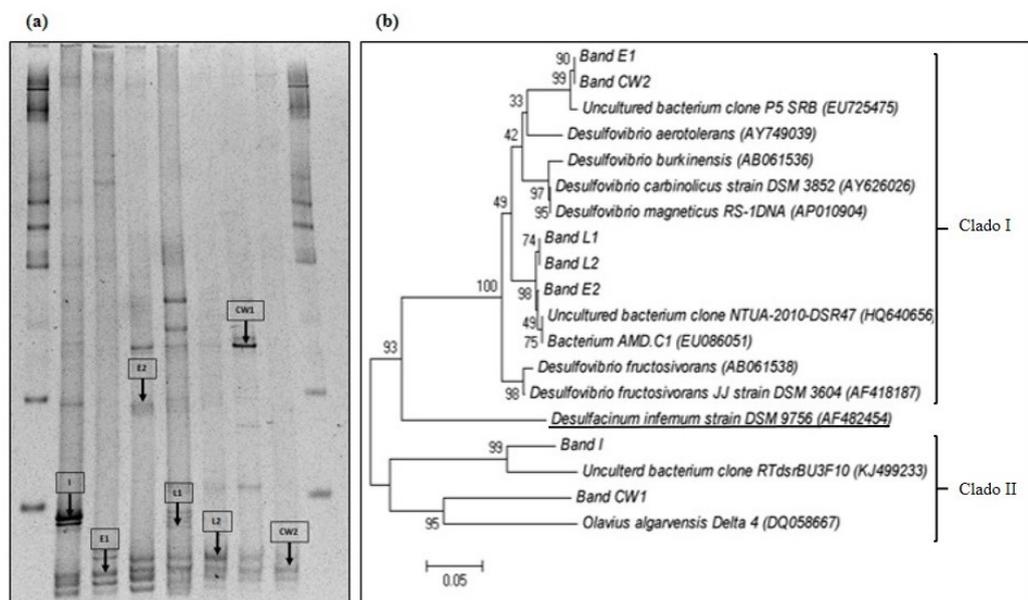


Figura 19 – (a) Imagem do DGGE com todas as bandas e bandas sequenciadas indicadas. (b) Árvore filogenética pelo método de distância *Neighbor-joining* demonstra relação entre gene *dsrB* e as seqüências referente ao GenBank. Nós representam valores de bootstrap para 1000 repetições. Barra de escala, 5 mutação por 100 nucleotídeos.

Fonte: Da autora.

## 6 SUGESTÕES

Através dos resultados obtidos, são recomendados as seguintes sugestões para trabalhos futuros.

- Utilização de outras fontes de inóculo para análise de via bioquímica.
- Para análise de quantificação de BRS por NMP, utilizar o meio próprio meio do reator para o meio de cultura.
- Na análise de DGGE, recomenda-se fazer em triplicata para garantir uma análise de qualidade e eliminar falhas da técnica.

## 7 CONCLUSÃO

Os parâmetros doadores de elétrons e relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foram aplicadas neste estudo e forneceram informações úteis sobre a eficiência da remoção de sulfato, população de BRS e riqueza microbiana em reatores utilizados no tratamento de águas residuárias ácidas ricas em sulfato. As principais conclusões estão apresentadas a seguir:

- As remoções de DQO e sulfato foram superiores a 68% e 73%, respectivamente, quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  empregada foi de 1,0, independentemente do doador de elétrons utilizado. Os reatores operados com lactato não sofreram influência da relação  $DQO/SO_4^{-2}$  e apresentaram remoções de sulfato superiores a 90%, mesmo na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  de 2,0. As menores taxas de remoção de sulfato (48% e 58%), foram observadas com a utilização de etanol e soro de leite, respectivamente, na relação  $DQO/SO_4^{-2}$  de 2,0;
- A população de BRS, na presença de etanol ou lactato, aumentou quando a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foi 1,0 e decresceu com a relação  $DQO/SO_4^{-2}$  foi 2,0. Para os reatores alimentados com soro de leite, houve redução da população de BRS nas duas relações  $DQO/SO_4^{-2}$  analisadas;
- A riqueza microbiana dos reatores avaliados foi maior para o *Domínio Bacteria* e grupo das BRS do que para o *Domínio Arqueia*. As similaridades no *Domínio Bacteria* estiveram entre 20 e 68% e no grupo das BRS, entre 30 e 60%, enquanto no *Domínio Arqueia* observou-se uma similaridade de 76% entre as condições estudadas;
- A análise filogenética do gene *dsrB* demonstrou a predominância do gênero *Desulfovibrio* para todos os doadores de elétrons e relação  $DQO/SO_4^{-2}$  e a presença do gênero *Desulfacinum*, exclusivamente no reator operado com lactato e relação  $DQO/SO_4^{-2}$  de 1,0.

# REFERÊNCIAS

- ACERBI, K. W. *Efeito do pH, relação DQO/Sulfato e fonte de carbono na biorremediação de drenagem ácida de minas sob condições ácidas em reator UASB*. 135 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) — Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2015. Citado na página 43.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 36.
- ATKINSON, T.; SHERWOOD, R. F. *Sulfate-Reducing Bacteria*. New York: Springer Science, 1995. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.
- BATTERHAM, R. The international network for acid prevention (INAP) addressing a global need. *The Australian Institute of Mining and Metallurgy*, 2003. Citado na página 17.
- BELI, E. *Estudo da diversidade microbiana em reator ASBR no tratamento da drenagem ácida de minas sintética sob diferentes condições operacionais*. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) — Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2015. Citado 4 vezes nas páginas 29, 30, 39 e 55.
- BYRNE, M. E. et al. Desulfovibrio magneticus rs-1 contains an iron-and phosphorus-rich organelle distinct from its bullet-shaped magnetosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 107, n. 27, p. 12263–12268, 2010. Citado na página 62.
- CAMILOTI, P. R. et al. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Wiley-Blackwell, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, oct 2013. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.
- CARDOSO, A. et al. Archaea: Potencial biotecnológico. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 30, p. 70–77, 2003. Citado na página 57.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, Elsevier BV, v. 445-446, p. 385–396, feb 2013. Citado na página 27.
- CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria1. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford University Press (OUP), v. 31, n. 1, p. 1–9, jan 2000. Citado 4 vezes nas páginas 22, 23, 24 e 60.
- CHERNICHARO, C. A. d. L. *Reatores anaeróbios*. Ufmg. Belo Horizonte-MG: DESA, 2007. v. 5. Citado na página 51.
- CHOUDHARY, R.; SHEORAN, A. 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. ISSN 0960-8524. Citado na página 25.

COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek*, Springer Science, v. 67, n. 1, p. 29–46, 1995. Citado na página 48.

COSTA, M. et al. Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage. *Chemosphere*, v. 75, n. 6, p. 831 – 836, 2009. ISSN 0045-6535. Citado na página 25.

CUNHA, M. P. *Tratamento biológico de drenagem ácida de minas (DAM) em reator anaeróbio de manta de lodo (UASB)*. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) — Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 44.

DAR, S. A.; KUENEN, J. G.; MUYZER, G. Nested pcr-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 71, n. 5, p. 2325–2330, 2005. Citado na página 60.

FAORO, H. *Determinação da Biodiversidade de Archaea e Bacteria da mata atlântica*. 183 p. Tese (Mestrado em Ciências Bioquímica) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Citado na página 28.

GILLAN, D. C. et al. Genetic diversity of the biofilm covering *montacuta ferruginosa* (mollusca, bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of pcr-amplified gene fragments coding for 16s rrna. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 64, n. 9, p. 3464–3472, 1998. Citado na página 39.

HAO, T. wei et al. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Research*, Elsevier BV, v. 65, p. 1–21, nov 2014. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 25.

HU, Y. et al. Effect of influent COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. *Chemosphere*, Elsevier BV, v. 130, p. 24–33, jul 2015. Citado na página 42.

ISA, Z.; GRUSENMEYER, S.; VERSTRAETE, W. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: microbiological aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 51, n. 3, p. 580–587, 1986. Citado na página 48.

JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen sulphide and effluent from anaerobic treatment: Effect of ph. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 165, n. 1, p. 759–765, 2009. Citado na página 27.

KAKSONEN, A. H.; FRANZMANN, P. D.; PUHAKKA, J. A. Effects of hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, Wiley-Blackwell, v. 86, n. 3, p. 332–343, 2004. Citado na página 48.

KAKSONEN, A. H. et al. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford University Press (OUP), v. 47, n. 3, p. 279–289, mar 2004. Citado 5 vezes nas páginas 18, 22, 26, 33 e 50.

- KALYUZHNYI, S.; FRAGOSO, C. D. L.; MARTINEZ, J. R. Biological sulfate reduction in a uasb reactor fed with ethanol as the electron donor. *Microbiology-AIBS-C/C of Mikrobiologia*, Plenum Publishing Corporation, v. 66, p. 562–567, 1997. Citado na página 46.
- LENS, P.; KUENEN, J. The biological sulfur cycle: Novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*, v. 44, n. 8, p. 57–66, 2001. Citado na página 21.
- LENS, P. et al. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Taylor & Francis, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998. Citado na página 17.
- LEWIS, A. E. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, Elsevier BV, v. 104, n. 2, p. 222–234, sep 2010. Citado na página 46.
- LI, Y.-Y.; LAM, S.; FANG, H. H. Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate. *Water Research*, Elsevier BV, v. 30, n. 7, p. 1555–1562, jul 1996. Citado na página 44.
- LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, Elsevier BV, v. 25, n. 5, p. 452–463, sep 2007. Citado 4 vezes nas páginas 18, 25, 26 e 53.
- MARTINS, M. et al. Biological sulphate reduction using food industry wastes as carbon sources. *Biodegradation*, Springer Science, v. 20, n. 4, p. 559–567, jan 2009. Citado na página 22.
- MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (abfsb) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. *Bioprocess Biosyst Eng*, Springer Science, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, jan 2014. Citado na página 21.
- MOCKAITIS, G. et al. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (asbr): effects of organic loading and supplemented alkalinity. *Journal of Environmental Management*, Elsevier, v. 79, n. 2, p. 198–206, apr 2006. Citado na página 27.
- MOREAU, J. W.; ZIERENBERG, R. A.; BANFIELD, J. F. Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (dsrab) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 76, n. 14, p. 4819–4828, 2010. Citado na página 61.
- MUYZER, G. Dgge/tgge a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, Elsevier, v. 2, n. 3, p. 317–322, 1999. Citado na página 30.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, may 2008. Citado 5 vezes nas páginas 17, 22, 28, 53 e 61.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C. D.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rna. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993. Citado na página 29.

- MYERS, R. M. et al. Nearly all single base substitutions in dna fragments joined to a gc-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 13, n. 9, p. 3131–3145, 1985. Citado na página 36.
- NAGPAL, S. et al. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: An experimental and modeling study. *Biotechnology and bioengineering*, Wiley Online Library, v. 70, n. 5, p. 533–543, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 43.
- NECULITA, C. M.; ZAGURY, G. J. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier BV, v. 157, n. 2-3, p. 358–366, sep 2008. Citado na página 21.
- NISHIO, S. R. *Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares—FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de cargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa*. 102 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Universidade de São Paulo, 2010. Citado na página 29.
- POL, L. W. H. et al. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, Springer, v. 9, n. 3-4, p. 213–224, 1998. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 47.
- POSTGATE, J. R. *The Sulfate-Reducing Bacteria*. 2nd. ed. [S.l.: s.n.], 1984. Citado 3 vezes nas páginas 11, 34 e 51.
- RAMPINELLI, L. et al. A sulfate-reducing bacterium with unusual growing capacity in moderately acidic conditions. *Biodegradation*, Springer, v. 19, n. 5, p. 613–619, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 62.
- REIS, M. A. M. et al. Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, Wiley-Blackwell, v. 40, n. 5, p. 593–600, aug 1992. Citado na página 51.
- RODRIGUEZ, R. et al. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier BV, v. 74, p. 48–53, oct 2012. Citado na página 21.
- RUEHLAND, C. et al. Multiple bacterial symbionts in two species of co-occurring gutless oligochaete worms from mediterranean sea grass sediments. *Environmental microbiology*, Wiley Online Library, v. 10, n. 12, p. 3404–3416, 2008. Citado na página 62.
- SAHINKAYA, E. et al. Sulfidogenic fluidized bed treatment of real acid mine drainage water. *Bioresource Technology*, Elsevier BV, v. 102, n. 2, p. 683–689, jan 2011. Citado na página 21.
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 1985. Citado na página 28.
- SAMPAIO, G. F. *Tratamento de água residuária ácida proveniente de mina utilizando soro de leite como doador de elétrons*. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) — Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 43.

- SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier BV, v. 269, p. 98–109, mar 2014. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 51.
- SKOOG, D. A. et al. *Fundamentos de química analítica*. 8. ed. [S.l.: s.n.], 2013. Citado na página 34.
- SOUSA, D. Z. et al. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford University Press (OUP), v. 60, n. 2, p. 252–265, may 2007. Citado na página 55.
- VICH, D. V. *Atividade metanogênica e comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina*. 91 p. Tese (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) — Universidade de São Paulo, 2006. Citado na página 28.
- VIEIRA, B. F. et al. The effect of acidic pH and presence of metals as parameters in establishing a sulfidogenic process in anaerobic reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 51, n. 10, p. 793–797, may 2016. Citado na página 43.
- VISSER, A.; POL, L. H.; LETTINGA, G. Competição de metanogênicas e bactérias sulfidogênicas. *Ciência e Tecnologia água*, IWA Publishing, v. 33, n. 3, 1996. Citado na página 48.
- WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms.*, John Wiley and Sons, p. 469–585, 1988. Citado na página 53.
- YAMASHITA, T.; YAMAMOTO-IKEMOTO, R. Nitrogen and phosphorus removal from wastewater treatment plant effluent via bacterial sulfate reduction in an anoxic bioreactor packed with wood and iron. *International journal of environmental research and public health*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 11, n. 9, p. 9835–9853, 2014. Citado na página 61.
- YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 70, n. 8, p. 4800–4806, 2004. Citado na página 30.
- ZHANG, M.; WANG, H.; HAN, X. Preparation of metal-resistant immobilized sulfate reducing bacteria beads for acid mine drainage treatment. *Chemosphere*, Elsevier, v. 154, p. 215–223, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 21.
- ZHOU, J.-M. et al. Performance of a haloalkaliphilic bioreactor and bacterial community shifts under different COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios and hydraulic retention times. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier BV, v. 274, p. 53–62, jun 2014. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 21.

# Anexos

# ANEXO A – PROTOCOLO EXTRAÇÃO - KIT PROMEGA *PURIFICATION*

1. Adicionar 0,5 mL da biomassa em um tubo de microcentrífuga *ependorff* de 1,5  $\mu$ L.
2. Centrifugar a 130 rpm por 2 minutos.
3. Remover o sobrenadante.
4. Adicionar 600  $\mu$ L de *Nuclei Lysis Solution*, homogeneizando com a pipeta lentamente para suspensão das células.
5. Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar as células.
6. Resfriar a temperatura ambiente.
7. Adicionar 3  $\mu$ L de RNase solution para o lisado afim de tirar a interferência do RNA. Fazer homogeneização invertendo devagar o tudo.
8. Incubar a 37° por 30 minutos.
9. Resfriar a temperatura ambiente.
10. Adicionar 200  $\mu$ L de *Protein Precipitation Solution* para o tubo contendo o lisado.
11. Colocar no vórtex a alta velocidade por 20 segundos para misturar a solução com a amostra.
12. Incubar em gelo por 5 minutos.
13. Centrifugar a 130 rpm por 3 minutos.
14. Em *ependorff* novo transferir 600  $\mu$ L de isopropanol.
15. Transferir 600  $\mu$ L do sobrenadante contendo o DNA para o *ependorff* novo contendo isopropanol. Obs: O isopropanol é mais polar que o DNA, assim o DNA não dilui no isopropanol, assim ocorre um precipitado.
16. Misturar gentilmente por inversão até que se forma uma massa de filamentos de DNA.
17. Centrifugar a 130 rpm por 2 minutos.
18. Cuidadosamente descartar o sobrenadante e drene o tubo em papel absorvente.

19. Adicionar 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para lavagem do DNA.
20. Centrifugar a 130 rpm por 2 minutos.
21. Retirar o sobrenadante com seringa e deixar que seque ao ar por 15 minutos.
22. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de DNA *Rehydration Solution* e reidratar o DNA pela incubação da solução *overnight* a 4°C, ou reidratar incubando a 65°C por uma hora.

# ANEXO B – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO - KIT PROMEGA *DNA* *CLEAN UP*

1. Com a seringa de 3 mL encaixar a coluna *wizard minicolumn*, utilizar um sistema (seringa + *wizard minicolumn*) para cada amostra.
2. Adicionar 1 mL de *Wizard DNA clean up resin* nas amostras e homogenizar gentilmente invertendo o tubo várias vezes.
3. Pipetar a solução (resina + DNA) no tambor da seringa sem o êmbolo. Inserir o êmbolo vagarosamente e gentilmente empurrar a seringa para filtragem em um béquer de descarte.
4. Destarrachar a *wizard minicolumn* da seringa e remover o êmbolo. Reatarrachar o tambor da seringa na *wizard minicolumn*.
5. Pipetar 2 mL de isopropanol 80% na seringa. Inserir o êmbolo e gentilmente empurrar a solução.
6. Remover a seringa e transferir a *wizard minicolumn* para um tubo *ependorf*.
7. Centrifugar o aparato (*ependorf+minicolumn*) a 111 rpm por 2 minutos para secagem da resina.
8. Transferir a *wizard minicolumn* para um novo *ependorf* de 1,5 mL. Aplicar 50 $\mu$ L de água ultra pura pré aquecida em 80°C e aguardar por 1 minuto.
9. Centrifugar a 111 rpm em 1 minuto para eluir o fragmento de DNA.
10. Remover e descartar *wizard minicolumn*. O DNA purificado deverá ser armazenado a 4°C ou -20°C.

# ANEXO C – PROCEDIMENTO PARA PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA- DGGE

1. Limpar as placas de vidro com álcool.
2. Montar as placas de vidro juntamente com a gaxeta, espaçador e os grampos.
3. Colocar o aparato no suporte (cassete), trocar os grampos, conectar a mangueira da bomba peristáltica e fixar a ponta com agulha ao sistema de placas de vidro.
4. Preparar 11,5 mL das soluções desnaturantes A e B.
5. Adicionar 80 $\mu$ L de APS 10% em cada solução.
6. Adicionar 5 $\mu$ L de TEMED em cada solução. Agite e seja rápido para não polimerizar (utilizar recipiente com gelo para colocar as soluções)
7. Transferir as soluções (A e B) para o formador de gradiente. Colocar o misturador sobre agitador magnético. Abrir o misturador e ligar a bomba peristáltica em velocidade média para permitir a mistura das soluções.
8. Após o término das soluções colocar o pente vertical e esperar solidificar por 60 minutos.
9. Retirar o pente e limpar os pocinhos retirando excesso da solução com auxílio de pipeta.
10. Carregar a cuba eletroforética com 21 L de TAE 0,5X. Ligar o aparelho para aquecimento de 60°C.
11. Colocar o cassete no aparato com o tampão já aquecido, tirar a gaxeta da parte inferior do gel.
12. Conectar a mangueira de fluxo do tampão no cassete.
13. Conectar plugs elétricos.
14. Carregar as amostras.
15. Ligar a fonte, programar a voltagem e o tempo de corrida.

16. Finalizada a corrida, desligar a cuba e a fonte. Retirar o cassete da cuba e retirar as placas do cassete.
17. Remover o gel, corar com Syber gold.

# ANEXO D – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO - PCR CLEAN UP SYSTEM

Este protocolo foi utilizado para produtos de PCR para sequenciamento.

1. Adicionar igual volume de *Membrane Binding Solution* para o produto de PCR e homogeneizar.
2. Insira a minicoluna no *Collection Tube* e adicionar a solução. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
3. Centrifugar a 140 rpm por 1 minuto.
4. Descartar o volume do *Collection Tube*, insira a minicoluna no *Collection Tube* novamente.
5. Adicionar 700 $\mu$ L de *Membrane Wash Solution* (já preparado com etanol).
6. Centrifugar a 140 rpm por 1 minuto.
7. Adicionar 500 $\mu$ L de *Membrane Wash Solution* (já preparado com etanol).
8. Centrifugar a 140 rpm por 5 minutos.
9. Descartar o volume do *Collection Tube*.
10. Centrifugar a 140 rpm por 1 minuto.
11. Cuidadosamente transfira a minicoluna para um *ependorf* de 1,5  $\mu$ L.
12. Adicione 50 $\mu$ L de *Nuclease-Free Water* para a minicoluna.
13. Centrifugar a 140 rpm por 1 minuto.
14. Descarte a minicoluna e armazene o DNA a  $-4^{\circ}\text{C}$  ou  $-20^{\circ}\text{C}$ .