

DANIEL FERNANDES NOVAES PIMENTA

**EFEITO DA FONTE EXTERNA DE CARBONO NA PARTIDA DE REATOR
UASB NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS**

Poços de Caldas - MG

2014

DANIEL FERNANDES NOVAES PIMENTA

**EFEITO DA FONTE EXTERNA DE CARBONO NA PARTIDA DE REATOR
UASB NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas. Orientador: Prof. Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno.

Poços de Caldas - MG

2014

DANIEL FERNANDES NOVAES PIMENTA

**EFEITO DA FONTE EXTERNA DE CARBONO NA PARTIDA DE REATOR
UASB NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINAS**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental

Aprovada em:

Prof. Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Cláudio Milton Montenegro Campos

Instituição: UFLA-MG

Assinatura

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais
Ao meu irmão
À minha pequena
Dedico.*

O Estímulo Interior e a Preservação da Natureza

As energias que atraímos e repulsamos, mesmo que às vezes num entrelaçamento incontrolável, nos permite diferenciar os ambientes que proporcionam bem estar e mal estar. Sensações de agitação ou tranquilidade são experimentadas a todo instante.

No elevado grau de entropia de uma paisagem degradada há repulsão. No baixo grau de entropia de uma floresta natural há paz.

Reações dinâmicas ocorrem sem um pré-processamento de informações. A liberação de adrenalina ou dopamina, a musculatura tensa ou relaxada, anticorpos, processos alérgicos, são instintos de sobrevivência que independem de nosso consentimento para se iniciarem. O que absorvemos ou adsorvemos da matéria e da energia que nos cerca, de forma instintiva, definirão o que somos capazes sentir e observar na paisagem.

Sistemas naturais buscam a eficiência energética e espacial, buscam a harmonia dos harmônicos e as soluções de alto rendimento. A natureza com sua beleza e complexidade despertará e está a despertar nossos sentimentos ligados à conservação do meio ambiente e a sobrevivência da espécie. Quando o quorum necessário de mentes preservacionistas for atingido, modificações coordenadas no comportamento acontecerão, configurando um sistema em quorum sensing.

Em cada quadro mental de paz e tranquilidade e nos ideais que busquem o amor e o fim das desigualdades, por mais individual e local que seja, estará modificando, para o bem, as relações dos seres humanos com a natureza...

Daniel Pimenta

*Uma gota de chuva
A mais, e o ventre grávido
Estremeceu, da terra.
Através de antigos
Sedimentos, rochas
Ignoradas, ouro
Carvão, ferro e mármore
Um fio cristalino
Distante milênios
Partiu fragilmente
Sequioso de espaço
Em busca de luz.
Um rio nasceu.*

(Vinicius de Moraes, 1954)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Presciliana, por todo o amor e dedicação. Por me mostrarem onde mora a bondade, o amor e a caridade.

Ao meu irmão Hugo, por toda amizade e companheirismo. Sempre torcendo pelo meu desenvolvimento. Tamo junto!

À minha amada, Paulinha. Por dividir comigo muitos momentos de alegria, amor, cantoria, arte, brincadeira e conhecimento.

Ao meu amigo Caião, sempre por perto nos momentos importantes.

Ao Thiago IQSC, peça fundamental na realização desse trabalho e no meu desenvolvimento. Muitas foram as noites tentando entender a sociedade, a vida, o *standard methods* e as bactérias sulfetogênicas.

Aos professores, pela experiência pessoal e profissional que me transmitiram. Ao meu orientador Prof. Leonardo Damasceno e ao meu coorientador Prof. Marcelo Zaiat, pela confiança e oportunidade. À professora Valéria Del Nery, por todos os conselhos.

A todos os amigos, técnicos e funcionários da UNIFAL e do LPB. Que me acolheram muito bem e permitiram que esse trabalho fosse realizado. Ao Claudio Junior, parceiro de reator. Aos amigos por todos os momentos de descontração. Ao Thiago cebola e o Paulo, amigos de UFV e EESC. Ao Rodrigo Rodrigues e ao Samuel, por todos os momentos sérios e de descontração. Mais do que um título, levo amigos dessa empreitada.

Ao meu violão e a música.

...

A todos que passaram e estão passando pela minha vida nos mais diversos planos espirituais.

RESUMO

A drenagem ácida de mina (DAM) é um dos passivos ambientais da indústria de extração de minério, potencialmente poluidora das águas superficiais, subterrâneas e do solo. O efluente proveniente da DAM tem origem na exposição de minerais sulfetados, principalmente pirita, a condições atmosféricas capazes de oxidar estes minerais e gerar soluções ricas em sulfato e com baixo pH. Este efluente é capaz de lixiviar metais pesados presente nos corpos geológicos e amplificar o grau poluidor associado à geração da drenagem. O tratamento físico-químico proposto para remediar o problema e amplamente difundido nas mineradoras envolve a aplicação de grandes quantidades de cal hidratada ou virgem, para neutralizar a drenagem e precipitar os metais presentes, um procedimento oneroso e que envolve gastos com produtos químicos e disposição adequada do material precipitado. Neste contexto, surge a demanda pelo estudo e desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento da DAM. A utilização de processos anaeróbios de tratamento, com bactérias redutoras de sulfato, possibilita a remoção do sulfato, a elevação do pH e a precipitação dos metais, a partir do sulfeto biogênico produzido. O presente trabalho avaliou qual dentre as fontes de carbono, acetato, etanol e lactato, seria a mais adequada para a partida de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (*upflow anaerobic sludge blanket* - UASB) tratando drenagem ácida sintética, visando uma eficiente remoção dos metais presentes (ferro, cobre e zinco). O reator alimentado com etanol foi o único capaz de tratar a drenagem e estabilizar a remoção de sulfato, com eficiências maiores que 90%, em 55 dias de operação, e remover em termos médios, 96,0% do cobre; 98,4% do zinco e 86,4% do ferro presente. O reator alimentado com lactato, após uma longa fase de aclimação, cerca de 55 dias, produziu sulfeto em condições capazes de remover o cobre e o zinco, contudo, após um período 45 dias, a rota metabólica sulfetogênica não mais foi observada, e o lactato passou a ser preferencialmente e somente fermentado. O reator alimentado com acetato, não foi capaz de utilizar a fonte de carbono, e sofreu com o efeito desacoplador do ácido acético, levando as células da biomassa a um colapso, promovendo a desestruturação dos grânulos inoculados e crescimento de fungos.

Palavras-Chave: tratamento biológico; UASB; drenagem ácida de mina; conversão biológica de sulfato; bactérias redutoras de sulfato.

ABSTRACT

Acid mine drainage (AMD) is one of the environmental liabilities of ore mining industries which generate the pollution of surface water, groundwater and soil. The effluent from AMD stems from the exposure of sulfide minerals – mainly pyrite – to atmospheric conditions which oxidize this mineral generating rich sulfate solutions and low pH. This effluent can leach heavy metals that are found in geological bodies, and amplify the polluting degree which is associated to the drainage generation. The physical-chemical treatment widespread in mining that has been proposed to remedy the problem applies large amounts of hydrated lime or quicklime in order to neutralize drainage and precipitate metals – a costly procedure that involves spending on chemicals and appropriate disposal of the precipitated material. In this context, there is a demand for the study and development of new technologies for the treatment of AMD. The use of anaerobic treatment processes with sulfate-reducing bacteria enables the removal of sulfate, the higher pH, and the precipitation of metals from biogenic sulfide production. This study evaluated which of the sources carbon, i.e. acetate, ethanol, and lactate would be the most suitable to start-up a UASB reactor (upflow anaerobic sludge blanket) treating synthetic acid drainage, so that it could efficiently remove metals (iron, copper, and zinc). The reactor that was fed with ethanol was the only one that could treat drainage and stabilize the sulfate removal: efficiency was higher than 90% in 55 days of operation; removal was on average of: 96.0% of copper; 98.4% of zinc and 86.4% of iron. The reactor that was fed with lactate – after a long period of acclimatization, about 55 days – produced sulfide in conditions capable of removing copper and zinc, however after a period of 45 days the sulfide metabolic pathway was not observed, and lactate became fermented. The reactor that was fed with acetate was not able to use the carbon source. At low pH, acetate acts as an uncoupler of the cell membrane, which led biomass cells to collapse, promoting the disintegration of the inoculated granules and fungal growth.

Keywords: Biological treatment; UASB; Acid mine drainage; Sulfide biological conversion; Sulfide reducing bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 Representação esquemática do aparato experimental.	27
Figura 4.2 Foto dos reatores UASB instalados em câmara de controle de temperatura.	28
Figura 5.1 Demanda química de oxigênio (DQO) e sulfato, afluente e efluente do reator alimentado com acetato.	33
Figura 5.2 Sulfeto total dissolvido no efluente do reator alimentado com acetato..	34
Figura 5.3 Potencial de hidrogênio (pH) afluente e efluente do reator alimentado com acetato..	34
Figura 5.4 Distribuição das espécies de acetato em função do pH..	35
Figura 5.5 Composição do biogás no <i>headspace</i> do reator alimentado com acetato..	35
Figura 5.6 Estrutura dos grânulos coletados no reator alimentado com acetato.	37
Figura 5.7 Fotos dos reatores após 91 dias de operação, reatores alimentados com acetato (R1), etanol (R2) e lactato (R3), da esquerda para direita, respectivamente (A). Em destaque o material viscoso que envolveu os grânulos no reator alimentado com acetato (B)..	37
Figura 5.8 Observações morfológicas por microscopia de contraste de fase, referentes a amostras coletadas do material viscoso encontrado na parte inferior da biomassa: (A) hifa; (B) emaranhado de hifas.	38
Figura 5.9 Demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com etanol.	39
Figura 5.10 Eficiência de remoção de matéria orgânica em função da demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com etanol.	40
Figura 5.11 Concentrações de sulfato e sulfeto total dissolvido efluente ao reator alimentado com etanol.	41
Figura 5.12 Eficiência de remoção de sulfato no reator alimentado com etanol..	41
Figura 5.13 Potencial de hidrogênio (pH) afluente e efluente do reator alimentado com etanol.	42
Figura 5.14 Concentração de ácido acético efluente do reator alimentado com etanol.	42
Figura 5.15 Alcalinidade total efluente do reator alimentado com etanol..	43
Figura 5.16 Relação entre os mols de sulfato e etanol utilizado no reator alimentado com etanol. A linha no gráfico representa a estequiometria de consumo de sulfato por mols de etanol (reação 5.2.2.1).	45
Figura 5.17 Relação entre os mols de etanol utilizado e acetato efluente do reator alimentado com etanol. A linha no gráfico representa a média das relações, Δ acetato/ Δ EtOH, na fase II.	45
Figura 5.18 Composição do biogás no <i>headspace</i> do reator alimentado com etanol..	47
Figura 5.19 Composição percentual do biogás no <i>headspace</i> do reator alimentado com etanol.	48
Figura 5.20 Eficiências de remoção de zinco, cobre e ferro.	49
Figura 5.21 Solubilidade dos sulfetos metálicos de cobre, zinco e ferro em função do pH..	50
Figura 5.22 Fração molar das espécies de sulfeto em função do pH..	51
Figura 5.23 Porcentagens de sulfeto de hidrogênio e hidrogenossulfeto no efluente do reator alimentado com etanol.	52
Figura 5.24 Porcentagem da DQO utilizada para redução de sulfato e para a produção de metano no reator alimentado com etanol..	54
Figura 5.25 Demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com lactato.	56

Figura 5.26 Eficiência de remoção de matéria orgânica em função da demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com lactato.....	57
Figura 5.27 Concentrações de sulfato afluente e efluente ao reator alimentado com lactato.	58
Figura 5.28 Concentrações de sulfato e sulfeto total dissolvido efluente ao reator alimentado com lactato.	58
Figura 5.29 Distribuição das espécies de lactato em função do pH.....	59
Figura 5.30 Potencial de hidrogênio (pH) afluente e efluente do reator alimentado com lactato.	60
Figura 5.31 Concentração de ácido acético e propiônico no efluente do reator alimentado com lactato.	61
Figura 5.32 Concentração de ácido acético e butírico no efluente do reator alimentado com lactato.	61
Figura 5.33 Possíveis rotas oxidativas e fermentativas do lactato.....	62
Figura 5.34 Relação entre o consumo de lactato e o somatório dos ácido produzidos, no reator alimentado com lactato. A linha no gráfico representa a média das relações, Δ lactato/ \sum Ácidos, na fase II.....	64
Figura 5.35 Eficiências de remoção de zinco, cobre e ferro no reator alimentado com lactato.....	65
Figura 5.36 Concentração de metano e gás carbônico no <i>headspace</i> do reator alimentado com lactato.....	67
Figura 5.37 Concentração de gás sulfídrico no <i>headspace</i> do reator alimentado com lactato..	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Energia livre da reação de redução de sulfato para diferentes doadores de elétrons.	24
Tabela 4.1 Constituintes do afluente.	29
Tabela 5.1 Estatística descritiva do tempo de detenção hidráulica dos reatores 1,2 e 3.	32
Tabela 5.2 Estatística descritiva da relação DQO/SO ₄ ²⁻ afluente aos reatores 1, 2, e 3.	32
Tabela 5.3 Valores de energia livre e Km aparente para a metanogênese e a sulfetogênese.	46
Tabela 5.4 Caracterização do afluente de efluente do reator alimentado com etanol e os padrões de lançamento.	55
Tabela 5.5 Concentrações médias dos ácidos, acético, propiônico e butírico (mg L ⁻¹), e suas constantes de dissociação, em termos logarítmicos (pKa).	60
Tabela 5.6 Reações possíveis de redução do sulfato no reator alimentado com lactato.	62
Tabela 5.7 Concentrações médias dos metais (mg L ⁻¹) e a eficiência média de remoção (%) no reator alimentado com lactato.	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Caracterização da atividade mineradora	16
3.2	Drenagem ácida de minas	16
3.3	Fundamentos da digestão anaeróbia	18
3.3.1	Aspectos gerais.....	18
3.3.2	Fatores que influenciam na digestão anaeróbia	20
3.4	O ciclo do enxofre e as bactérias redutoras de sulfato	22
3.5	Tratamento biológico de drenagem ácida de minas	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Reator UASB.....	27
4.1.1	Inóculo.....	28
4.1.2	Fontes de carbono e água residuária.....	28
4.2	Análises físico – químicas	29
4.3	Métodos estatísticos.....	31
4.4	Partida e operação.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	Condições operacionais	32
5.2	Partida dos reatores.....	33
5.2.1	Reator 1	33
5.2.2	Reator 2	39
5.2.3	Reator 3	56
6	CONCLUSÕES.....	68
7	SUGESTÕES	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A exposição de minerais sulfetados às condições atmosféricas, por ações antrópicas ou naturais, proverá a oxidação dos sulfetos e a subsequente geração de soluções ácidas ricas em sulfatos, denominada drenagem ácida de minas (DAM). A geração da drenagem e os problemas ambientais associados estão relacionados às atividades minerárias, que via de regra, estão localizadas em áreas com elevada concentração de metais pesados. Assim, além de sua acidez intrínseca, a DAM apresenta também elevado potencial poluidor pela possibilidade de lixiviação destes metais e o risco de contaminação ambiental.

As práticas mitigadoras de drenagem ácida visam à diminuição da oxidação dos minerais sulfetados, a imobilização dos produtos desta oxidação e a neutralização da acidez gerada. O tratamento comumente aplicado a estes efluentes é realizado pela aplicação de um agente químico neutralizante para a correção do pH e a precipitação dos metais em solução (geralmente cal hidratada ou cal virgem). Os elevados custos com produtos químicos e a disposição dos materiais precipitados são gargalos desse processo e estimulam novas pesquisas na área.

A busca por novas alternativas para correção do pH e recuperação dos metais lixiviados têm direcionado a pesquisa por novas tecnologias, entres estas, destaca-se a possibilidade de tratamento e recuperação por via biológica. A prevalência das bactérias redutoras de sulfato (BRS) em reatores anaeróbios tem apresentado bons resultados no tratamento de DAM, esta prevalência pode ser estimulada por meio da definição de estratégias operacionais adequadas e baseadas em estudos sobre a partida dos reatores, a cinética das reações e a fonte externa de carbono. Estudos relativos a esta área de tratamento demonstram a viabilidade de reatores anaeróbios na biorremediação de DAM (KIM, *et al.* 2013; RODRIGUEZ, *et al.* 2012).

Neste contexto, o presente trabalho se propõem a estudar, em escala de bancada, a partida de três reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*) alimentados com diferentes fontes externas de carbono, propostos para tratarem uma drenagem ácida sintética, visando aperfeiçoar a estratégia de partida e a definição de uma melhor fonte de carbono para a alimentação dos reatores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é investigar o efeito de diferentes fontes externas de carbono (lactato, acetato e etanol), na partida de reatores UASB, aplicados ao tratamento passivo de DAM.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a fonte de carbono mais adequada para a partida de um processo de biodessulfatação na relação DQO/sulfato igual a 2,0, no tratamento de drenagem ácida sintética de minas (DASM);
- Avaliar a eficiência de remoção dos metais presentes em drenagem ácida sintética de mina, pelo sulfeto biogênico produzido nos reatores com diferentes fontes externas de carbono.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Caracterização da atividade mineradora

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de minério, com uma produção mineral em franco crescimento. A mineração é uma das principais atividades econômicas e contribui diretamente para o desenvolvimento econômico do país. Em 2011 a produção mineral brasileira movimentou 51 bilhões de dólares e gerou cerca de 2,2 milhões de empregos diretos (IBRAM, 2012).

Contudo, a mineração provoca graves alterações no meio ambiente, sendo considerada uma das atividades mais impactantes de origem antrópica. A geração de rejeitos e a exposição de minerais confinados as condições atmosféricas, inerentes a essa atividade, são potenciais geradores de impactos negativos sobre as águas superficiais e subterrâneas, a vegetação e o solo. Necessitando assim, de uma gestão adequada dessas áreas, que devem ser licenciadas pelos órgãos ambientais estaduais e federais.

Dentre as atividades potencialmente poluidoras e utilizadoras de recursos ambientais, a extração e tratamento de minerais é considerada de alto grau poluidor e o licenciamento ambiental das áreas a serem exploradas é obrigatório e regulamentado pela Lei 6.938/81 e pelas Resoluções CONAMA nº 001/86 e nº 237/97.

A respeito da recuperação de áreas degradadas, a Constituição Federal de 1988 (Art. 225 § 2º) estabelece a obrigatoriedade de recuperação destas áreas e o decreto Nº 97.632 de 1989 (Art.3), a obrigatoriedade das empresas mineradoras apresentarem o Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD).

As resoluções CONAMA 430/11 e 357/05 também versam sobre estas questões ao estabelecer os padrões e as condições de lançamento de efluentes no meio ambiente. Portanto, o minerador tem a obrigação de implantar o plano de recuperação de área degradada e adequar o efluente proveniente das suas atividades antes de realizar o lançamento do mesmo.

Neste contexto, a geração de drenagens ácidas pelas mineradoras é um dos efluentes potencialmente poluidores e um passivo ambiental a ser minimizado.

3.2 Drenagem ácida de minas

As atividades associadas à mineração, como o revolvimento do solo, o desmonte de rocha e a geração de estéril e rejeito, principalmente em minas a céu aberto, expõe elementos

que não estavam expostos as condições intempéricas locais, acelerando o processo de mobilização desses elementos. Um problema comum, associado a esta atividade é a geração de drenagem ácida, que ocorre devido à liberação de acidez pelo processo de oxidação espontânea de corpos geológicos. A ocorrência de drenagem ácida tem sido relatada principalmente na extração de ouro, carvão, cobre, zinco e urânio, onde os sulfetos metálicos são predominantes (MELLO *et al.*, 2003).

A exposição de minerais sulfetados ao oxigênio e a umidade proverá as condições necessárias para oxidação deste material e a produção de soluções ácidas ricas em sulfatos, denominadas de DAM, que levam a produção de ácido sulfúrico, queda do pH, aumento da solubilidade e do risco de lixiviação de metais pesados (ANAWAR, 2013; SHEORAM, 2010; MELLO *et al.*, 2003).

Os bissulfetos de ferro são os principais geradores da drenagem ácida, e estes são encontrados em abundância em uma vasta gama de condições geológicas, nas formas de pirita (o mais abundante mineral de sulfeto), marcassita, arsenopirita e calcopirita (MELLO *et al.*, 2003). A exposição destes minerais, principalmente por meio das atividades de mineração, acarretará na geração espontânea da DAM no interior da cava da mina ou em sistemas de deposição de estéril ou rejeito.

A oxidação da pirita produz inicialmente Fe^{2+} , sulfato e íons H^+ em solução, que promovem o encadeamento de outras reações químicas, segundo os equilíbrios abaixo apresentados (AKCIL e KOLDAS, 2006).



A reação 2 é considerada a fase limitante da geração da DAM por ocorrer lentamente em ambiente abiótico. No entanto, a reação pode ter sua velocidade de reação aumentada por meio de catalisadores biológicos, mais especificamente por um grupo de bactérias acidófilas, que ocorrem naturalmente e são capazes de oxidar os compostos de enxofre e o íon ferroso. O grupo de maior representatividade dessa biota acidófila são as pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus*, com destaque para as bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que oxidam o ferro e a *Acidithiobacillus thiooxidans*, que oxidam o enxofre (GLEISNER, 2006).

Em ambiente ácido ($\text{pH} < 3$), o equilíbrio da reação 3.2.3 é deslocado no sentido dos reagentes, aumentando assim a disponibilidade de Fe^{3+} no meio, que irá atuar como o principal oxidante da pirita (3.2.4), este processo torna-se auto-propagante no momento em que o Fe^{2+}

passa a ser reoxidado a Fe^{3+} (3.2.2). O processo em que o oxigênio é o agente oxidante são gerados 2 moles de H^+ para cada mol de pirita (3.2.1), em contraste, na reação 3.2.4 são gerados 16 moles de H^+ por mol de pirita (ASSIS, 2006 ; SILVA *et al.*,2011).



O crescimento das bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans* em ambiente anaeróbio já foi observado e é possível graças à oxidação de compostos de enxofre ou hidrogênio acoplados a redução do íon férrico (OHMURA *et al.*, 2002). Fato este, especialmente importante para o tratamento da DAM por meio de geomantas, devido às possibilidades destas bactérias se manterem ativas mesmo em ambientes com cobertura natural ou artificial.

Devido às baixas concentrações de oxigênio dissolvido na DAM, e ao efeito auto-propagante de oxidação da pirita pelo Fe^{3+} , o ferro encontra-se predominantemente em sua forma iônica bivalente como Fe^{2+} (ALCIL e KOLDAS, 2006).

3.3 Fundamentos da digestão anaeróbia

3.3.1 Aspectos gerais

Os processos de degradação de compostos orgânicos na ausência de oxigênio, denominados por processos anaeróbios, ocorrem por meio da fermentação e da respiração metabólica. Na ausência de um aceptor de elétrons o processo oxidativo ocorre pela via fermentativa e na presença de um aceptor ocorre pela respiração, que promove a redução de compostos como SO_4^{2-} ; CO_2 e NO_3^- . Conhecer os subprodutos dessa oxidação é de suma importância para compreensão, operação e ajuste dos processos anaeróbios de degradação.

Em sistemas anaeróbios grande parte da matéria orgânica biodegradável é convertida em biogás. Onde cerca de 70 a 90% dos compostos orgânicos são removidos do reator pela fase gasosa e apenas uma pequena parcela é convertida em biomassa, reduzindo assim a produção de lodo no sistema. Estes são aspectos inerentes ao processo e representam uma vantagem sobre os tratamentos aeróbios, que geram e necessitam dispor grandes quantidades de lodo (CHERNICHARO, 2007).

A digestão anaeróbia é realizada por diferentes e especializados grupos de microrganismos. As etapas de degradação da matéria orgânica são sequenciais e há interdependência entre estas, podendo ser divididas em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a hidrólise e a fermentação da matéria orgânica complexa (polímeros) em material orgânico simples (monômeros). Onde ocorre a conversão de carboidratos, proteínas e lipídios em açúcares, aminoácidos e ácidos graxos voláteis, e a produção de hidrogênio, gás carbônico e

biomassa. Estes materiais orgânicos simples são então convertidos em ácidos orgânicos por bactérias fermentativas acidogênicas (FORESTI *et al.*, 1999).

Na segunda parte do processo ocorre a conversão dos produtos da primeira etapa em metano, sulfeto e gás carbônico. Este processo é realizado pelas arqueias metanogênicas, que produzem CH_4 e CO_2 e pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) que produzem H_2S e CO_2 .

Estas duas etapas genéricas podem ser subdivididas de acordo com as características dos grupos de microrganismos envolvidos e pelas substâncias consumidas e produzidas por estes. Quatro fases podem ser observadas: i) hidrólise e acidogênese; ii) acetogênese; iii) metanogênese; iv) sulfetogênese.

O processo de hidrólise dos polímeros a monômeros é realizado por exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas. Fase esta, essencial para produção de moléculas menores e capazes de traspasarem pela membrana celular das bactérias. Os produtos solúveis da hidrólise são metabolizados no interior das células de bactérias fermentativas e então transformados e excretados na forma de ácidos voláteis, aminoácidos e álcoois. Nesta parte acidogênica, na qual se gera os ácidos a partir dos compostos solúveis da hidrólise, uma série de microrganismos participa do processo, sendo a maioria deles anaeróbios estritos e alguns anaeróbios facultativos, sendo estes últimos essenciais para o controle do oxigênio nos reatores anaeróbios (CHERNICHARO, 2007).

A fase acetogênica é realizada por um grupo de bactérias responsáveis por converter os ácidos da fase anterior em acetato e hidrogênio, produtos essenciais para a produção de metano pelas arqueias metanogênicas na fase metanogênica, sendo esta fase uma das etapas finais do processo de remoção da matéria orgânica por meio da produção de gás carbônico e metano.

No processo de redução de sulfato a sulfeto na fase sulfetogênica, a produção de sulfeto é tida com indesejável na maioria dos processos, pois além de produzir odor e corrosão nos sistemas de tratamento, tem efeito tóxico para as arqueias metanogênicas e as BRS. Ademais, as BRS competem por substrato (acetato e hidrogênio) com as arqueias metanogênicas e interferem na eficiência da rota metanogênica, reduzindo a produção de metano nos sistemas que buscam estimular tal rota.

3.3.2 Fatores que influenciam na digestão anaeróbia

Temperatura

A digestão anaeróbia é influenciada diretamente pela temperatura. Aspecto físico que afeta o crescimento microbiano, a seleção de espécies no reator, as taxas de reação enzimática e a difusão do substrato. Para a maioria dos processos biológicos, podem ser admitidas de maneira generalista, três faixas de temperatura associadas ao crescimento microbiano: a faixa psicrófila (4 a 15°C), a faixa mesófila (20 a 40°C) e a faixa termófila (45 a 70°C) (CHERNICHARO, 2007).

A faixa mesófila tem sido amplamente utilizada em trabalhos em escala real, visto que os gastos com energia para manter os reatores em temperaturas superiores a 45°C eleva os custos operacionais do sistema de tratamento. Tratamentos na faixa psicrófila não são usuais, devido à baixa atividade microbiana nessas condições, o que a princípio inviabiliza o tratamento. Contudo, o potencial da biomassa psicrófila não deve ser subestimado, pois podem ocorrer adaptações no decorrer da operação (LETTINGA *et al.*, 2001).

Embora a manutenção da temperatura do sistema incorra em mais custos operacionais, manter uma temperatura uniforme dentro dos reatores é de fundamental importância, devido ao fato dos sistemas anaeróbios serem sensíveis a variações bruscas de temperatura, que podem levar a um desbalanceamento das populações microbianas e por consequência uma queda na eficiência do processo de tratamento (CHERNICHARO, 2007).

Alcalinidade, pH e ácidos voláteis

O equilíbrio das reações bioquímicas, principalmente em ambientes anaeróbios, onde as reações são sequenciais, ou seja, há uma interdependência entre os compostos intermediários das reações e o produto final, o conhecimento do equilíbrio ácido-base é imprescindível para o sucesso do tratamento. Parâmetros como pH, alcalinidade e ácidos voláteis permitem controlar a operação dos reatores e compreender como sistema está funcionando.

A capacidade do sistema em promover o tamponamento do meio e de neutralizar os ácidos produzidos durante a degradação anaeróbia é de fundamental importância para manter o equilíbrio do processo, a fim de evitar variações no pH e um possível acúmulo de ácidos. O monitoramento dos ácidos voláteis e da alcalinidade, permite prever variações no equilíbrio ácido-base de forma mais eficiente que a simples aferição do pH, pois pequenos abaixamentos

no pH podem representar um elevado consumo da alcalinidade e uma diminuição da capacidade de tamponamento do meio.

Variações bruscas no pH, denominadas de choque de pH, podem influenciar negativamente o processo de digestão, principalmente ao modificar as estruturas proteicas de muitas enzimas sintetizadas pelos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia. Outro ponto a ser considerado é o efeito do pH sobre a toxicidade de diferentes compostos. Estabelecer um pH adequado para o processo de digestão anaeróbia é fundamental para reduzir a toxicidade (RAJAGOPAL *et al.*, 2013).

Outro aspecto inerente a estes parâmetros é a manutenção de um pH ótimo de crescimento bacteriano. Os sistemas anaeróbios são considerados sensíveis a variações e o crescimento ótimo dos microrganismos ocorre em uma faixa estreita de pH, que varia de 6,0 a 8,0 e é função do tipo de microrganismo e de substrato (FORESTI *et al.*, 1999).

Nutrientes

Os organismos precisam de nutrientes para síntese de moléculas e suprimento de energia. O crescimento dos microrganismos depende de diferentes tipos e quantidades de nutrientes, sendo estes classificados em função da demanda requerida, em macro e micronutrientes. Uma maneira de avaliar o requisito nutricional é estimando a concentração de biomassa no reator, o coeficiente de produção celular e a concentração dos nutrientes na célula (LETTINGA, 1995).

Dentre os macronutrientes demandados, destaca-se o nitrogênio e o fósforo, essenciais para todos os processos biológicos, e o enxofre, fundamental para a síntese de proteína e requerido em quantidades iguais ou superiores as concentrações de fósforo (FORESTI *et al.*, 1999). Em sistemas anaeróbios a relação DQO:N:P de 500:5:1 foi classificada como suficiente para atender as necessidade macro nutricionais dos microrganismos anaeróbios (FORESTI *et al.*, 1999).

Já a definição da demanda de micronutrientes, como ferro, cobalto, níquel e o molibdênio, é uma tarefa difícil na prática, dentre outros motivos, pela presença de sulfeto, que leva a precipitação destes elementos na solução, fazendo com que as concentrações em equilíbrio sejam muito baixas. Contudo, vários destes micronutrientes são necessários para manter o processo de digestão anaeróbia em bom funcionamento (CHERNICHARO, 2007).

Toxicidade

A toxicidade por sais, amônia, sulfeto e metais pesados pode ter diferentes efeitos sobre os microrganismos, em função de suas concentrações e do nível tóxico dos mesmos, que dependerá das condições do meio e dos organismos envolvidos. Podem ter ação bactericida, quando as bactérias não se adaptam as concentrações do material tóxico ou ação bacteriostática, que ocorre quando a bactéria tem seu crescimento retardado. A sensibilidade e a capacidade de sistemas biológicos de tratamento assimilarem cargas tóxicas, dependem significativamente do tempo de retenção celular e da magnitude dessa carga, pois quanto maior este tempo, maiores são as chances de adaptação da biomassa (FORESTI *et al.*, 1999; LETTINGA, 1995).

A toxicidade pelo sulfeto é um problema potencial no tratamento anaeróbio, devido à redução do sulfato presente no efluente e a degradação de compostos ricos em enxofre, que levam a formação de sulfeto de hidrogênio (H₂S). A inibição da biota presente nos reatores ocorre de forma mais significativa na presença da forma não dissociado do sulfeto (H₂S), que é mais tóxica do que as demais formas dissociadas, e predomina em valores de pH inferiores a 7. Os organismos metanogênicos são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do H₂S do que as BRS, que são menos afetadas pela presença deste sulfeto hidratado.

O termo metais pesados, utilizado para classificar os elementos com densidade superior a 5,0 g/cm³, são denominados elementos tóxicos quando que não possuem função biológica, como As, Pb, Cd, Hg, dentre outros; e os micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Mo, B e Ni), quando presentes em elevadas concentrações (MUDHOO e KUMAR, 2013). O efeito tóxico dos metais esta associado à disfunção enzimática causada pela presença destes, em suas formas livres, afetando diretamente todo o processo de digestão anaeróbia (CHEN *et al.*, 2008).

A depender dos valores de pH e da concentração de sulfeto disponível, os reatores podem tolerar certas concentrações de metais e atuar na remoção dos mesmos, devido a combinação do sulfeto com o metal e a formação de sais pouco solúveis, que não são tóxicos ao ambiente de tratamento e precipitam no interior do reator.

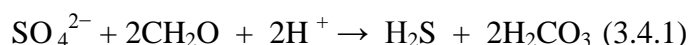
3.4 O ciclo do enxofre e as bactérias redutoras de sulfato

Os processos naturais ligados ao intemperismo e as atividades geoquímicas promovem as condições necessárias para liberação dos elementos presentes na crosta terrestre para a água, solo, atmosfera e organismos. Estas transformações e fluxos de elementos são mediados

por mecanismos físicos, químicos e biológicos que constituem os ciclos biogeoquímicos (CONNEL, 2005).

O enxofre é um elemento indispensável na síntese de aminoácidos pelas bactérias, plantas e animais, sendo assimilado como sulfato ou moléculas orgânicas que contenham sulfato, por meio da redução assimilatória de sulfato em ambiente aeróbio ou anaeróbio. Além desse processo de redução, o enxofre pode ainda agir como receptor de elétrons na oxidação da matéria orgânica pelas bactérias, por meio da redução dissimilatória, em condições de ausência de oxigênio. As bactérias envolvidas neste tipo de redução são denominadas de bactérias redutoras de sulfato (BRS).

As BRS são anaeróbias e utilizam o íon sulfato como agente oxidante, convertendo-o a sulfeto ao final da reação (3.4.1) (PAGNANELLI *et al.*, 2012). Como fonte de carbono as BRS podem metabolizar diversos compostos, como etanol, acetato, malato, lactato, piruvato, propionato e vários compostos fenólicos (LENS *et al.*, 1998). No processo de redução do sulfato a sulfeto, mediado por estas fontes de carbono, há geração de bicarbonatos (3.4.1), e um conseqüente aumento da alcalinidade do meio. A formação do sulfeto promoverá a precipitação dos metais em solução, devido a formação de sais pouco solúveis de sulfeto (3.4.2) (PAGNANELLI *et al.*, 2012).



As BRS também são capazes de realizar acidogênese na presença de um aceptor de elétrons ou fermentação quando na ausência de um aceptor de elétrons, o que explicita ainda mais a versatilidade destes microrganismos.

Diferentes compostos podem ser utilizados pelas BRS como doadores de elétrons. Hidrogênio molecular (H_2); Ácidos graxos, como acetato, propionato e butirato; ácidos de três e quatro carbonos, como lactato, piruvato e malato; álcoois como metanol, etanol e propanol; e eventualmente açúcares e ácidos de cadeia longa (BARBOSA, 2009).

Dois grandes grupos de bactérias sulforedutoras podem ser destacados: i) oxidadoras incompletas, que oxidam o substrato até o acetato, como as espécies do gênero *Desulfobulbus sp.*, *Desulfomonas sp.*, e a maioria das espécies do gênero *Desulfotomaculum*, que incluem as *Desulfovibrio*; ii) oxidadoras completas que oxidam o substrato até gás carbônico, como as

espécies dos gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* e *Desulfobacterium* (CHERNICHARO, 2007; COLLERAN *et al.*, 1995).

As reações de redução do sulfato podem ser realizadas mediante diferentes doadores de elétrons, que apresentam diferentes valores de energia livre e envolvem diferentes microrganismos, podendo estes oxidar completamente ou incompletamente a matéria orgânica, a depender da espécie de microrganismos e do substrato utilizado. A Tabela 3.1 apresenta as reações de redução do sulfato quando na presença de etanol, acetato e lactato como doadores de elétrons e os seus respectivos valores de energia livre.

Tabela 3.1 Energia livre da reação de redução de sulfato para diferentes doadores de elétrons.

Substrato	Produto	ΔG^0 (kJ/reação)
2Etanol + SO_4^{2-}	2Acetato + $\text{HS}^- + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-132,7
2Lactato + SO_4^{2-}	2Acetato + $\text{HS}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-159,6
Acetato + SO_4^{2-}	$\text{HS}^- + 2\text{HCO}_3^-$	-47,3

Fonte: Do autor (Adaptado de Liamleam e Annachhatre, 2007).

O lactato é um substrato orgânico utilizado no enriquecimento de culturas de BRS, devido ao fato de ser utilizado por diferentes espécies de bactérias redutoras além de poder fornecer a alguns destes microrganismos um doador de elétrons e uma fonte carbono em um único composto (LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007). O etanol como o lactato é um doador de elétrons e fonte de carbono para as BRS. Ambos os substratos produzem potencialmente o acetato, que é um importante intermediário nos sistemas anaeróbios, seja na rota sulfetogênica ou na metanogênica (LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007).

As BRS competem por substrato (acetato e hidrogênio) com as bactérias metanogênicas e acetogênicas, que são as bactérias responsáveis pela digestão anaeróbia da matéria orgânica na ausência de sulfato. Dessa forma, a predominância da sulfetogênese ou da metanogênese será determinada pela concentração de sulfato no meio. Um parâmetro capaz de fornecer informações relevantes sobre estas rotas metabólicas é a relação entre a DQO (demanda química de oxigênio) e o sulfato ($\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$).

A competição entre as BRS e as arqueias metanogênicas determina um maior ou um menor potencial de produção de metano ou sulfeto, produtos finais do processo de mineralização da matéria orgânica na ausência de oxigênio (LENS *et al.*, 1998). Em ambientes sulfetogênicos, observa-se uma redução na produção de metano, em consequência da inibição potencial de organismos acetogênicos e metanogênicos pelo sulfeto de hidrogênio

e pela competição por substrato (STEPHENSON; BRANION; PINDER, 1994; COLLERAN et al., 1995).

A magnitude desta competição está relacionada a uma série de aspectos, particularmente o pH e a relação DQO/SO₄²⁻ na água residuária (CHERNICHARO, 2007). O aumento da relação DQO/SO₄²⁻ faz com que a metanogênese prevaleça sobre a sulfetogênese. As relações DQO/SO₄²⁻ iguais ou inferiores a 2 unidades determinam o predomínio das bactérias sulforedutoras (ISA et al, 1986), sendo a relação de 0,67 a proporção estequiométrica de oxidação completa da matéria orgânica na presença de sulfato, ou seja, haverá nessa condição sulfato suficiente para remoção de toda a matéria orgânica (LENS, et al. 1998). A relação DQO/Sulfato em torno de 2 tem sido considerada ótima para o crescimento das BRS, principalmente quando há predomínio das bactérias do grupo das oxidadoras incompletas. Uma elevada eficiência de remoção de sulfato tem sido observada nessas condições (BARBOSA, 2009).

A capacidade de metabolizar e co-metabolizar diversos compostos, associada a possibilidade de precipitação e recuperação de metais, e ainda a capacidade de tolerar ambientes adversos, como elevada acidez e presença de elevadas concentrações de metais, faz com que as BRS desempenhem um importante papel na biorremediação de efluentes contaminados (CASTILLO et al., 2012). O tratamento de efluentes *ex situ*, por meio do biorreatores, é o mais usual quando se faz uso destas bactérias, contudo, o tratamento *in situ*, por meio de alagados construídos e barreiras reativas permeáveis, também tem sido proposto (PAGNANELLI et al, 2012).

Os biorreatores propostos para tratamento de DAM podem ser inoculados por diferentes procedimentos. A coleta das bactérias pode ser feita no meio ambiente, contaminado ou não, ou diretamente nas estações de tratamento anaeróbico de efluentes. Normalmente as bactérias são selecionadas por aclimação no próprio reator, durante o processo denominado de estabilização ou partida. A cultura de bactérias em laboratório, também é uma alternativa, e geralmente é feita por meio do *Postage B*, utilizando o lactato de sódio como doador de elétrons e fonte de carbono (CASTILLO et al., 2012; RASOOL, 2013).

3.5 Tratamento biológico de drenagem ácida de minas

O tratamento convencional dado a DAM fundamenta-se nas reações físico-químicas que são capazes de neutralizar a drenagem e precipitar os metais envolvidos. Faz-se uso, principalmente de Ca(OH)₂ (cal hidratada) e de CaO (cal virgem). Contudo, este é um

processo oneroso, pois envolve gastos com os produtos químicos e com a disposição adequada do material precipitado (Garcia *et al.*, 2001). Neste contexto, surge a demanda pelo estudo e desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento da DAM.

O tratamento biológico da DAM vem sendo investigado e tem apresentado bons resultados (KIM, *et al.*, 2013; RODRIGUEZ, *et al.* 2012; BERTOLINO *et al.*, 2011; JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, 2009). Fato este, justificado, entre outros aspectos, devido à capacidade de certos processos anaeróbios realizarem tanto a redução do potencial ácido da drenagem, mediante o consumo da acidez ou geração de alcalinidade, quanto à possibilidade de remoção e recuperação de metais.

Dentre as rotas metabólicas possíveis, em ambiente anaeróbio, destacam-se as rotas que permitem a redução do sulfato (sulfetogênese), pois permitem a geração de alcalinidade e a precipitação de sulfetos metálicos. Reatores operando em rota sulfetogênica têm apresentado bons resultados no tratamento de efluentes ricos em sulfato, com eficiências de remoção de sulfato que chegam a 90 % (KIM, *et al.*, 2013; ARCHILHA *et al.*, 2010; DAMIANOVIC e FORESTI, 2007).

O emprego de métodos biológicos por meio de biorreatores é uma das alternativas promissoras no tratamento passivo da DAM por meio da redução do sulfato. Diferentes tipos de reatores têm sido propostos para esta finalidade, a saber: reatores de leito fluidizado, reatores de membranas, reatores anaeróbios híbridos, filtros anaeróbios, reatores UASB (BERTOLINO *et al.*, 2011).

Além da determinação da configuração do biorreator, outra importante variável, diz respeito a seleção da fonte externa de carbono e do doador de elétrons apropriado, haja vista, que algumas águas residuárias não possuem ou possuem em quantidades insuficientes tais elementos essenciais. Compostos orgânicos simples (etanol, acetato ou lactato) são substratos mais adequados do que os compostos mais complexos. Bertolino *et al.* (2011) avaliaram a utilização do lactato como fonte externa de carbono no tratamento de DAM e obtiveram uma remoção de 86% do sulfato quando operando um reator UASB com reciclo de efluente. Já os pesquisadores Tsukamoto *et al.* (2004) avaliaram a utilização do etanol como fontes externa e obtiveram remoções de sulfato superiores a 80 %, operando um reator em coluna.

O cenário atual de pesquisas relacionadas ao tratamento biológico da DAM por meio de biorreatores e os promissores resultados encontrados, estimulam o desenvolvimento de pesquisas capazes de aperfeiçoar este processo de tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reator UASB

Os três reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) em escala de bancada foram construídos em acrílico, construídos a partir de um tubo de 80 cm de altura e 11 cm de diâmetro interno e 17 cm de diâmetro interno no separador trifásico. Ao longo do comprimento do reator são dispostos pontos de amostragem a cada 5 cm. A 65 cm da base do reator está disposto o separador trifásico para separação sólido-gás-líquido e coleta de biogás. O nível do líquido no separador trifásico foi mantido por meio de um equalizador de pressão (selo hídrico). Os reatores possuem volume útil igual a 9,8 litros. Na Figura 4.1 apresenta-se a representação esquemática do experimento. O aparato experimental é apresentado na Figura 4.2.

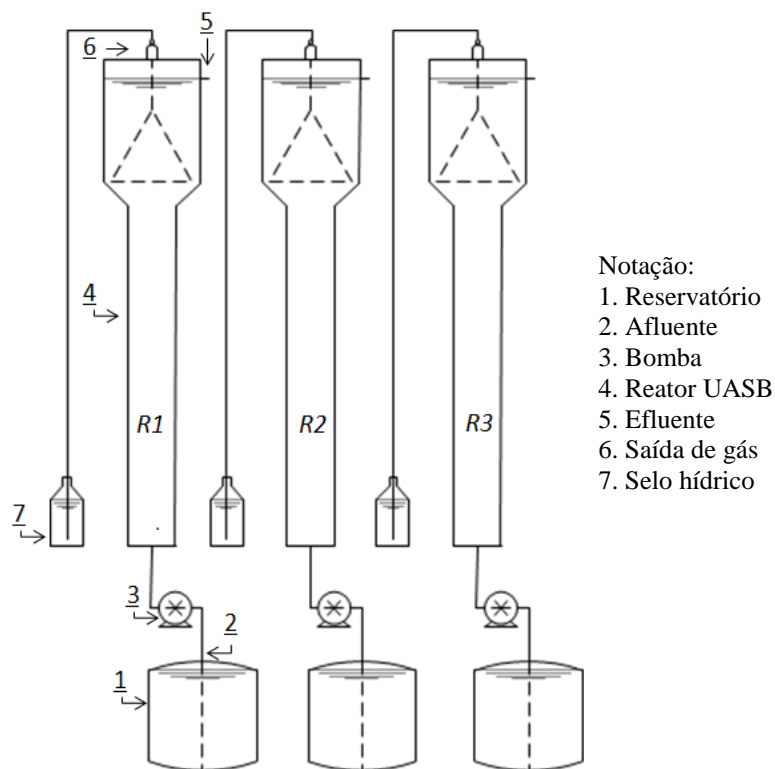


Figura 4.1 Representação esquemática do aparato experimental. Fonte: Do autor.

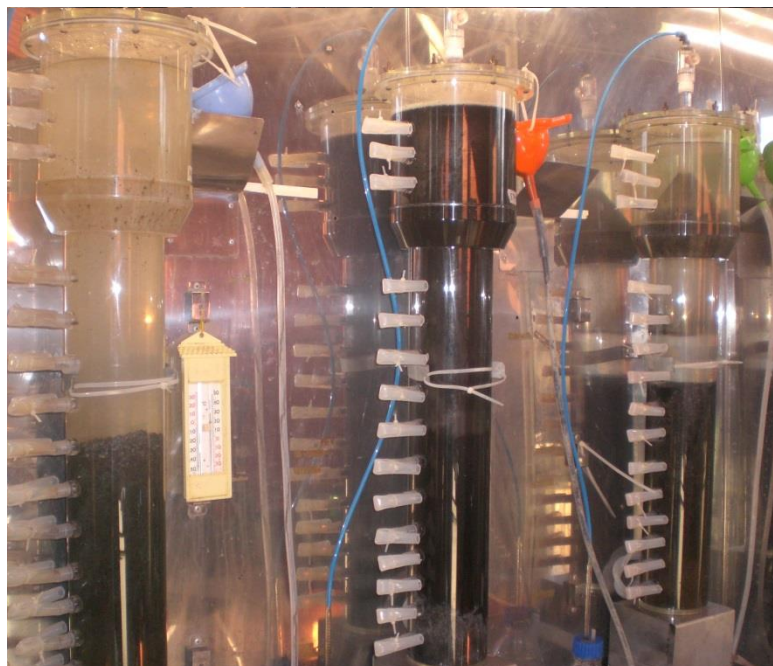


Figura 4.2 Foto dos reatores UASB instalados em câmara de controle de temperatura. Fonte: Do autor.

4.1.1 Inóculo

A biomassa granular utilizada foi proveniente de um reator UASB em funcionamento na cidade de Tietê – SP, tratando dejetos do abatedouro de aves da empresa Avícola Dacar.

4.1.2 Fontes de carbono e água residuária

Como fonte de carbono utilizou-se acetato no reator 1, etanol no reator 2 e lactato no reator 3. Adicionou-se aos reservatórios de alimentação uma quantidade suficiente destes compostos para fornecer uma demanda química de oxigênio (DQO) de 1400 mg L^{-1} . Estimou-se as quantidades de etanol, acetato e lactato pela DQO teórica de cada fonte de carbono e pelos testes de DQO realizados para cada produto, objetivando fixar uma relação teórica de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ igual a 2.

A água residuária utilizada foi DASM, acrescida de uma solução de nutrientes e matéria orgânica, conforme Tabela 4.1 e um pH igual a 3. A solução de nutrientes foi adicionada em quantidades suficientes para atender uma relação $\text{DQO}:\text{N}:\text{P}$ igual a 500:5:1 mgL^{-1} , respectivamente. A produção da drenagem ácida sintética foi realizada por meio da adição de reagentes químicos analíticos.

Tabela 4.1 Constituintes do afluente.

Constituintes	Concentração do íon (mg L ⁻¹)
Metais e Sulfato	
Fe ²⁺ (sulfato ferroso heptahidratado)	100,0
Zn ²⁺ (sulfato de zinco heptahidratado)	20,0
Cu ²⁺ (sulfato de cobre pentahidratado)	5,0
SO ₄ ²⁻ (sulfato de sódio anidro)	700,0
Nutrientes	
N (cloreto de amônio)	14,0
F (fosfato monossódico)	2,8
Fontes de carbono	
Acetato (acetato de sódio)	1400,0
Lactato (lactato de sódio)	1400,0
Etanol (etanol 95° GL)	1400,0

Fonte: Do autor.

4.2 Análises físico – químicas

As análises foram realizadas duas vezes por semana, seguindo os métodos descritos pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Eaton *et al.*, 2012), exceto quando explicitado:

a) Matéria orgânica (DQO) – método 5220 D (colorimétrico – refluxo fechado). Utilizou-se um espectrofotômetro da marca *Hach*® modelo DR-2800, em comprimento de onda de 620 nm. Uma curva analítica calibrada no laboratório (com intervalo variando de 25 a 800 mg/L) foi utilizada para expressar os resultados em miligramas de oxigênio por litro.

b) pH – método 4500-H+ B (eletrométrico). Foi determinado por potenciômetro da marca *Denver Instruments* ® modelo UB – 10 e precisão de 0,005 pH. As amostras brutas foram analisadas logo após a coleta.

c) Alcalinidade – medidas de alcalinidade total e intermediária foram realizadas segundo método titulométrico apresentado por Ripley *et al.* (1986). As amostras brutas foram analisadas logo após a coleta.

d) Sulfato (SO₄²⁻) – método 4500-SO₄²⁻E. Foi determinado empregando o método turbidimétrico em espectrofotômetro da marca *Hach*® modelo DR-2800. A amostra foi fixada em 2 mL de uma solução de acetato de zinco (220 g L⁻¹), e centrifugada por cinco minutos a 5000 rpm, para posterior análise do sobrenadante.

e) Sulfeto total dissolvido (S^{2-}) – Foi determinado empregando um método colorimétrico em espectrofotômetro da marca *Hach*® modelo DR-2800 por meio de *kit hach*® específico para análises de sulfeto e produzido pelo fabricante. As amostras coletadas foram fixadas em 2 mL de uma solução de acetado de zinco (220 g L^{-1}) no momento da coleta.

f) Ácidos voláteis intermediário (acético, butírico, propiônico, láctico, málico, succínico, valérico) e álcoois (etanol, metanol) – foi determinado por cromatografia líquida (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Fez-se uso de cromatógrafo Shimadzu® equipado com bomba LC-10ADVP, válvula FCV- 10ALVP, detector ultravioleta (UV) com arranjo de diodos (SPD-M10 AVP), controlador SCL-10AVP e injetor Rheodyne® (100 μ L loop), com coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8mm; Bio58 Rad).

g) Gás carbônico, metano e sulfeto de hidrogênio – Fez-se uso de um cromatógrafo Shimadzu GC-2014, TCD e coluna HP-PLOT/Q (30 m x 0,53 mm de diâmetro interno x 40,0 μ m de espessura de filme). Gás de arraste: hidrogênio. $T_{\text{injetor}} = 160 \text{ }^\circ\text{C}$; split = 5,0, fluxo da coluna = 4,0 mL/min. $T_{\text{detector}} = 170 \text{ }^\circ\text{C}$; polaridade = + $T_{\text{forno}} = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min) até $170 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), a $60 \text{ }^\circ\text{C/min}$. (tempo de corrida = 5,25 min).

h) Metais (cobre, ferro e zinco) – método 3111. As amostras afluente e efluente foram previamente digeridas com ácido nítrico e clorídrico e analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica, Varian AA240FS.

i) Imagens microscópicas – Microscópio "Leica" modelo: DMLB, em microscopia de contraste de fase.

4.3 Métodos estatísticos

Estatística descritiva

A estatística descritiva (média, máximo, mínimo e desvio padrão) aplicada para tratar os dados experimentais foi feita seguindo as recomendações de Morettin (2011).

Teste t pareado

Para avaliar as variáveis referentes à demanda química de oxigênio afluente e efluente dos reatores, utilizou-se um teste de hipótese. Um teste t pareado foi utilizado para testar as variáveis, a um nível de significância de 5%, como apresentado por Morettin (2011).

Correlação

A avaliação do grau com que se manifesta a correlação entre as séries de dados sulfato e sulfeto efluentes, foi feita por meio do coeficiente de correlação de Pearson e do teste t *Student* a um nível de significância de 5% como apresentado por Morettin (2011).

4.4 Partida e operação

A biomassa foi retirada da refrigeração 24 horas antes da inoculação e exposta a temperatura ambiente para iniciar o processo de aclimatação dos microrganismos a temperatura de operação. Peneirou-se a biomassa com o objetivo de reservar 3 litros de grânulos para cada reator e o líquido que os envolvia foi também reservado e inserido nos reatores, computando 2 litros de líquido intersticial para cada reator. O restante do volume útil dos reatores foi completado com drenagem.

O pH da água de abastecimento utilizada na fabricação da drenagem foi abaixado para 3,0 com ácido clorídrico antes da adição dos sulfatos metálicos. Tal medida visou garantir a solubilidade dos metais adicionados e evitar precipitação dos mesmos. Após a adição dos reagentes, o pH era novamente corrigido para atingir o pH da DASM (pH=3,0).

A alimentação foi feita por meio de uma bomba peristáltica Gilson® e os reatores mantidos em câmara térmica a 30°C. Regulou-se a rotação da bomba para obter um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas.

O reator 1 foi alimentado com acetato, o reator 2 foi alimentado com etanol e o reator 3 foi alimentado com lactato. O reator 1 foi operado por 91 dias e os reatores 2 e 3 por 145 dias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições operacionais

Os reatores foram operados em condições controladas de vazão e tempo de detenção hidráulica. A estatística descritiva para um total de 30 amostras é apresentada na Tabela 5.1. Os reatores 1, 2 e 3 com volume útil igual a 9,8; 9,84 e 9,78 litros, respectivamente.

Tabela 5.1 Estatística descritiva do tempo de detenção hidráulica dos reatores 1,2 e 3.

Tempo de detenção hidráulica - TDH (horas)					
	TDH teórico	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Reator 1	24,0	25,0	23,3	26,3	0,9
Reator 2	24,0	25,6	22,8	29,5	1,6
Reator 3	24,0	26,7	24,0	30,1	1,8

Fonte: Do autor.

Controlou-se a concentração de matéria orgânica e de sulfato afluente visando manter uma relação DQO/SO_4^{2-} igual a 2,0. A estatística descritiva para um total de 40 amostras é apresentada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Estatística descritiva da relação DQO/SO_4^{2-} afluente aos reatores 1, 2, e 3.

Relação entre a demanda química de oxigênio e a concentração de sulfato ($mg\ O_2.L^{-1}$)/ ($mg\ SO_4^{2-} .L^{-1}$)					
	Relação teórica	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Afluente 1	2	2,1	1,9	2,4	0,1
Afluente 2	2	2,0	1,5	2,3	0,2
Afluente 3	2	2,0	1,6	2,5	0,2

Fonte: Do autor.

5.2 Partida dos reatores

5.2.1 Reator 1

Remoção de matéria orgânica e sulfato

O reator proposto para tratar a drenagem ácida sintética e alimentado com acetato de sódio, denominado Reator 1, não apresentou conversões significativas de matéria orgânica e redução do sulfato. O sistema não conseguiu promover a digestão anaeróbia, conforme ilustrado na Figura 5.1.

Aplicou-se um teste t pareado a um nível de significância (α) de 5%, a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_1) são:

H_{10} : DQO afluente = DQO efluente

H_{11} : DQO afluente > DQO efluente

O P-Valor encontrado foi igual a 0,135. Como P-Valor > α , aceita-se a hipótese de nulidade (H_{10}). Dessa forma, podemos afirmar que a microbiota do reator não foi capaz de oxidar o acetato na ausência da correção de pH e dentro das outras condições operacionais empregadas.

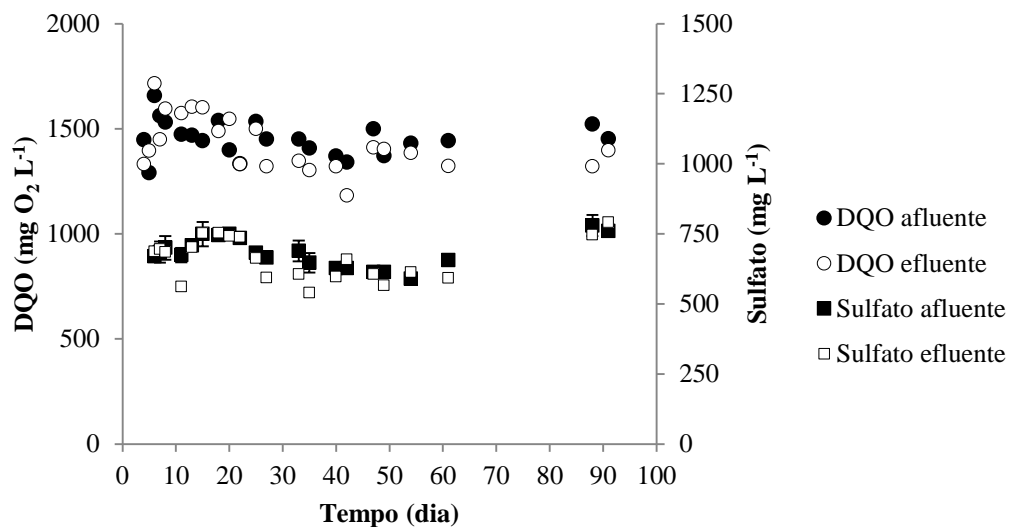


Figura 5.1 Demanda química de oxigênio (DQO) e sulfato, afluente e efluente do reator alimentado com acetato. Fonte: Do autor.

Condizente com a situação supracitada, o sulfeto efluente decaiu rapidamente nos primeiros 10 dias de operação e não foi detectado nas análises posteriores, conforme Figura 5.2. Este sulfeto identificado, provavelmente, foi devido a um residual do efluente que estava no inóculo.

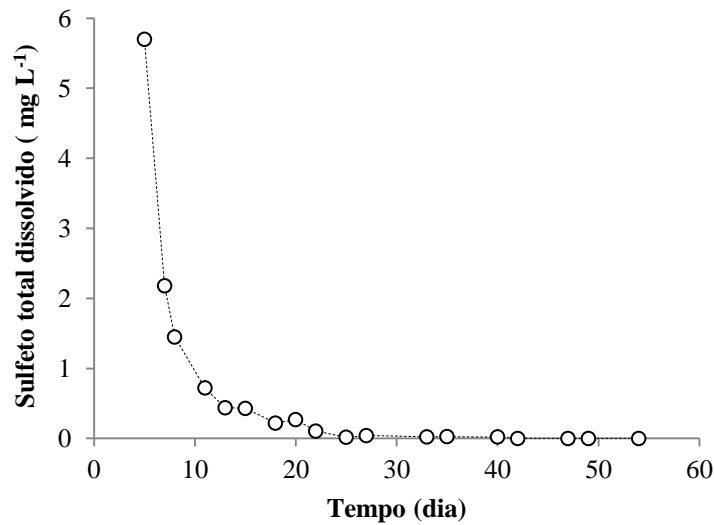


Figura 5.2 Sulfeto total dissolvido no efluente do reator alimentado com acetato. Fonte: Do autor.

Alcalinidade, ácidos voláteis e pH

Devido ao fato da biomassa do reator não ter conseguido estabelecer a digestão anaeróbia, os valores de pH efluente decaem nos primeiros 15 dias de operação e não apresentaram diferenças significativas em relação ao pH afluente nos demais dias (Figura 5.3). A fonte de carbono adicionada a DASM, praticamente não foi consumida, e as elevadas concentrações de ácido acético no reator confirmam os valores de DQO encontrados no efluente. Em um pH igual a 3,0, praticamente todo o acetato encontra-se na sua forma protonada, como ácido acético (98%), considerando um pK é igual a 4,75 (Figura 5.4).

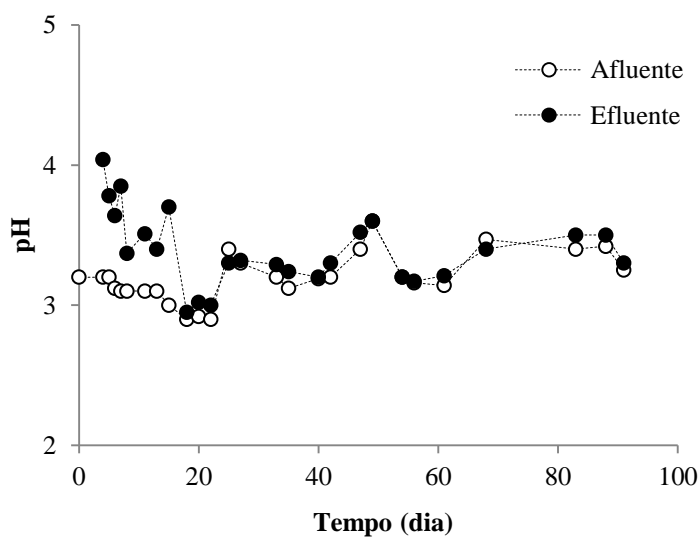


Figura 5.3 Potencial de hidrogênio (pH) afluente e efluente do reator alimentado com acetato. Fonte: Do autor.

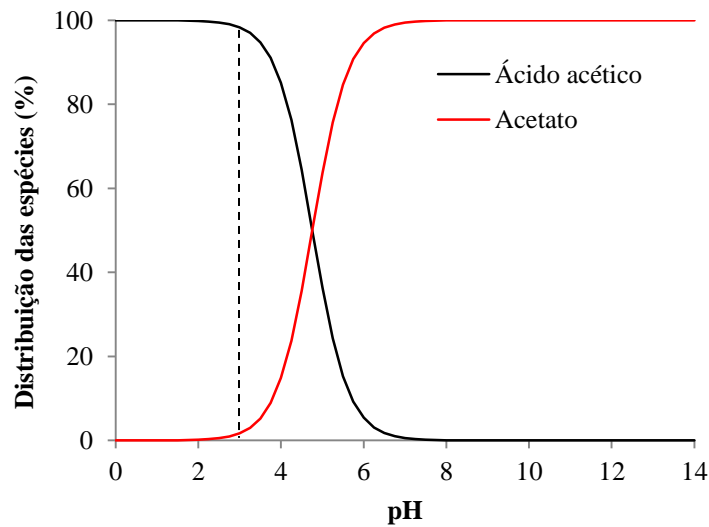


Figura 5.4 Distribuição das espécies de acetato em função do pH. Fonte: Do autor.

Biogás

As análises do biogás no separador trifásico também corroboram com a afirmação de que o sistema não conseguiu se estabelecer. As baixas concentrações de gás carbônico e metano, que decaem rapidamente nos primeiros dias de operação (Figura 5.5), evidenciam a ineficiência do sistema proposto.

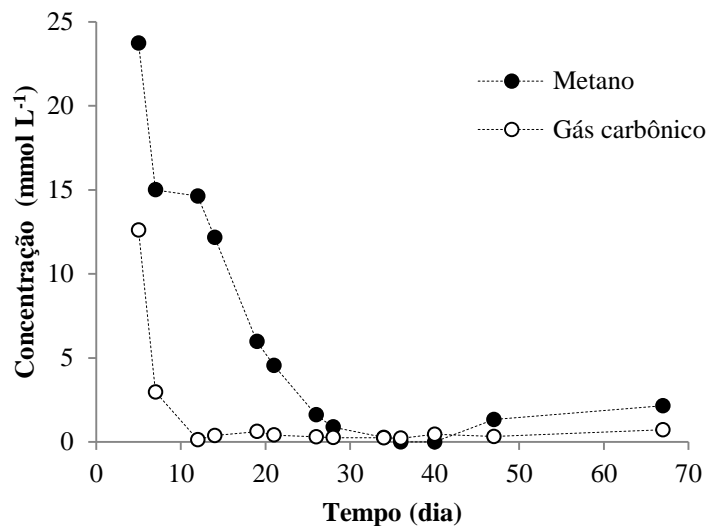


Figura 5.5 Composição do biogás no *headspace* do reator alimentado com acetato. Fonte: Do autor.

As BRS capazes de oxidar completamente a fonte de carbono, ou seja, capazes de consumirem o acetato gerado pelas rotas metabólicas acetogênicas, são sabidamente mais difíceis de serem cultivadas e mais sensíveis às condições do meio de cultura, quando comparadas, por exemplo, com as BRS que oxidam incompletamente a fonte carbono. A

exemplo das bactérias do gênero *Desulfonema*, *Desulfococcus*, e *Desulfobacterium*, capazes de oxidar o acetato, mas de forma muito lenta e sem formação substancial de massa celular (WIDDEL, 1988).

Os metais pesados presentes na DASM, ferro, zinco e cobre, podem ter efeitos estimulantes ou inibitórios, em função das suas concentrações, das suas formas solúveis e iônicas, e do potencial do meio em amenizar ou mesmo evitar efeitos deletérios na digestão (MUDHOO e KUMAR, 2013). Tem sido observado efeitos inibitórios no crescimento das BRS em concentrações de zinco igual a 20 mg L⁻¹, cobre igual a 2 mg L⁻¹ e ferro em concentrações maiores que 60 mg L⁻¹ (MARTINS *et al.*, 2009 CABRERA *et al.*, 2006; SANI; PEYTON e BROWN, 2001). Dessa forma, pode se inferir que as concentrações de ferro, zinco e cobre, na drenagem, que permaneceram em solução, podem ter contribuído para a inibição da biomassa inoculada.

Outros aspectos a serem considerados, dizem respeito ao pH ótimo de crescimento das BRS, que está em torno de 7,0 e ao efeito desacoplador do ácido acético, ao perpassar a membrana celular. Como observado por BARONOFSKY *et al.* (1984), não é somente o pH externo que causa a inibição do crescimento das bactérias, mas também o efeito do excesso de ácido acético no meio, pois este é capaz de transpassar a membrana celular e acidificar o meio inibindo o crescimento bacteriano. Além disso, o efeito desacoplador do ácido acético compromete a formação do gradiente de prótons e conseqüentemente a produção de ATP, levando a célula ao colapso (BARONOFSKY *et al.*, 1984). Possivelmente este colapso bioenergético levou ao rompimento da membrana celular das bactérias e a desestruturação dos grânulos inoculados, como observado de forma gradativa ao longo da operação do reator. Os autores Koschorreck *et al.* (2004) também observaram os efeitos deletérios do ácido acético na biomassa em reatores sulfetogênicos tratando drenagem ácida.

A desestruturação granular se deu principalmente na parte inferior do reator, na qual ocorreu a proliferação de fungos, que avançaram conforme a desestruturação da biomassa aumentou. Esta desestruturação foi observada até uma altura de 20 cm a partir da entrada do reator, comportamento não observado em camadas superiores de biomassa, como ilustrado pela Figura 5.6. Os fungos já se encontravam, possivelmente, na biomassa inoculada ou na água utilizada na fabricação da drenagem, nas suas formas latentes ou em estágio de baixa proliferação.

A análise microscópica do material viscoso que envolveu os grânulos, formado na parte inferior do reator (Figura 5.7) permitiu observar a presença de um possível emaranhado

de hifas, denominado micélio, uma característica dos fungos filamentosos (Figura 5.8) (HANLIN e ULLOA, 1988). Provavelmente estes fungos se alimentaram do material proveniente da lise celular das bactérias que entraram em colapso. A identificação do fungo ou dos fungos não foi realizada. Os relatos científicos de fungos em reatores anaeróbios são escassos, mas já foram observados, como relatado por Motteran *et al.* (2013).

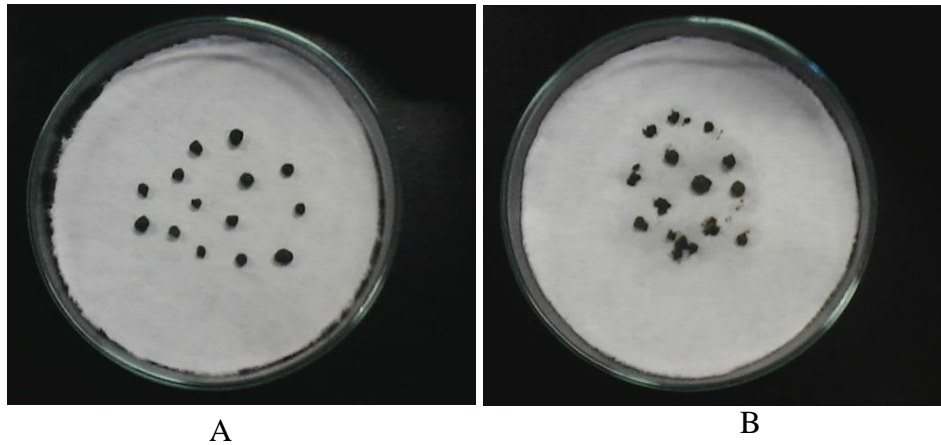


Figura 5.6 Estrutura dos grânulos coletados no reator alimentado com acetato. (A) parte superior, 60 cm. (B) parte inferior, 15 cm. Fonte: Do autor.

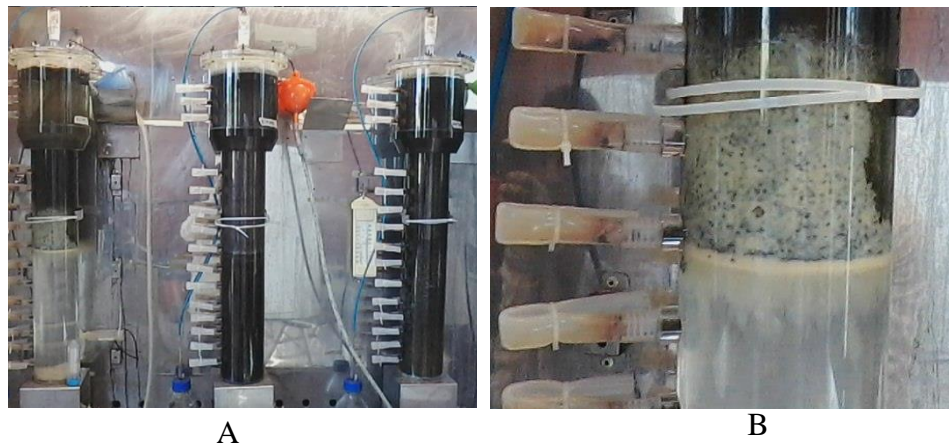


Figura 5.7 Fotos dos reatores após 91 dias de operação, reatores alimentados com acetato (R1), etanol (R2) e lactato (R3), da esquerda para direita, respectivamente (A). Em destaque o material viscoso que envolveu os grânulos no reator alimentado com acetato (B). Fonte: Do autor.

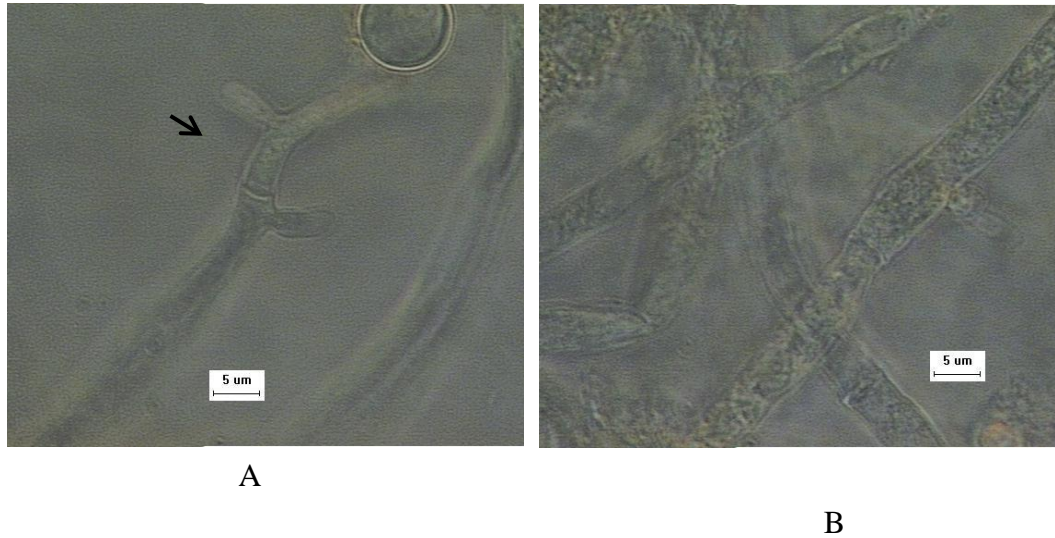


Figura 5.8 Observações morfológicas por microscopia de contraste de fase, referentes a amostras coletadas do material viscoso encontrado na parte inferior da biomassa: (A) hifa; (B) emaranhado de hifas. Fonte: Do autor.

O estabelecimento desses fungos filamentosos colmataram a entrada do reator, o que fez flotar toda a biomassa de modo uniforme. Os grânulos podem também ter perdido biomassa por endogenia e favorecido o deslocamento da biomassa. Observou-se o início do deslocamento da biomassa com 45 dias de operação, e ao completar 91 dias, parte da biomassa atingiu a região do separador trifásico, conforme a Figura 5.7. Neste momento foi encerrada a operação do reator, cessando a alimentação.

5.2.2 Reator 2

Remoção de matéria orgânica e sulfato

O reator proposto para tratar a drenagem ácida e alimentado com etanol, denominado reator 2, apresentou conversões significativas de matéria orgânica e sulfato, sendo estabelecido condições sulfetogênicas capazes de estabilizar o reator e remover estes compostos, conforme ilustrado na Figura 5.9.

Aplicou-se um teste t pareado a um nível de significância (α) de 5%, a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_1) são:

H_{20} : DQO afluente = DQO efluente

H_{21} : DQO afluente > DQO efluente

O P-Valor encontrado foi igual a zero. Como $P\text{-Valor} < \alpha$, aceita-se a hipótese alternativa (H_{21}). Dessa forma, podemos afirmar que o reator foi capaz de utilizar a fonte de carbono adicionada durante todo o período de operação. A partir das análises gráficas dos resultados obtidos, com foco na estabilização da remoção de sulfato e DQO, definiram-se duas fases operacionais. A fase I considerada o período de partida do reator, que durou 55 dias e a fase II a fase de estabilização que durou 90 dias. Todos os valores médios referentes aos parâmetros analisados foram calculados para a Fase II.

A concentração média efluente de DQO foi igual a $809,8 \pm 109,6 \text{ mg L}^{-1}$ (máximo: 1028,2 e mínimo: 586,8). A eficiência média de remoção de matéria orgânica foi igual a $41,7\% \pm 7,0$ (máximo: 53,7 e mínimo: 27,7) conforme ilustrado pela Figura 5.10.

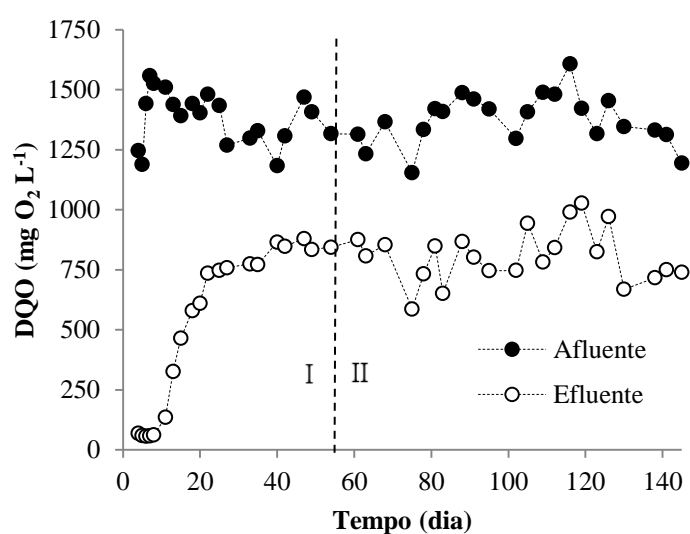


Figura 5.9 Demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

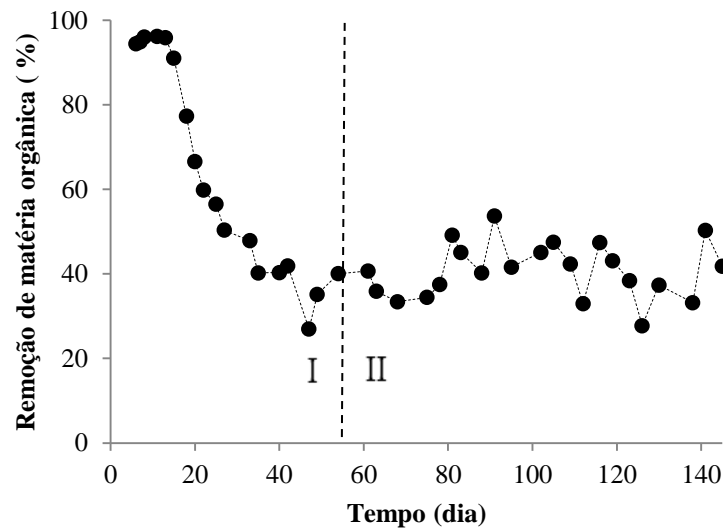


Figura 5.10 Eficiência de remoção de matéria orgânica em função da demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

A Figura 5.11, apresenta a concentração de sulfato e sulfeto total dissolvido no efluente do reator. Estas variáveis respostas estão correlacionadas pelo processo dissimilatório de redução de sulfato. A concentração média de sulfeto foi de $99,6 \pm 14,6 \text{ mg L}^{-1}$ (máximo: 136,7 e mínimo: 78,5) e de sulfato foi de $54,7 \pm 39,3 \text{ mg L}^{-1}$ (máximo: 146,2 e mínimo: 12,2).

A aplicação de um teste de correlação (correlação Pearson) e do teste t Student a um nível de significância de 5% comprova a correlação ($r = -0,899$ e P-Valor = 0,00). Permitindo afirmar que o reator foi eficaz na redução do sulfato a sulfeto, e que as bactérias redutoras de sulfato se estabeleceram no reator.

A eficiência média de redução de sulfato foi igual a $92,6\% \pm 5,5$ (máximo: 98,4 e mínimo: 78,2) conforme ilustrado pela Figura 5.12. Esta elevada conversão do sulfato ocorreu principalmente pelo processo dissimilatório de redução, que utilizou as moléculas de sulfato como aceptores externos de elétrons; e no processo assimilatório, para o crescimento bacteriano.

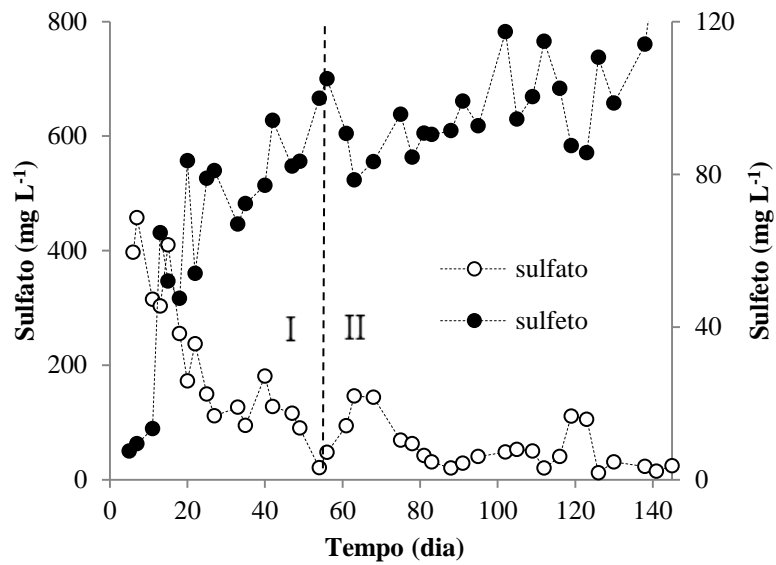


Figura 5.11 Concentrações de sulfato e sulfeto total dissolvido efluente ao reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

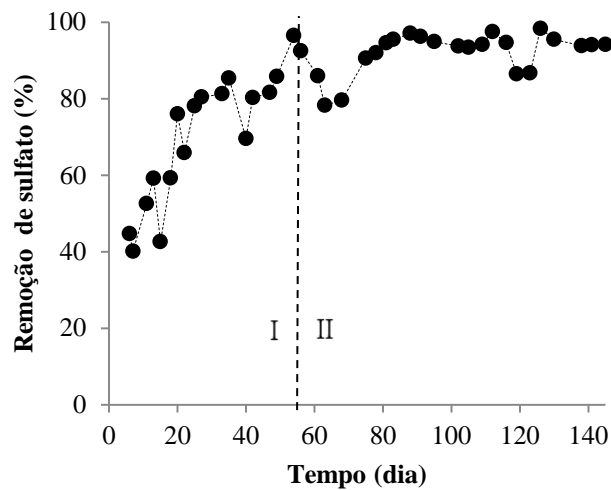


Figura 5.12 Eficiência de remoção de sulfato no reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

Alcalinidade, ácidos voláteis e pH

A Figura 5.13, apresenta o pH afluente e efluente do reator. Em termos médios, um $\text{pH} = 5,1 \pm 0,1$ foi observado no efluente. Este valor médio pode ser justificado, em parte, pelo acúmulo de ácidos voláteis no reator, principalmente o ácido acético, que atingiu um valor médio igual a $514,2 \pm 74,9 \text{ mg L}^{-1}$ (máximo: 699,1 e mínimo: 387,7) (Figura 5.14), o qual tem um pK_a igual a 4,76, capaz de tamponar o sistema. Outro aspecto a ser considerado, é a

geração de alcalinidade pelo metabolismo anaeróbico (metanogênese e sulfetogênese), capaz de equilibrar o pH efluente tamponado pelo acetato.

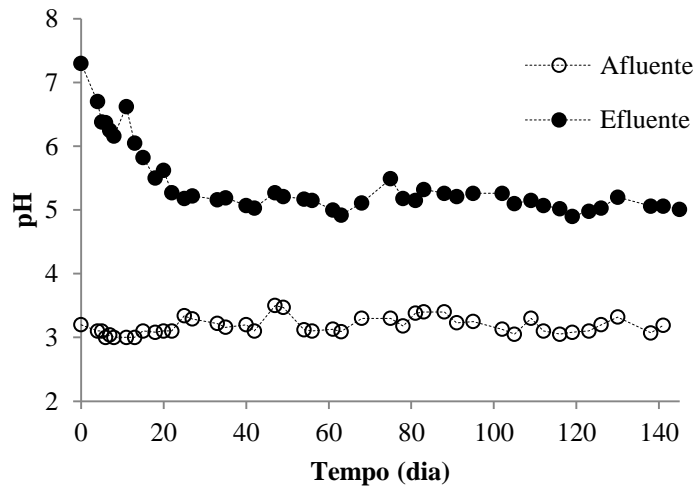


Figura 5.13 Potencial de hidrogênio (pH) afluente e efluente do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

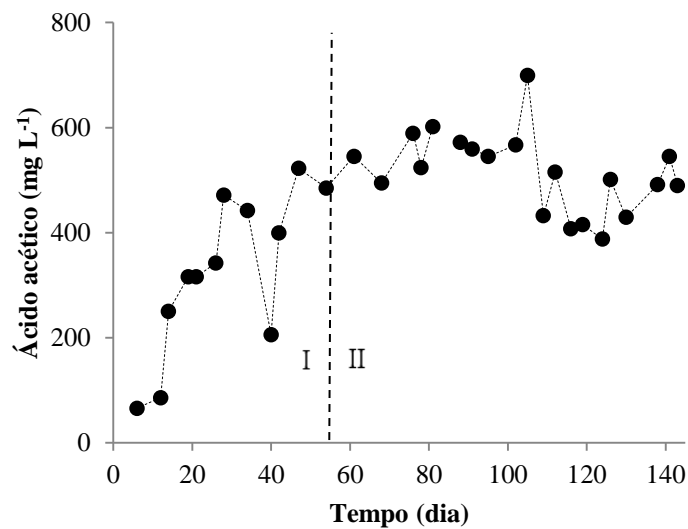


Figura 5.14 Concentração de ácido acético efluente do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

A alcalinidade total calculada se deve a alcalinidade gerada pelos ácidos voláteis, denominada de alcalinidade intermediária (Figura 5.15). Concentração média igual a $223,4 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1} \pm 28,9$ (máximo: 272,9 e mínimo: 175,1) foram observadas no efluente do reator.

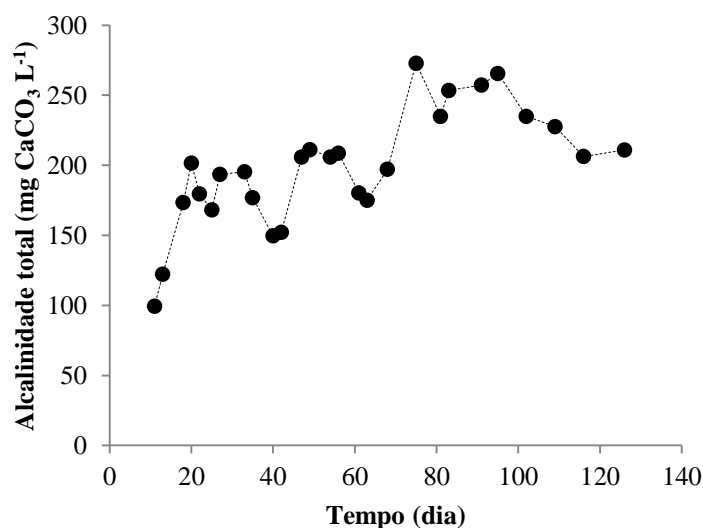


Figura 5.15 Alcalinidade total efluente do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

A baixa eficiência de remoção de matéria orgânica se deve principalmente ao acúmulo de acetato (Figura 5.14), um intermediário produzido pelas BRS denominadas oxidadoras incompletas.

O acúmulo de acetato pode ser justificado pelo estabelecimento das BRS capazes de produzi-lo e pelo difícil estabelecimento das BRS capazes de oxidá-lo. Diversos autores (BERTOLINO *et al.*, 2011; GALLEGOS-GARCIA, 2008; LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007; LENS *et al.*, 1998), também observaram o acúmulo de ácido acético em reatores sulfetogênicos e o predomínio das BRS do grupo das oxidadoras incompletas.

Uma possível competição entre estes dois grupos de BRS, pode também explicar o acúmulo de acetato, pois o estabelecimento das oxidadoras incompletas é favorecido na presença de etanol (WIDDEL, 1988). A redução de sulfato por meio da oxidação incompleta do etanol pode ter inibido, por falta de aceptores de elétrons, o funcionamento da rota sulfetogênica capaz de oxidar o acetato.

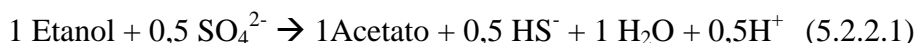
Outro fator a ser considerado, diz respeito à presença destas bactérias no inóculo, pois há a possibilidade destas bactérias oxidadoras completas não estarem presentes. Uma caracterização das espécies presentes no lodo seria necessária para validar as hipóteses propostas.

O efeito inibitório do sulfeto de hidrogênio, sobre a rota metanogênica acetoclástica, deve também ser considerado. Embora a literatura a respeito do efeito tóxico do sulfeto seja complexa e não haja um consenso sobre as concentrações de inibição, os efeitos tóxicos são observados em diferentes graus de toxicidade nos sistemas de tratamento (CHEN *et al.*,

2008; COLLERAN *et al.*, 1995). Como relatado pelos autores Colleran *et al.* (1995), concentrações de sulfeto de hidrogênio em torno de 50 mg L⁻¹ ou maiores, podem inibir em cerca de 50%, as arqueas metanogênicas acetoclásticas. Assim, podemos concluir, que as condições impostas pelo meio, como o baixo pH e a presença de sulfeto de hidrogênio, não permitiram um bom funcionamento desta rota metanogênica, o que pode ter contribuído para o acúmulo de acetato.

A relação entre os mols de etanol consumidos em relação aos mols de sulfato reduzido ($\Delta\text{SO}_4^{2-}/\Delta\text{EtOH}$) apresentado na Figura 5.16, demonstram o estabelecimento de um ambiente sulfetogênico, onde praticamente todo etanol foi utilizado para reduzir o sulfato. A estequiometria de consumo de sulfato, por mols de etanol, conforme a reação 5.2.2.1 abaixo, indica que 0,5 mol de sulfato é reduzido para cada mol de etanol convertido. Com base nessas relações estequiométricas, podemos afirmar, em termos teóricos, que uma relação DQO:SO₄ igual a 1,92, é a razão que garante etanol suficiente para reduzir todo o sulfato.

Operando com uma relação DQO:SO₄ igual a 2, conseguiu-se obter uma elevada eficiência na redução do sulfato e praticamente todo o etanol foi consumido, como previsto teoricamente. Assim, garantimos aceptores e doadores de elétrons suficientes para estimular da rota sulfetogênica. No entanto, as altas concentrações de acetato e sulfeto de hidrogênio dissolvido, no efluente, exigiriam um pós-tratamento para serem lançadas no ambiente.



Relações próximas de 0,5 foram observadas por volta do trigésimo quinto dia de operação e mantidas próximas a este valor desde então. As relações crescentes e menores que 0,5, encontradas no início da operação, podem ser explicadas pelo tempo de adaptação da biomassa até o estabelecimento de um ambiente sulfetogênico. Os autores Nagpal *et al.*, 2000, também observaram relações ($\Delta\text{SO}_4^{2-}/\Delta\text{EtOH}$) próximas a 0,5 em reator sulfetogênico colonizado preferencialmente por BRS do grupo das oxidadoras incompletas e alimentado com etanol.

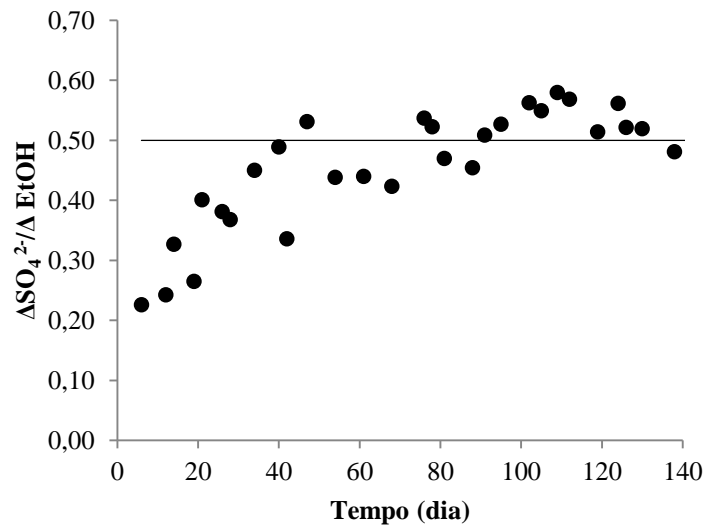


Figura 5.16 Relação entre os mols de sulfato e etanol utilizado no reator alimentado com etanol. A linha no gráfico representa a estequiometria de consumo de sulfato por mols de etanol (reação 5.2.2.1). Fonte: Do autor.

Com relação à produção de acetato, 1 mol de etanol consumido, produz um 1 mol de acetato, segundo a reação 5.2.2.1. Contudo, observou-se que a relação Δ acetato/ Δ EtOH, (Figura 5.17), está em torno de 0,6, abaixo do valor previsto pela relação estequiométrica, demonstrando que parte do acetato gerado pode está sendo consumido em outras rotas metabólicas.

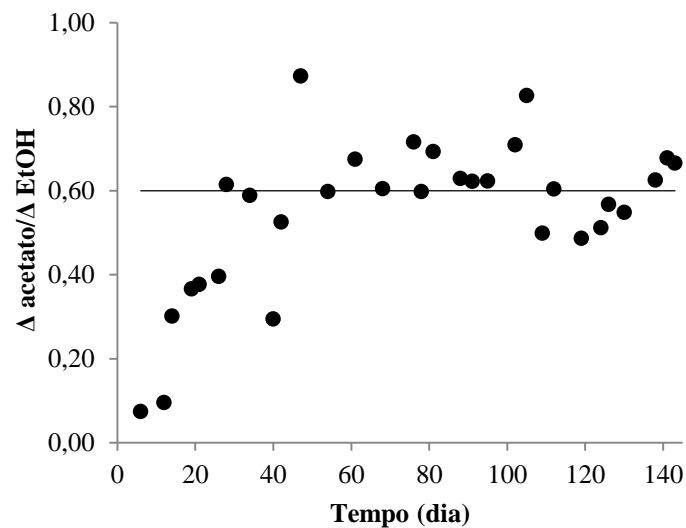


Figura 5.17 Relação entre os mols de etanol utilizado e acetato efluente do reator alimentado com etanol. A linha no gráfico representa a média das relações, Δ acetato/ Δ EtOH, na fase II. Fonte: Do autor.

O consumo do acetato pode estar sendo realizado por BRS e por metanogênicas acetoclásticas. A primeira avaliação a ser feita é sobre os aspectos termodinâmicos e cinéticos envolvidos na utilização deste substrato. A Tabela 5.3 apresenta os valores de energia livre (ΔG^0) e K_m aparente, para as rotas metanogênicas e sulfetogênicas, com diferentes substratos, acetato e hidrogênio.

Tabela 5.3 Valores de energia livre e K_m aparente para a metanogênese e a sulfetogênese.

Substrato	Produto	ΔG^0 (Kj/mol)	K_m aparente (mM)
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$	$\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-28,2	3 – 5 (a); 0,5 – 1 (b)
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-}$	$\text{HS}^- + 2\text{HCO}_3^-$	-39,5	0,2
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-32,7	$5 - 13 \times 10^{-3}$
$4\text{H}_2 + \text{HSO}_4^-$	$\text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$	-38	2×10^{-3}

(a) *Methanosarcina sp.* (b) *Methanothrix sp.* Fonte: Do autor (Adaptado de Colleran *et al.*, 1995).

Os dados cinéticos e termodinâmicos nos permitem observar que as BRS têm maior afinidade pelo substrato (baixo K_m) e são mais eficientes energeticamente, produzindo mais energia por mol de substrato consumido, tanto para o acetato como para o hidrogênio. Dessa forma, era de se esperar, a partir desses valores, que as BRS fossem mais competitivas que as metanogênicas e consumissem preferencialmente o acetato disponível no meio. Contudo, ao avaliarmos a composição do biogás (Figura 5.18), observamos valores significativos de metano, permitindo afirmar que a rota metanogênica foi uma das rotas metabólicas ativas e consumiu parte do acetato produzido.

O metano observado pode também estar sendo produzido pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. Contudo, as BRS utilizam preferencialmente o hidrogênio do meio (LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007), como se pode observar pela Tabela 5.3. Em reatores com retenção de biomassa, tratando efluentes ricos em sulfato, o acetato permanece disponível para a metanogênese e o hidrogênio para a redução do sulfato (RINZEMA e LETTINGA, 1988).

A utilização do acetato preferencialmente pelas metanogênicas também foi relatado pelos autores Sánchez-Andrea *et al.*, 2014; Colleran *et al.*, 1995; Isa *et al.*, 1985. Embora as BRS sejam mais competitivas que as metanogênicas acetoclásticas, outras variáveis devem ser analisadas para explicar o consórcio entre estas espécies.

Operou-se um reator UASB com retenção de biomassa e lodo granular, estas características estão relacionadas com a capacidade do sistema em sustentar diferentes rotas metabólicas. A formação de microambientes, no interior do grânulo, possibilita haver um

gradiente de pH; facilita a transferência de substratos; e possibilita a coexistência de rotas metabólicas com diferentes eficiências energéticas.

Embora as metanogênicas acetoclásticas sejam sensíveis a ambientes com baixo pH, podemos ter uma situação onde o pH externo (pH=5,0) não necessariamente seja igual ao pH interno no grânulo (RINZEMA e LETTINGA, 1988), que pode estar próximo de um pH neutro, assim, neste meio onde há acúmulo de acetato, um microambiente favorável, e um inóculo com uma comunidade metanogênica, a produção de metano era esperada. Outra explicação, diz respeito à possibilidade das metanogênicas acetoclásticas crescerem em ambiente com baixo pH. Já foram identificadas espécies de *Methanosaeta* e *Methanosarcina* em ambiente ácido (LINDSAY *et al.*, 2011; BIJMANS *et al.*, 2009).

Biogás

No biogás coletado no separador trifásico do reator, analisaram-se as concentrações dos gases sulfídrico, carbônico e metano, conforme Figura 5.18. A concentração média de H₂S foi igual a $1,4 \pm 0,2$ mmol L⁻¹ (máximo: 1,8 e mínimo: 1,0); CO₂ igual a $3,6 \pm 1,0$ mmol L⁻¹ (máximo: 4,9 e mínimo: 1,9); e CH₄ igual a $20,8 \pm 3,1$ mmol L⁻¹ (máximo: 26,0 e mínimo: 15,7).

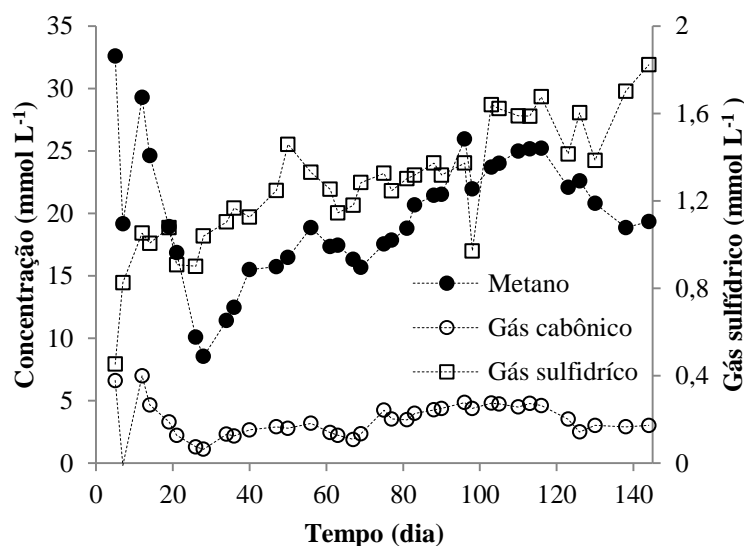


Figura 5.18 Composição do biogás no *headspace* do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

Em termos percentuais o CH₄ representa a maior parcela do biogás, conforme ilustrado pela Figura 5.19, calculado considerando o número total de mols como sendo o somatório dos mols de metano, gás carbônico e sulfídrico. Em termos médios, observou-se que o gás metano representou $80,5 \pm 2,2\%$, o gás carbônico representou $13,9 \pm 2,3\%$ e gás sulfídrico $5,5 \pm 0,9\%$ do número de mols total do biogás analisado ao longo da operação.

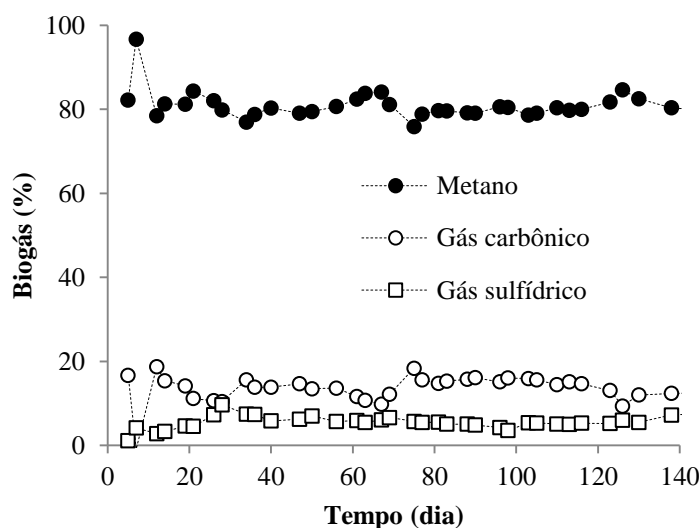


Figura 5.19 Composição percentual do biogás no *headspace* do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

Podemos concluir que a elevada concentração de sulfeto e o baixo pH do afluente, não inibiram a metanogênese. Estes resultados são condizentes com o que foi relatado por Isa *et al.*, 1986, onde a produção de metano não foi inibida em ambiente com elevadas concentrações de sulfeto e percentuais de metano da ordem de 80,0% também foram observados.

Os percentuais de metano e gás carbônico encontrados se assemelham a valores encontrados em reatores UASB metanogênicos, tratando esgoto doméstico, nos quais o metano representa de 70 a 80% e o dióxido de carbono de 5 a 10 % da composição do biogás (NOYOLA *et al.*, 2006), o que evidência uma atividade metanogênica ativa no reator. Os baixos percentuais de gás sulfídrico e carbônico indicam que parte destas espécies permaneceu em fase líquida, como sulfeto de hidrogênio dissolvido e íons bicarbonato.

Devido ao baixo valor de pH, em torno de 5,0, parte do sulfeto produzido pela redução do sulfato foi direcionado para o *headspace* como sulfeto de hidrogênio. Pode-se observar que a produção de H_2S e de CH_4 seguiram tendências semelhantes (Figura 5.18), evidenciando o consórcio entre as BRS e as arqueas metanogênicas, condizente como o que foi relatado pelos autores Van Houten, *et al.* (2006) na partida de um reator sulfetogênico. Devido a sua baixa solubilidade em água, o metano é rapidamente separado da fase líquida e, possivelmente, facilitou o desprendimento de H_2S .

Muitos são os impactos negativos da presença de H_2S no biogás, como a geração de maus odores, em baixíssimas concentrações; o elevado potencial reativo e corrosivo, capaz de atacar diferentes materiais, como ferro, cobre e concreto; e ser tóxico a plantas e animais

(NOYOLA *et al.*, 2006). Aumentando os requisitos de tratamento do gás, tanto para lançamento no meio ambiente quanto para utilização.

Remoção de metais

O sulfeto produzido biologicamente reagiu com os metais em solução, formando sulfetos metálicos de zinco, cobre e ferro que precipitaram dentro do reator. A eficiência de remoção destes metais é apresentada na Figura 5.20.

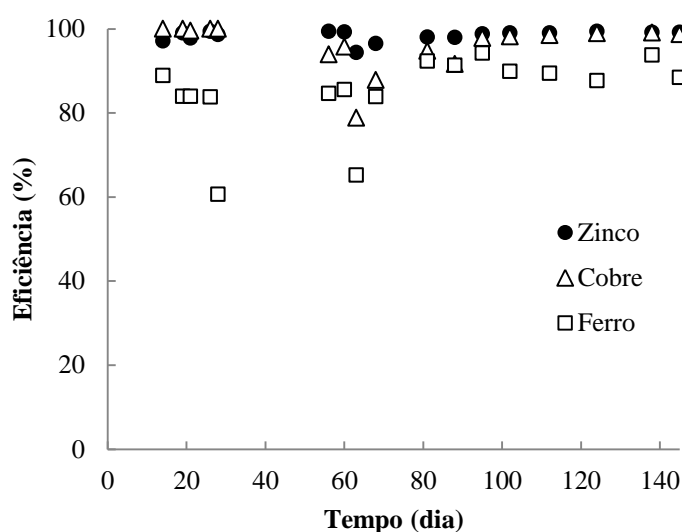


Figura 5.20 Eficiências de remoção de zinco, cobre e ferro. Fonte: Do autor.

Observa-se uma elevada eficiência de remoção dos metais presentes na DASM, praticamente todo cobre e o zinco foram removidos da massa líquida, concentrações médias de $0,17 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ com eficiência média de $96,0 \pm 5,6\%$; e de $0,3 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ L}^{-1}$ com eficiência média de $98,4 \pm 1,3\%$, foram detectadas. Valores estes, que atendem os padrões de lançamento de efluentes segundo a Resolução CONAMA 430/2011, que estabelece valores máximo para lançamento iguais a 5 mg L^{-1} de zinco e 1 mg L^{-1} de cobre. O ferro também foi removido de forma satisfatória na maior parte da operação, embora com uma menor eficiência. Concentrações médias de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ferro e eficiência média de $86,4 \pm 5,6\%$, foram observadas, atendendo também o padrão de lançamento, que estabelece 15 mg L^{-1} de ferro total, como valor máximo.

As maiores eficiências de remoção de cobre e zinco, podem ser justificadas pelas concentrações afluentes (5 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1}), que foram menores que a concentração de ferro (100 mg L^{-1}), mas também, pela solubilidade de cada composto ao reagir com o H_2S em um meio ácido.

As constantes do produto de solubilidade de cada metal de interesse, em termos logarítmicos (Log Kps) são: -35,1; -23,8 e -17,3 para os sulfetos de cobre, zinco e ferro, respectivamente, em condições padrões de temperatura (25°C) e pressão (1atm) (SAMPAIO *et al.*, 2009). Estes sulfetos metálicos apresentam uma baixa solubilidade e em baixas concentrações, precipitam nas formas de um complexo metal-sulfeto ou como colóides.

A solubilidade dos sulfetos metálicos, em função do pH, é apresentada na Figura 5.21, na qual as concentrações dos íons solúveis são apresentadas para cada pH correspondente.

O sulfeto de cobre é a espécie mais insolúvel, com o menor Kps e baixíssimas concentrações de cobre são observadas em $\text{pH} < 1,0$. O sulfeto de zinco, também apresenta um baixo Kps, e em $\text{pH}=5,0$, concentrações menores que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de zinco são observadas. O sulfeto de ferro apresenta o maior Kps, e em $\text{pH}=5,0$, concentrações em torno de 10 mg L^{-1} de ferro, eram esperadas, e foram observadas, o que justifica, em parte, o residual de ferro no efluente, mesmo havendo sulfeto disponível no reator.

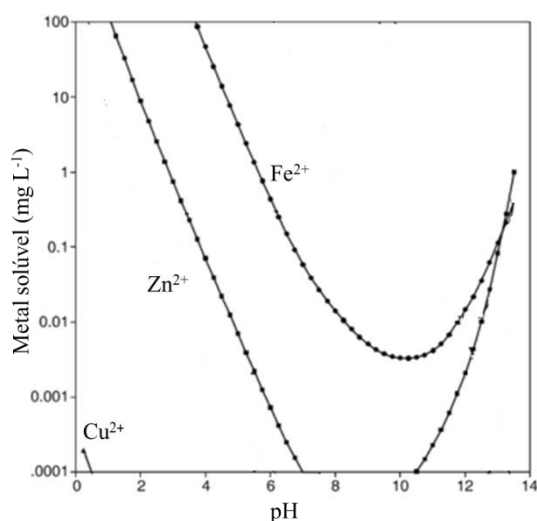


Figura 5.21 Solubilidade dos sulfetos metálicos de cobre, zinco e ferro em função do pH. Fonte: Do autor (Adaptado de Lewis, 2010).

Estas inferências sobre a solubilidade dos sulfetos metálicos permite balizar as análises de eficiência de remoção dos metais, contudo, em um ambiente reacional complexo, como o do reator operado, as reações de equilíbrio podem apresentar comportamentos diferentes do esperado.

Balanço do enxofre

O sulfeto foi encontrado no reator nas fases líquida e gasosa, e em diferentes estados de protonação. As espécies de sulfeto encontradas, dependem do pH, (Figura 5.22) e o equilíbrio é dado pela seguinte reação:

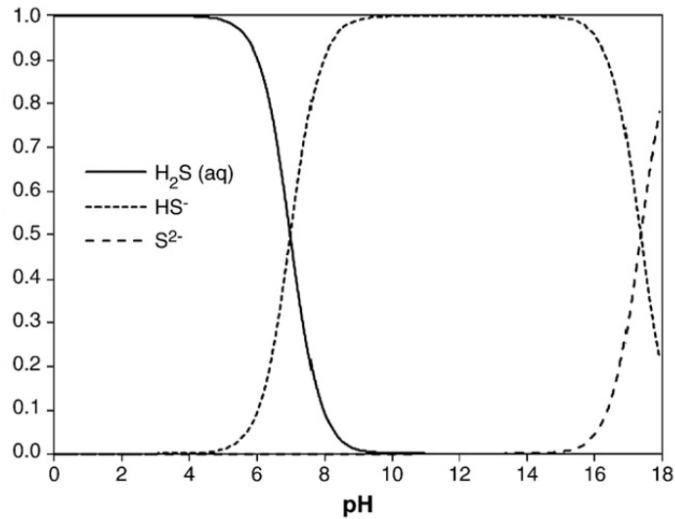
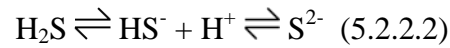


Figura 5.22 Fração molar das espécies de sulfeto em função do pH. Fonte: Do autor. (Adaptado de Lewis 2010).

O sulfeto total dissolvido (STD) no efluente do reator contabiliza todas estas espécies de sulfeto. As concentrações de $\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$ e de $\text{HS}^-_{(\text{aq})}$ podem ser distinguidas do total, conforme as equações abaixo (KALYUZHNYI *et al.*, 1997). Considerou-se $\text{pK} = 6,95$ (35°C) e o pH experimental medido ao longo do experimento.

$$[\text{H}_2\text{S}]_{(\text{aq})} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK})}} * [\text{STD}] \quad (5.2.2.3)$$

$$[\text{HS}^-]_{(\text{aq})} = [\text{STD}] - [\text{H}_2\text{S}]_{(\text{aq})} \quad (5.2.2.4)$$

Praticamente todo sulfeto total dissolvido foi devido ao H_2S . A porcentagem do sulfeto de hidrogênio e do hidrogenosulfeto, em relação ao sulfeto total dissolvido é apresentada na Figura 5.23.

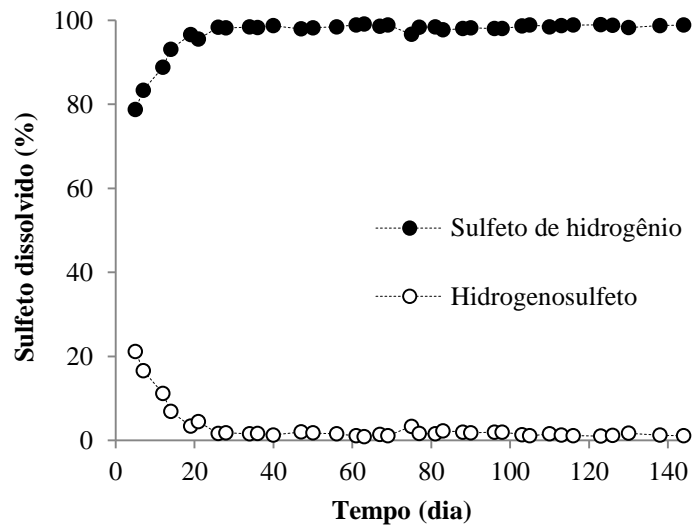


Figura 5.23 Porcentagens de sulfeto de hidrogênio e hidrogenossulfeto no efluente do reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

O sulfeto de hidrogênio é a espécie de sulfeto mais tóxica aos microrganismos, devido a sua capacidade de perpassar a membrana celular e indisponibilizar compostos essenciais para o bom funcionamento das células. Sendo este, um dos problemas da operação do reator em baixo pH. Contudo, o sistema opera com lodo granular, que pode funcionar em condições externas adversas e tolerar altas concentrações de H_2S , da ordem de 150 mg L^{-1} (SPEECE, 1996).

O balanço de enxofre foi realizado com base nas seguintes equações:

$$S - \text{Total} = S - SO_{4 \text{ ef}} + S - H_2S_{\text{(aq)}} + S - H_2S_{\text{(gás)}} + MS_{\text{(s)}} \quad (5.2.2.5)$$

$$S - \text{Residual} = S - SO_{4 \text{ af}} - S - \text{Total} \quad (5.2.2.6)$$

$$\text{Porcentagem residual} = \frac{(S - \text{Residual})}{(S - SO_{4 \text{ af}})} * 100 \quad (5.2.2.7)$$

$$\text{Eficiência de conversão} = \frac{(S - H_2S_{\text{(aq)}} + S - H_2S_{\text{(gás)}} + MS_{\text{(s)}})}{(S - SO_{4 \text{ af}})} * 100 \quad (5.2.2.8)$$

Foram utilizados valores médios de sulfato afluente ($S - SO_{4 \text{ af}}$) e efluente ($S - SO_{4 \text{ ef}}$); sulfeto dissolvido no meio líquido ($H_2S_{\text{(aq)}}$); e sulfeto no biogás ($H_2S_{\text{(gás)}}$). Os sulfetos metálicos formados, representados como $MS_{\text{(s)}}$, foram calculados com base na eficiência

média de remoção dos metais e considerou-se que todo o metal foi removido na forma de sulfeto metálico. Ademais, todo o sulfeto dissolvido foi computado como $H_2S_{(aq)}$.

De acordo com o balanço realizado, a eficiência média de conversão foi igual a 87,2% e a porcentagem residual de 4,76%. Estes valores são equivalentes ao encontrado para a eficiência de redução de sulfato (Figura 5.12) ao longo do experimento, com eficiência média de redução igual a $92,6 \pm 5,5\%$. Outras formas de enxofre, como o sulfito (S_2O_3) e o enxofre elementar (S^0), que podem ter sido produzidos, não foram quantificados, e por isso, não contabilizados nesse balanço.

A conversão dissimilatória do sulfeto, predominante no reator, é uma reação acoplada a oxidação da matéria orgânica. Sendo possível prever em termos teóricos, a quantidade de matéria oxidável, necessária para reduzir o sulfato. Como relatado pelos autores Liamleam e Annachhatre (2007), 1 grama de SO_4 requer 0,67 gramas de DQO para assegurar a completa redução do sulfato. Com bases nessa relação DQO: SO_4 e na DQO removida no reator, calculou-se a porcentagem de DQO que foi utilizada para redução do sulfato(DQO_{SO_4}) e para produção de metano (DQO_{CH_4}), com as seguintes equações:

$$DQO_{SO_4} \% = 0,67 * \frac{\Delta SO_4}{\Delta DQO} * 100 \quad (5.2.2.9)$$

$$DQO_{CH_4} \% = 100 - DQO_{SO_4} \quad (5.2.2.10)$$

Foram utilizados os valores de sulfato afluente e efluente (ΔSO_4) e DQO afluente e efluente (ΔDQO). As porcentagens da DQO utilizadas para estas duas finalidades, apresentadas na Figura 5.24, demonstram a transição de um ambiente metanogênico para um sulfetogênico, após o vigésimo quinto dia de operação. Se considerarmos que a DQO mede a quantidade de elétrons ainda disponíveis para a oxidação, podemos afirmar que o ΔDQO , informa em termos do potencial do oxigênio em receber elétrons, o ΔO_2 que foi utilizado no sistema, contabilizando a matéria orgânica efluente. Dessa forma, podemos utilizar a relação teórica proposta por Lens *et al.* (1998), onde 2 mols de O_2 equivalem a 1 mol de SO_4 , ou seja, 0,67g O_2 para cada 1g de SO_4 . Podemos então considerar, que as equações acima podem expressar a porcentagem do fluxo de elétrons que foi direcionado para cada uma das rotas (REN *et al.*, 2007).

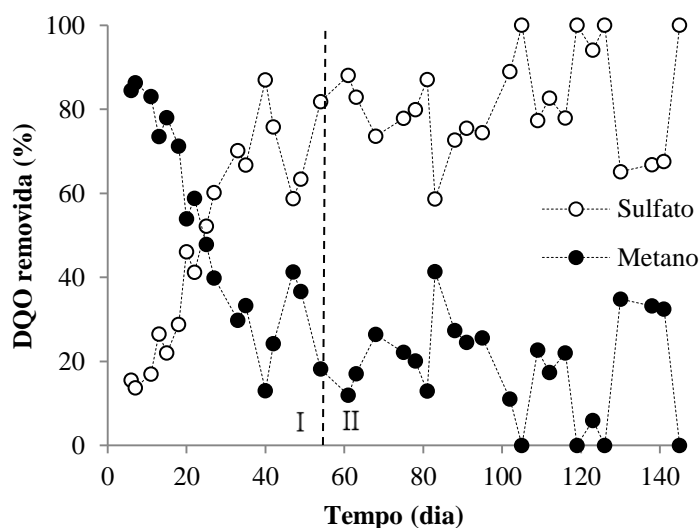


Figura 5.24 Porcentagem da DQO utilizada para redução de sulfato e para a produção de metano no reator alimentado com etanol. Fonte: Do autor.

Podemos observar pela Figura 5.24, a transição do ambiente metanogênico para um ambiente sulfetogênico, onde o fluxo de elétrons é direcionado, na maior parte, para a redução do sulfato. A rota sulfetogênica supera com 25 dias a metanogênica e tende a uma estabilização por volta de 55 dias, fase II de estabilização.

Avaliação das fases de partida e estabilização do reator

A definição das fases de partida (fase I) e estabilização (fase II) balizou-se na análise dos dados referentes à eficiência de remoção de matéria orgânica e sulfato, Figura 5.10 e Figura 5.12, respectivamente, o que permitiu identificar com 55 dias de operação o momento em que o reator atingiu o estado de equilíbrio dinâmico aparente e definir as fases I e II. A definição do período de partida e aclimatação da biomassa inoculada tem sido realizada com base no monitoramento da DQO afluente e efluente dos reatores (RADJARAM e SARAVANANE, 2011) e do sulfato afluente e efluente, nos casos específicos de reatores sulfetogênicos (VAN HOUTEN, *et al.*, 2006).

Além destes parâmetros mencionados, observou-se analisando: a concentração de sulfeto total dissolvido; a concentração de ácido acético; a relação entre os mols de sulfato e etanol utilizados; e a porcentagem de DQO utilizada para conversão de sulfato, expressadas graficamente na Figura 5.11, Figura 5.14, Figura 5.16 e Figura 5.24, respectivamente, que o período de partida definido foi condizente e pode-se também diferenciar as fases I e II nestes gráficos.

Os padrões de lançamento de efluente são regulamentados em esfera nacional pela Resolução CONAMA 430/11. As concentrações máximas de ferro, zinco e cobre, bem como o pH mínimo para lançamento, apresentado na Tabela 5.4, são referentes a esta resolução. Os parâmetros DQO e sulfato, não constam nessa resolução. O padrão de DQO apresentado refere-se ao valor deliberado pelo COPAM – Conselho estadual de política ambiental do estado de Minas Gerais, na Deliberação Normativa Conjunta n.º1/08; e o sulfato pela Resolução CONAMA 357/05, que dispõe sobre a classificação e enquadramento dos cursos d'água.

Tabela 5.4 Caracterização do afluente de efluente do reator alimentado com etanol e os padrões de lançamento.

Parâmetro	Concentração (mg L ⁻¹)		
	Afluente	Efluente	Padrões de lançamento
Ferro	100,0	12,5	15,0
Zinco	20,0	0,3	5,0
Cobre	5,0	0,2	1,0
pH	3,0	5,1	5,0
DQO	1400,0	810,0	180,0
Sulfato	700,0	54,7	250,0
H ₂ S (aq)	-	100,0	1,0

Fonte: Do autor.

Observamos que embora o sistema proposto seja capaz de remover os metais de forma eficiente e atendendo aos padrões de lançamento, há quantidade significativa de matéria orgânica e sulfeto no efluente do reator, em desacordo com os padrões permitidos. Este fato se deve a estratégia de partida adotada, na qual se buscou fornecer etanol suficiente para reduzir todo sulfato e estimular assim, o estabelecimento da rota sulfetogênica. A escolha de uma relação DQO:SO₄²⁻ igual a 2,0, parte do pressuposto que as BRS do grupo das oxidadoras incompletas se estabeleceriam mais facilmente e que uma relação DQO:SO₄²⁻ igual a 1,92 seria a mais adequada para redução completa do sulfato pela oxidação do etanol, vide reação 5.2.2.1.

Dessa forma, um pós – tratamento seria necessário nessa fase de partida, antes do lançamento do efluente. Em uma fase posterior, após a partida e a estabilização da condição imposta, propõe-se uma redução de 50% na relação DQO: SO₄²⁻, buscando reduzir a carga orgânica e o sulfeto no efluente.

Além de um pós - tratamento do efluente líquido, o tratamento do biogás também seria necessário. O sulfeto de hidrogênio foi produzido em concentrações em torno de 47,7 ppm e está acima do permitido pela norma regulamentadora número 15 (NR 15) do Ministério do

Trabalho e Emprego (MTE), que estabelece um limite de 8 ppm para exposição máxima dos trabalhadores e enquadra esta exposição como de grau de insalubridade máxima.

O $\text{H}_2\text{S}_{(\text{gás})}$ pode ser recuperado como enxofre elementar, por meio de técnicas de microaeração, ou ainda ser utilizado para precipitar os metais em solução, antes de entrarem no reator, por meio da recirculação do gás em um sistema fechado e capaz de explorar o potencial reativo do $\text{H}_2\text{S}_{(\text{gás})}$ e do $\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$.

5.2.3 Reator 3

Remoção de matéria orgânica e sulfato

O reator proposto para tratar DASM e alimentado com lactato de sódio, denominado Reator 3, não apresentou remoções significativas de matéria orgânica e sulfato, até o quinquagésimo quinto dia de operação (fase I), e não conseguiu estabelecer condições sulfetogênicas para remoção destes compostos, conforme ilustrado na Figura 5.25.

Aplicou-se um teste t pareado a um nível de significância (α) de 5%. A série de dados foi particionada em duas partes (I e II), a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_1) são:

$$H_{30(I)}: \text{DQO afluente} = \text{DQO efluente}$$

$$H_{31(I)}: \text{DQO afluente} > \text{DQO efluente}$$

O P-Valor encontrado foi igual a 0,22. Como P-Valor $> \alpha$, aceita-se a hipótese de nulidade ($H_{30(I)}$). Dessa forma, podemos afirmar que a microbiota do reator não foi capaz de oxidar o lactato durante a fase I, que durou 55 dias de operação.

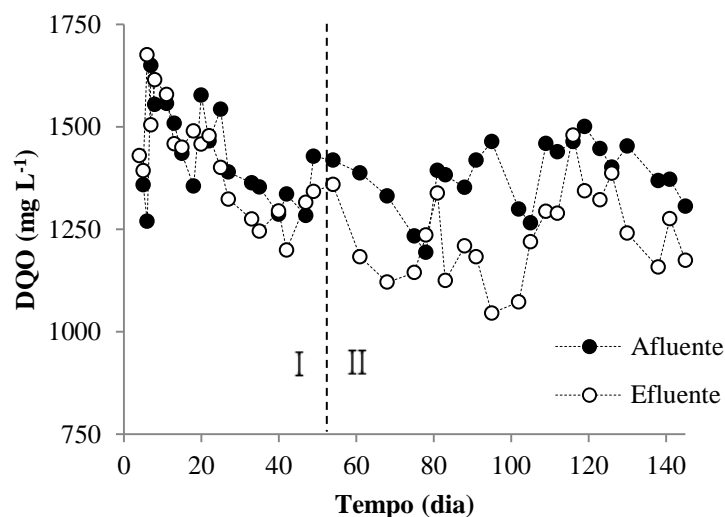


Figura 5.25 Demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

Aplicou-se novamente um teste t pareado a um nível de significância (α) de 5%, para a fase II, a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_1) são:

$H_{30(II)}$: DQO afluente = DQO efluente

$H_{31(II)}$: DQO afluente > DQO efluente

O P-Valor encontrado foi igual a zero. Como $P\text{-Valor} < \alpha$, aceita-se a hipótese alternativa ($H_{31(II)}$). Dessa forma, podemos afirmar que a microbiota do reator foi capaz de oxidar o lactato na fase II, que durou 90 dias.

A eficiência de remoção de matéria orgânica (Figura 5.26), embora discreta, devido à conversão do lactato em ácidos voláteis, apresenta um comportamento na forma de pulso, atingindo um máximo de remoção (19,6%) com 95 dias de operação. Este comportamento foi também observado ao tabularmos os resultados dos demais parâmetros monitorados.

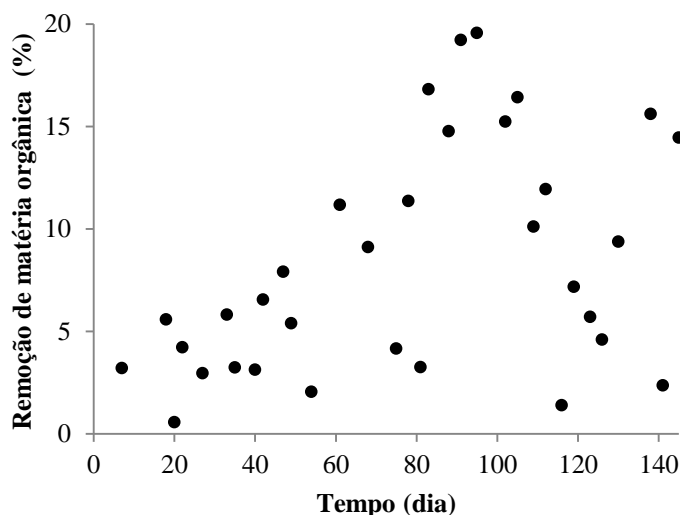


Figura 5.26 Eficiência de remoção de matéria orgânica em função da demanda química de oxigênio (DQO), afluente e efluente do reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

As concentrações de sulfato e sulfeto, efluentes, também apresentaram um comportamento na forma de pulsos. A menor concentração de sulfato e a maior concentração de sulfeto total dissolvido, também foram observadas com 95 dias de operação, como ilustrado na Figura 5.27 e Figura 5.28.

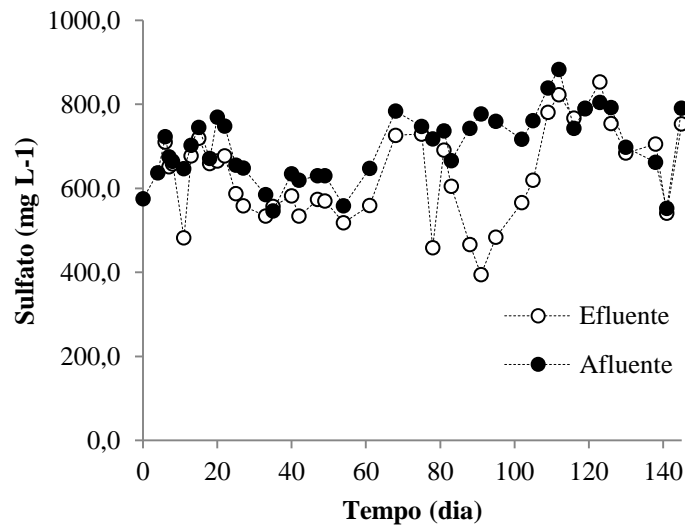


Figura 5.27 Concentrações de sulfato afluente e efluente ao reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

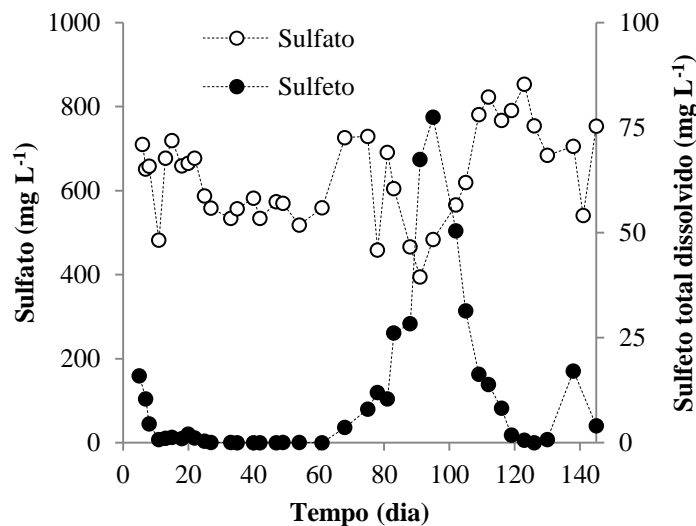


Figura 5.28 Concentrações de sulfato e sulfeto total dissolvido efluente ao reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

O longo período de adaptação da biomassa no reator, até ser observada a conversão do lactato, se deve, entre outros aspectos, ao fato da biomassa não estar adaptada a nova e adversa condição a qual foi submetida. O baixo pH afluente, a nova e única fonte de carbono e a presença dos metais, foram alguns dos fatores que influenciaram negativamente a partida do reator.

Embora o lactato seja considerado uma das melhores fontes de carbono para o crescimento das BRS, por permitir o crescimento de um amplo espectro de BRS, o baixo pH é um fator limitante na utilização dessa fonte, pois o lactato em meio ácido, encontra-se na sua

forma não dissociada, como ácido láctico, que pode ter efeito inibitório ou mesmo letal para as BRS (LENS, 2010).

O ácido láctico pode passar a membrana celular, assim como o ácido acético, e acidificar o citoplasma das células, sendo por esta razão, uma fonte de carbono inapropriada para o crescimento de BRS em baixo pH (SÁNCHEZ-ANDREA *et al.*, 2014; LENS, 2010). Em um pH igual a 3,0, praticamente todo o lactato afluente encontra-se na sua forma protonada, como ácido láctico (88%), considerando um pK igual a 3,8 (Figura 5.29). Contudo, isto não quer dizer que as BRS não podem consumir ácidos orgânicos em baixo pH, afinal, foi observado o estabelecimento de uma microbiota capaz de fermentar o ácido láctico e reduzir o sulfato em $\text{pH} < 5,0$, após um período de adaptação.

Observa-se ainda que o pH da DASM esta na faixa tampão de pH para o ácido láctico. Dessa forma, pode-se inferir que promover alterações no pH do meio, demanda do sistema de tratamento uma elevada produção de alcalinidade, limitando o crescimento da microbiota e dificultando a precipitação do metais.

Alcalinidade, ácidos voláteis e pH

Devido ao fato da biomassa do reator não ter conseguido digerir o lactato na fase I, não se observou alterações no pH efluente, que foi praticamente igual ao pH afluente (Figura 5.30). Alterações no pH podem ser observadas na fase II, quando também se observou alterações na DQO efluente, iniciando a conversão do lactato em ácidos voláteis e a geração de alcalinidade. O pH médio na fase II foi igual a 4,2 (máximo: 4,8 e mínimo: 3,5).

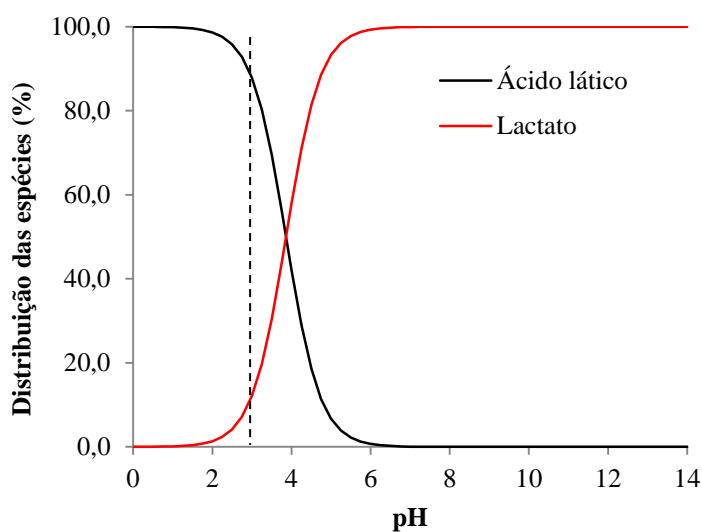


Figura 5.29 Distribuição das espécies de lactato em função do pH. Fonte: Do autor.

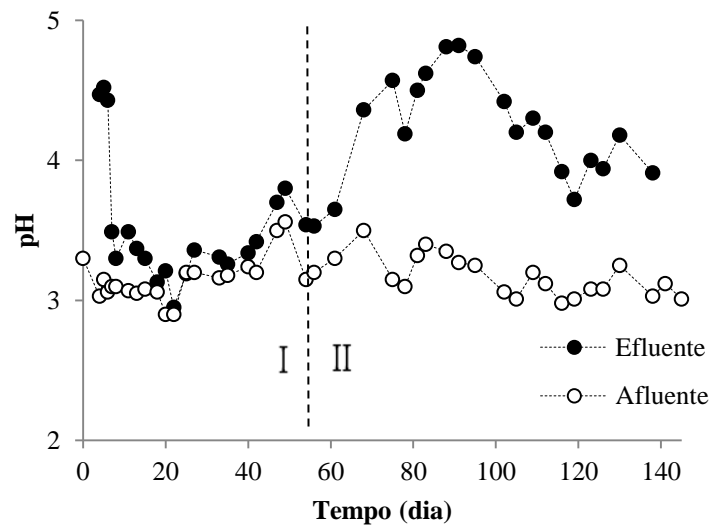


Figura 5.30 Potencial de hidrogênio (pH) afluente e efluente do reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

A produção de ácidos voláteis, principalmente os ácidos acético, propiônico e butírico, são apresentados na Figura 5.31 e Figura 5.32. O acúmulo destes ácidos, foi em parte, responsável pelo aumento do pH efluente, devido a capacidade de tamponamento dos mesmos. As concentrações destes ácidos e as respectivas constantes de dissociação são apresentadas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Concentrações médias dos ácidos, acético, propiônico e butírico (mg L^{-1}), e suas constantes de dissociação, em termos logarítmicos (pKa).

Ácido	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	pKa
Acético	143,1	0,0	567,3	145,0	4,8
Propiônico	241,5	0,0	466,2	163,0	4,9
Butírico	93,5	0,0	205,7	63,8	5,0

Fonte: Do autor.

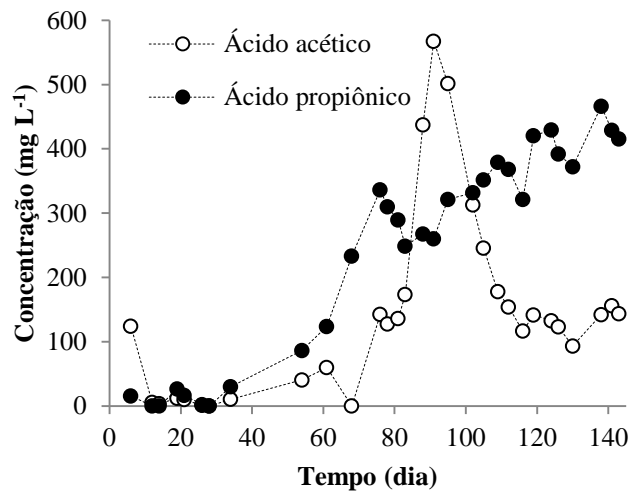


Figura 5.31 Concentração de ácido acético e propiônico no efluente do reator alimentado com lactato.
Fonte: Do autor.

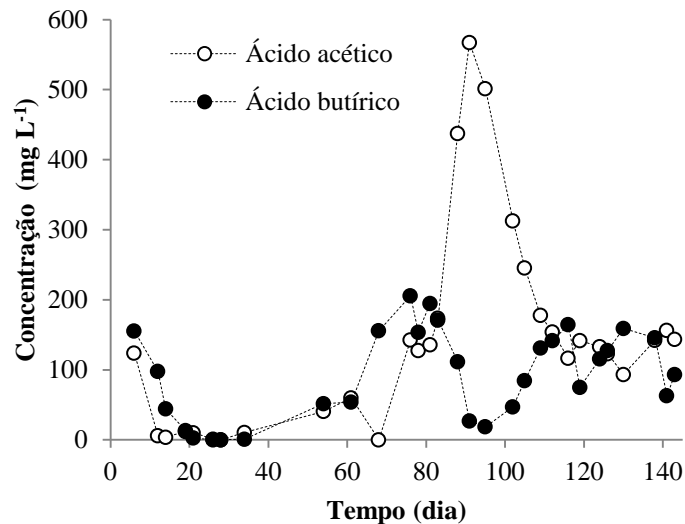


Figura 5.32 Concentração de ácido acético e butírico no efluente do reator alimentado com lactato.
Fonte: Do autor.

O período em que ocorreu o pulso de ácido acético coincidiu com o consumo de sulfato e a produção de sulfeto, indicando que o acetato produzido nessa fase foi em grande parte devido à respiração das BRS. Durante este pulso, observamos uma queda nas concentrações de lactato, ácido propiônico e butírico (Figura 5.32), que foram convertidos, possivelmente, em acetato, pela a respiração das BRS, conforme as reações mostradas na Tabela 5.6 (MUYZER e STAMS, 2008).

Durante o momento de maior produção de acetato, com 95 dias de operação, todo o lactato foi convertido, fornecendo ao sistema, 14,6 mM de lactato, que foram convertidos em ácidos, por meio das rotas fermentativa e sulfetogênica via oxidação incompleta. Ao somarmos os ácidos produzidos nesse ponto, encontramos 13,1 mM de ácidos, que representa

90% do lactato disponível, dessa forma, podemos afirmar que as BRS do grupo das oxidadoras incompletas, foram, preferencialmente, as responsáveis por reduzir 2,9 mM de sulfato por meio do lactato e dos produtos da fermentação.

Contudo, após este pulso, o acetato continuou a ser produzido no reator, em concentrações menores e provenientes somente da fermentação do lactato, houve produção também dos ácidos propiônico e butírico, conforme ilustrado na Figura 5.33.

Tabela 5.6 Reações possíveis de redução do sulfato no reator alimentado com lactato.

Substrato	Produto	ΔG° (Kj/reação)
Propiônico + 0,75 SO_4^{2-}	Acetato + HCO_3^- + 0,75 HS^- + 0,25 H^+	-37,7
Butírico + 0,5 SO_4^{2-}	2Acetato + 0,5 HS^- + 0,5 H^+	-27,8
Lactato + 0,5 SO_4^{2-}	Acetato + HCO_3^- + 0,5 HS^-	-80,2

Fonte: Do autor (Adaptado de Muyzer e Stams, 2008)

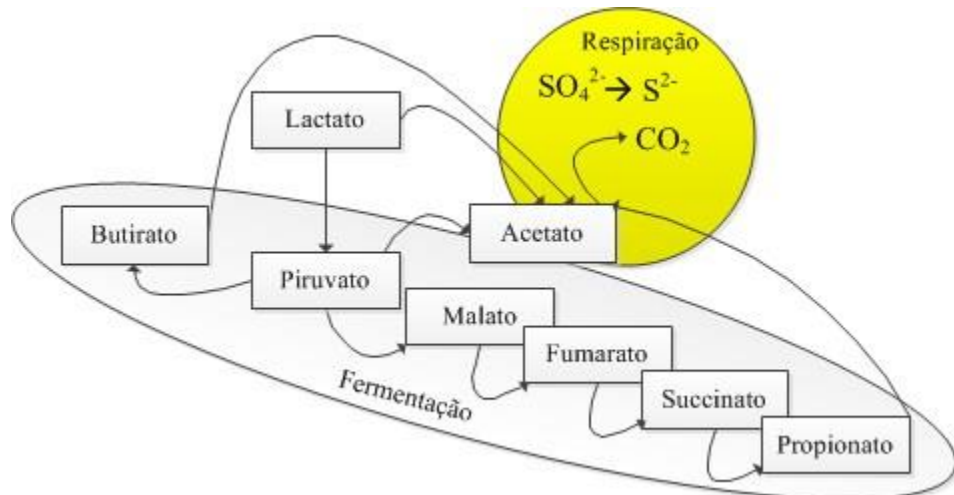
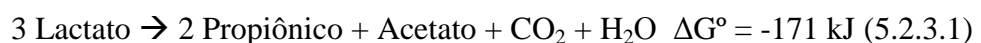


Figura 5.33 Possíveis rotas oxidativas e fermentativas do lactato. Fonte: Do autor (Adaptado de Madigan *et al.*, 2012).

A fermentação do lactato também pode estar sendo realizada por algumas espécies de BRS. Os autores Muyzer e Stams. (2008), discorrem sobre a possibilidade de crescimento fermentativo e acetogênico das BRS e relacionam tal capacidade metabólica com o fato delas estarem presentes em um grande e diverso número de ambientes.

A fermentação do lactato por bactérias produtoras de ácido propiônico, como as *Propionibacterium*, pode ter ocorrido. Afinal, a reação global (5.2.3.1) dessa rota fermentativa é mais favorável que a reação de oxidação do lactato pela sulfetogênese.



A prevalência dessa rota prejudicou o estabelecimento da rota sulfetogênica e promoveu o acúmulo destes ácidos no reator. Os autores Bertolino *et al.*(2012), também

observaram este tipo de fermentação em reator UASB sulfetogênico, com queda na eficiência de conversão do sulfato, constatada em relações DQO:SO₄ > 2,5. A fermentação do lactato vem sendo observada em reatores biológicos operando com uma carga orgânica elevada, ou seja, quando não há aceptores de elétrons (sulfato) suficientes.

As bactérias fermentativas crescem mais rapidamente do que as sulfetogênicas, no entanto, as BRS tem maior afinidade pelo lactato, por isso se observa a prevalência da fermentação em elevadas concentrações de lactato e da respiração em baixas concentrações de lactato (OYEKOLA *et al.*, 2011). Contudo, se considerarmos que 1 mol de lactato demanda 0,5 mol de sulfato para ser oxidado e que na composição da DASM temos 15,5 mM de lactato e 7,29 mM de sulfato, a fermentação prevaleceu no reator, mesmo havendo sulfato suficiente para oxidar o lactato. Possivelmente, devido ao estresse provocado pela DASM, que inibiu a rota sulfetogênica nas condições impostas.

A biomassa inoculada não conseguiu utilizar o lactato para reduzir o sulfato na fase I, possivelmente devido ao baixo pH e a predominância do ácido láctico. Observou-se uma redução do sulfato somente após este período e quando ocorreu a conversão do lactato, devido à respiração dos ácidos produzidos na fermentação (propiónico e butírico).

Fazendo uma analogia entre as fases de crescimento bacteriano e a concentração de sulfeto, podemos observar um longo período de aclimatação (fase *lag*), seguido de uma fase de aceleração e uma fase exponencial. Contudo, a fase de desaceleração e a fase estacionária, não foram observadas, sendo a fase de declínio a fase subsequente, vide Figura 5.28. Se analisarmos a rota fermentativa por meio da mesma analogia, observaremos que a produção de ácido propiónico está em fase de desaceleração e tende a uma fase estacionária, vide Figura 5.31.

Ao relacionarmos o somatório de todos os ácidos produzidos e o lactato consumido (Δ lactato/ \sum Ácidos), podemos observar um comportamento estável na produção dos ácidos, sem haver consumo de sulfato, ou seja, o estabelecimento de uma rota fermentativa (Figura 5.34). A rota oxidativa causou um desvio nessa rota, com pico em 95 dias, mas não se manteve.

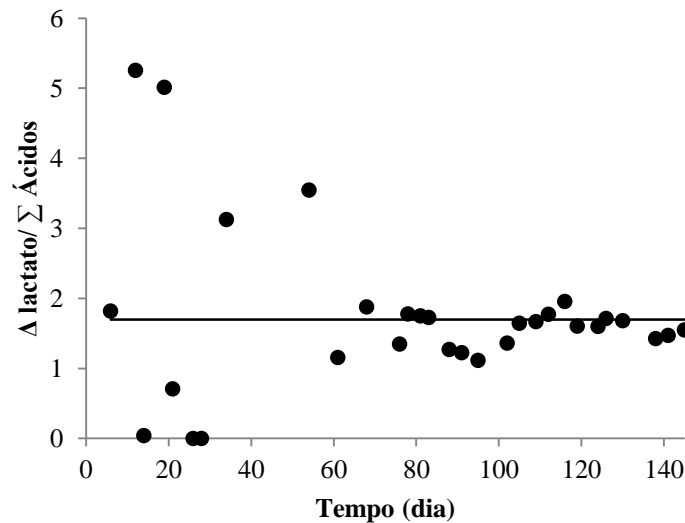


Figura 5.34 Relação entre o consumo de lactato e o somatório dos ácido produzidos, no reator alimentado com lactato. A linha no gráfico representa a média das relações, $\Delta \text{lactato} / \Sigma \text{Ácidos}$, na fase II. Fonte: Do autor.

O período de adaptação dos microrganismos é variável e depende de uma série de fatores, como as características da água residuária, a fonte de carbono e o inóculo utilizado. Pesquisas recentes buscam explicar quais são os mecanismos que controlam estas fases de adaptação supracitadas e como as células podem estimular ou desestimular, de forma coordenada, certos comportamento da microbiota. Um sistema de comunicação célula-a-célula, conhecido como *quorum sensing*, tem sido observado em sistemas biológicos de tratamento, operando com biofilmes ou biomassa granular (SHROUT e NERENBERG, 2012).

O início da fermentação do lactato de forma repentina e após 55 dias de operação, pode estar ligado a este sistema de comunicação, que requer um número mínimo de células (quórum) para iniciar o comportamento *quorum sensing*. Este tempo de aclimação, deve ter sido o tempo necessário para que os sinais bioquímicos (hormônios), emitidos pelas células, estimulassem de forma coordenada a fermentação, caracterizando o chamado *quorum sensing*.

Dentre as espécies de microrganismo capazes de emitir estes sinais bioquímicos e realizarem este tipo de comunicação celular, destacam-se as proteobactérias gram-negativas, grupo em que se enquadram as bactérias capazes de reduzir o sulfato (MUYZER e STAMS, 2008; SHROUT e NERENBERG, 2012). Sendo esta uma evidência que corrobora com a hipótese de *quorum sensing* no sistema e explicaria em parte, o comportamento em forma de pulso na rota sulfetogênica e o estabelecimento da rota fermentativa, que se mostrou mais eficiente em utilizar o lactato.

Remoção dos metais

A avaliação da eficiência de remoção dos metais começou a ser realizada, somente quando o sulfeto começou a ser produzido pelo sistema. As eficiências de remoção de cobre, ferro e zinco, são apresentadas na Figura 5.35.

Durante o período em que ocorreu o pulso de sulfeto, observamos remoções significativas de cobre e zinco, mas uma baixa remoção de ferro até final do experimento. Destaca-se que a eficiência de remoção do cobre foi elevada, mesmo em baixas concentrações de sulfeto, e a do zinco decaiu após o pulso.

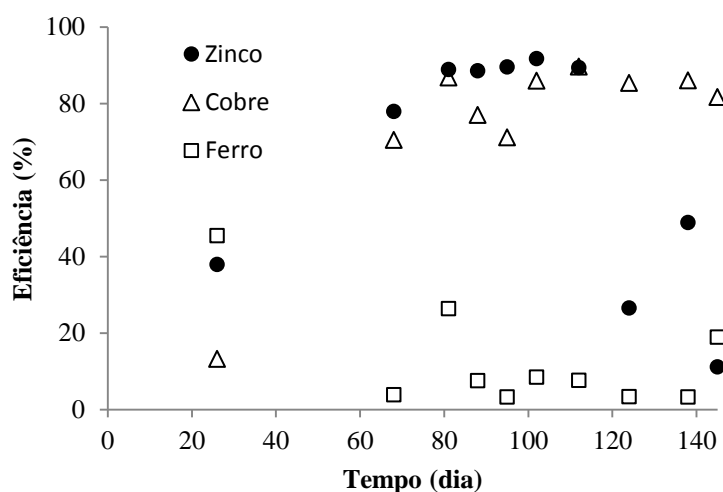


Figura 5.35 Eficiências de remoção de zinco, cobre e ferro no reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

Apenas as concentrações efluentes de cobre atenderam os padrões de lançamento, segundo a Resolução CONAMA 430/11. Durante o período avaliado, as concentrações de zinco atenderam a referida resolução apenas durante o pico de sulfeto e as ferro não atenderam em nenhum momento, como apresentado pela Tabela 5.7.

Tabela 5.7 Concentrações médias dos metais (mg L^{-1}) e a eficiência média de remoção (%) no reator alimentado com lactato.

Metais	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Eficiência (%)
Cobre	1,0	0,5	1,9	0,4	74,7
Zinco	9,9	2,3	27,3	10,1	65,1
Fero	97,1	41,6	135,9	26,8	12,8

Fonte: Do autor.

As baixas eficiências de remoção de ferro podem ser justificadas pelo efeito do pH na solubilidade do sulfeto de ferro. Como apresentado na Figura 5.21, concentrações de Fe^{2+} da

ordem de 100 mg L^{-1} são observadas em pH próximo a 4,0. Dessa forma, mesmo na presença de sulfeto, o ferro ficou em solução no reator, o que justifica as baixas eficiências em comparação com os demais metais. Já com relação ao cobre, observamos que o sulfeto desta espécie é muito insolúvel, justificando sua remoção.

Os pulsos observados podem ter relação com o efeito tóxico e inibitório dos metais. Durante o período em que não ocorreu a conversão do lactato, os metais estavam coordenados com a fonte de carbono, ou seja, não estavam prontamente disponíveis no meio, fazendo com que o efeito tóxico destes metais sobre a biomassa fosse diminuído ou mesmo não observado. Quando ocorreu a conversão do lactato e o consumo dos ácidos produzidos, os metais podem ter sido disponibilizados no meio, principalmente o ferro, que ficou em solução, mesmo com a presença de sulfeto, e podem ter inibido a sulfetogênese que começava a se estabelecer.

Biogás

No biogás coletado no separador trifásico do reator, analisaram-se as concentrações dos gases sulfídrico, carbônico e metano, conforme Figura 5.36 e Figura 5.37. As análises destas concentrações, também evidenciam um comportamento na forma de pulso, diretamente relacionado com a redução biológica do sulfato. Após o período em que ocorreu o pulso de gás sulfídrico, observa-se que produção de CO_2 não cessou, sendo proveniente da continuidade da fermentação do lactato.

O metano foi observado no início, mas as concentrações decaem nos primeiros 20 dias de operação e atingem valores abaixo do limite de detecção. O gás volta a ser detectado após 120 dias de operação, possivelmente, devido a uma atividade metanogênica, possibilitada pelo ligeiro aumento no pH e acúmulo de ácido acético.

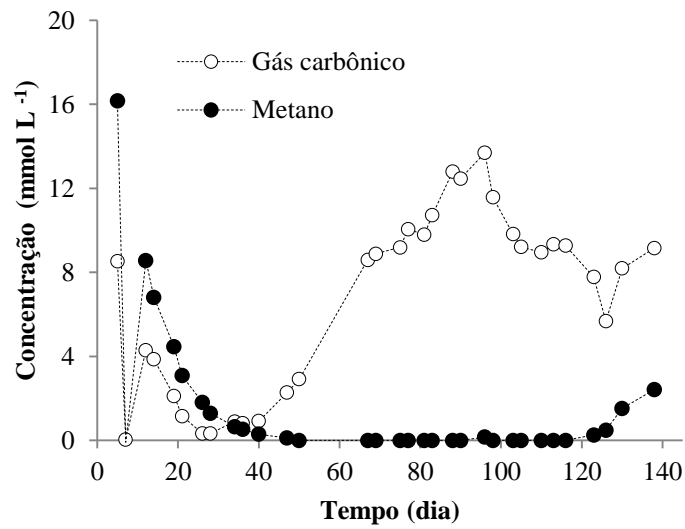


Figura 5.36 Concentração de metano e gás carbônico no *headspace* do reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

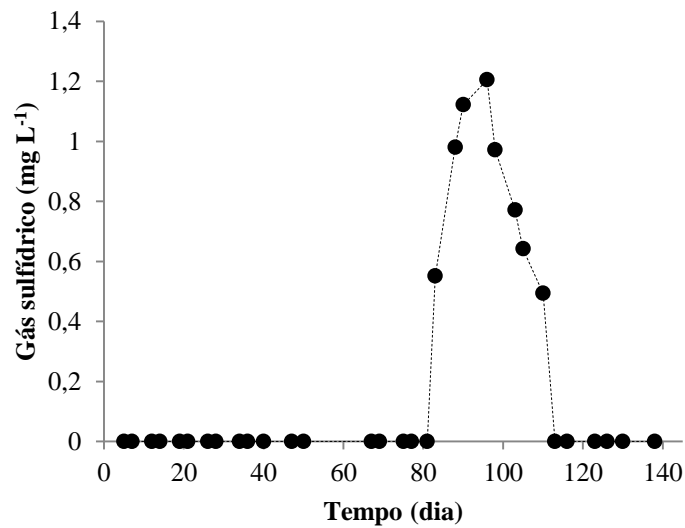


Figura 5.37 Concentração de gás sulfídrico no *headspace* do reator alimentado com lactato. Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÕES

- O etanol foi à fonte externa de carbono mais adequada para partida do reator UASB sulfetogênico, tratando drenagem ácida sintética de mina em pH=3,0. O sistema estabilizou a remoção de sulfato, com eficiências maiores 90%, em 55 dias de operação.
- O etanol foi à fonte externa de carbono mais adequada para a produção de sulfeto biogênico e para uma eficiente remoção dos metais, com remoção média de 96,0% do cobre; 98,4% do zinco e 86,4% do ferro.
- O lactato em meio ácido transformou-se predominantemente em ácido láctico e possivelmente inibiu o estabelecimento de uma rota sulfetogênica, favorecendo a fermentação do lactato após um longo período de adaptação e o acúmulo de ácido acético, butírico e principalmente propiônico, produtos diretos dessa oxidação.
- O acetato em meio ácido transformou-se predominantemente em ácido acético e possivelmente inibiu a digestão anaeróbia. O efeito desacoplador deste ácido levou as células inoculadas ao colapso. A lise das células que sofreram endogenia favoreceu a desestruturação dos grânulos da biomassa inoculada e o aparecimento de fungos.

7 SUGESTÕES

- Caracterizar a biomassa inoculada e identificar as espécies de bactérias redutoras de sulfato presentes.
- Identificar o pH no interior da biomassa granular.
- Avaliar a operação do reator alimentado com etanol em uma relação $DQO:SO_4^{2-}$ igual a 1,0.
- Avaliar a operação do reator alimentado com lactato em uma relação $DQO:SO_4^{2-}$ igual a 2,0 e com correção do pH afluente para 4,0.

REFERÊNCIAS

- AKCIL, A.; KOLDAS, S. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 12-13, p. 1139–1145, jan. 2006.
- ANAWAR, H. M. Impact of climate change on acid mine drainage generation and contaminant transport in water ecosystems of semi-arid and arid mining areas. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 58-60, p. 13–21, jan. 2013.
- ARCHILHA, N. C. et al. Effect of feeding strategy and COD/sulfate ratio on the removal of sulfate in an AnSBBR with recirculation of the liquid phase. **Journal of environmental management**, v. 91, n. 8, p. 1756–65, ago. 2010.
- ASSIS, I. R. **Mitigação da lixiviação de arsênio, ferro e enxofre e revegetação de substratos minerados em área de ocorrência de drenagem ácida**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006. 89p. (Dissertação de Mestrado)
- BARBOSA, L. P., et al. Effects of different COD/Sulfate ratios on the Growth of Metal Tolerant Sulfate Reducing Bacteria (SRB), Biohydrometallurgy: A meeting point between microbial ecology, metal recovery process and environmental remediation. **Proceedings of Biohydrometallurgy**. Bariloche, p. 569-572, 2009.
- BARONOFSKY, J. J.; SCHREURS, W. J.; KASHKET, E. R. Uncoupling by Acetic Acid Limits Growth of and Acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1134–9, dez. 1984.
- BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicaocompilado.htm. Acesso em 20 set. 2013
- BERTOLINO, S. M. et al. Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. **Journal of environmental management**, v. 103, p. 15–23, 30 jul. 2012.
- BERTOLINO, S. M.; VELOSO, T. C.; LEÃO, V. A. **Performance of a lactate-fed UASB reactor treating sulfate containing waters**. In: 11th International Mine Water Association Congress Mine Water Managing the Challenges, 2011, Aachen, Alemanha. p. 277–280, 2011.
- BIJMANS, M. F. M. Sulfate Reduction at pH 5 in a High-Rate Membrane Bioreactor: Reactor Performance and Microbial Community Analyses. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. February, p. 698–708, 2009.
- CABRERA, G. et al. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. **Journal of hazardous materials**, v. 135, n. 1-3, p. 40–6, 31 jul. 2006.
- CASTILLO, J. et al. Biologically-induced precipitation of sphalerite-wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: implications for acid mine drainage treatment. **The Science of the total environment**, v. 423, p. 176–84, 15 abr. 2012.
- CONNELL, DW. 2005. **Basic concepts of environmental chemistry**, , 2nd, Boca Raton: Taylor & Francis.

CHERNICHARO, C. A. DE L., **Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento Biológico de águas residuárias**. DESA/UFMG. Belo Horizonte – MG, v.5, 2007

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 237, de 19 de dezembro de 1997**. Dispõe sobre o licenciamento ambiental. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/new/servicos/legislacaodcaa/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CONAMA%20237_1997%20-%20Licenciamento%20Ambiental.pdf>. Acesso em: 20 set. 2013.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–64, jul. 2008a.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Alterado pela Resolução CONAMA 397/2008. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 18 jun. 2014.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 9 p. Disponível em: <http://www.legislacao.mutua.com.br/pdf/diversos_normativos/conama/2011_CONAMA_RES_430.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2014.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 01, de 23 de janeiro de 1986**. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para o Relatório de Impacto Ambiental – RIMA. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=23>> .Acesso em: 20 set. 2013.

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

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Anaerobic Degradation of Synthetic Wastewaters at Different Levels of Sulfate and COD/Sulfate Ratios in Horizontal-Flow Anaerobic Reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 3, p. 383–393, abr. 2007.

EATON, A. D., et al. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2012.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; haandel, A. Van; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do tratamento anaeróbio, In: CAMPOS, J.R. (Coord.) **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES/PROSAB, 1999. p.29-52.

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

GALLEGOS-GARCIA, M. et al. Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 91–9, 1 jan. 2009.

GLEISNER, M.; HERBERT, R. B.; FROGNER KOCKUM, P. C. Pyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* at various concentrations of dissolved oxygen. **Chemical Geology**, v. 225, n. 1-2, p. 16–29, jan. 2006.

HANLIN, R.T., ULLOA, M.. **Atlas of Introductory Mycology**. Hunter Textbooks, Inc., second edition, 1988. USA.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 7. ed. Brasília, 2012.

ISA, Z.; GRUSENMEYER, S.; VERSTRAETE, W. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 580-587, 1986.

JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, et al. Heavy metals removal from acid mine drainage water using biogenic hydrogen sulphide and effluente anaerobic treatment: Effect of pH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 759-765. 2009

KALYUZHNYI, S.V., DE LEON F., C., RODRIGUEZ M., J.. Biological sulfate reduction in a UASB reactor fed with ethanol as the electron donor. **Microbiologiya** 66, 687–693, 1997.

KIM, G.M., et al. Treatment of synthetic acid mine drainage using rice wine waste as a carbon source. **Environmental Earth Sciences**, 19 out. 2013.

KOSCHORRECK, M., et al. Accumulation and inhibitory effects of acetate in a sulphate reducing in situ reactor for the treatment of an acidic pit lake. **International Mine Water Association**. 101–109, 2004.

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

LENS, P.N.L. **Environmental technologies to treat sulfur pollution: principles and engineering**. IWA Publishing, London, p. 47-85, 2010.

LEWIS, A. E. Review of metal sulphide precipitation. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 2, p. 222–234, set. 2010.

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater tratment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, 67:3–28.1995.

LETTINGA, G.; REBAC, S.; ZEEMAN, G. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. **Trends Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 367-370, 2001.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 5, p. 452–63, 2007.

LINDSAY, M. B. J. et al. Microbiology and Geochemistry of Mine Tailings Amended with Organic Carbon for Passive Treatment of Pore Water. **Geomicrobiology Journal**, v. 28, n. 3, p. 229–241, 21 mar. 2011.

MADIGAN, M.T., et al. **Brock Biology of Microorganisms**, 13th ed., 2012.

MARTINS, M. et al. Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 706–713, 2009.

MELLO, J. W. V.; DIAS, L. E.; CORREA, M. L. T. Drenagem ácida: avaliação do potencial de ocorrência, mitigação e revegetação de substratos sulfetados. In: ALVAREZ V., V. H. et al.; LOPES, A. S.; LIMA, J. M.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; NILTON CURI, N., (Eds). Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v.3. p. 430, 2003.

MOTTERAN, F., PEREIRA, E. L., E CAMPOS, C. M. M.. The behaviour of an anaerobic baffled reactor (abr) as the first stage in the biological treatment of hog farming effluents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, 299–310, 2013.

MORETTIN, P.A., BUSSAB, W.O.. **Estatística básica**. Editora Saraiva, 7ª edição. São Paulo – SP, 540p. 2011

MUDHOO, A.; KUMAR, S. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 1383–1398, 29 jan. 2013.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Norma regulamentadora número 15**.

Dispõe sobre atividades e operações insalubres. Disponível em:

<[http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DF396CA012E0017BB3208E8/NR-15%20\(atualizada_2011\).pdf](http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DF396CA012E0017BB3208E8/NR-15%20(atualizada_2011).pdf)> Acesso em: 05 set. 2014.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews*. **Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–54, jun. 2008.

NAGPAL, S. *et al.* Microbial Sulfate Reduction in a Liquid – Solid Fluidized Bed Reactor. **Biotechnology and Bioengineering** 70(4):370-80, Nov. 2000.

NOYOLA, A.; MORGAN-SAGASTUME, J. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. E. Treatment of Biogas Produced in Anaerobic Reactors for Domestic Wastewater: Odor Control and Energy/Resource Recovery. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 5, n. 1, p. 93–114, fev. 2006.

OHMURA, N. et al. Anaerobic Respiration Using Fe^{3+} , S^0 , and H_2 in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* Anaerobic Respiration Using Fe^{3+} , S^0 , and H_2 in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n.8, p. 2081–2087, abr. 2002.

OYEKOLA, O. O.; HILLE, R. P. VAN; HARRISON, S. T. L. Kinetic Description of the Competitive Interaction between Lactate Oxidizers and Fermenters in a Biosulfidogenic System. **Chemical Engineering Science**, v. II, p. 19–21, 2011.

PAGNANELLI, F., et al. Biotreatment of Cr(VI) contaminated waters by sulphate reducing bacteria fed with ethanol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 186-192, 2012.

RADJARAM, B.; SARAVANANE, R. Start up study of UASB reactor treating press mud for biohydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2721–2728, jul. 2011.

RASOOL, K.; WOO, S. H.; LEEA, D. S. Simultaneous removal of COD and Direct Red 80 in a mixed anaerobic sulfate-reducing bacteria culture. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 611-616, 2013.

RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D. I.; SINGH, G. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource technology**, v. 143, p. 632-41, set. 2013.

REN, N. et al. Effects of COD / SO₄²⁻ - Ratios on an Acidogenic Sulfate-Reducing Reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, p. 1661-1666, 2007. nd. 2007.

RINZEMA, A.; LETTINGA, G. The effect of sulphide on the anaerobic degradation of propionate. **Environmental Technology Letters**, v. 9, n. 2, p. 83-88, fev. 1988.

RIPPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

RODRIGUEZ, R. P., et al. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 74, p. 48-53, 2012.

SAMPAIO, R. M. M. et al. Selective precipitation of Cu from Zn in a pH controlled continuously stirred tank reactor. **Journal of hazardous materials**, v. 165, n. 1-3, p. 256-65, 15 jun. 2009.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, n. 3, p. 98-109, 2014.

SANI, R. K.; PEYTON, B. M.; BROWN, L. T. Copper-Induced Inhibition of Growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20 : Assessment of Its Toxicity and Correlation with Those of Zinc and Lead Copper-Induced Inhibition of Growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20 : Assessment of Its Toxicity and Correla. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4765-4772, 2001.

SHEORAN, A. S.; SHEORAN, V.; CHOUDHARY, R. P. Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. **Minerals Engineering**, v. 23, n. 14, p. 1073-1100, nov. 2010.

SHROUT, J. D.; NERENBERG, R. Monitoring bacterial twitter: does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 4, p. 1995-2005, 21 fev. 2012.

SILVA, L. F. O., et al. Brazilian coal mining residues and sulphide oxidation by Fenton's reaction: An accelerated weathering procedure to evaluate possible environmental impact. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 516-525, 2011.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment**. Nashville: Archae Press, p. 394, 1996.

STEPHENSON, R. J.; BRANION, R. M.; PINDER, K. L. Anaerobic 35° C and 55° C treatment of a BCTMP/TMP effluent: sulphur management strategies. **Water Science and Technology**, v. 29, p. 433-445, 1994.

TSUKAMOTO, T. K.; KILLION, H. A.; MILLER, G. C; Column experiments for microbial treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-ph and matrix investigations. **Water Research**, v. 38, p. 1405-1418, 2004.

VAN HOUTEN, B. H. G. W. et al. Occurrence of methanogenesis during start-up of a full-scale synthesis gas-fed reactor treating sulfate and metal-rich wastewater. **Water research**, v. 40, n. 3, p. 553–60, fev. 2006.

WIDDEL, F.. Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. In: A.Zehnder (ed.) **Biology of Anaerobic Microorganisms**. Wiley, New York, p. 469-585, 1988.