UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

GUILHERME SALVADOR PERES NETO

EFEITO DE METAIS PESADOS EM REATORES SULFETOGÊNICOS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DOADORES DE ELÉTRONS PRONTAMENTE DISPONÍVEIS E DE LENTA LIBERAÇÃO

Araraquara

2025

GUILHERME SALVADOR PERES NETO

EFEITO DE METAIS PESADOS EM REATORES SULFETOGÊNICOS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DOADORES DE ELÉTRONS PRONTAMENTE DISPONÍVEIS E DE LENTA LIBERAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Tratamento de águas residuárias

Orientadora: Profa. Dra. Denise Bevilaqua

Coorientadora: Profa. Dra. Rachel Biancalana Costa

Araraquara

2025

P437e

Peres Neto, Guilherme Salvador
Efeito de metais pesados em reatores sulfetogênicos: uma análise comparativa entre doadores de elétrons prontamente disponíveis e de lenta liberação / Guilherme Salvador Peres Neto. -- Araraquara, 2025
86 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Denise Bevilaqua
Coorientadora: Rachel Biancalana Costa

1. Biorremediação. 2. Drenagem ácida de minas. 3. Biorreatores. 4. Metais pesados. 5. Planejamento experimental. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Efeito de metais pesados em reatores sulfetogênicos: uma análise comparativa entre doadores de elétrons prontamente disponíveis e de lenta liberação"

AUTOR: GUILHERME SALVADOR PERES NETO
ORIENTADORA: DENISE BEVILAQUA
COORIENTADORA: RACHEL BIANCALANA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:

Profª. Drª. DENISE BEVILAQUA (Participaçao Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Organica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. ADRIANA FERREIRA MALUF BRAGA (Participaçao Virtual)
Grange Animal & Grassland Research and Innovation Centre / Teagasc - Carlow - Irlanda

Prof.ª Dr.ª LORENA OLIVEIRA PIRES (Participaçao Presencial)
Departamento de Engenharia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 19 de agosto de 2025

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este trabalho impacta diretamente nas pesquisas sobre tratamento e recuperação de metais de drenagens ácidas de minas. Ao demonstrar como o substrato influencia o efeito dos metais pesados e a produção de sulfeto, possibilita novos estudos sobre a seleção de substratos de acordo com a composição do resíduo. Além disso, contribui para tecnologias limpas, recuperação de recursos e gestão ambiental, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis (ODS) 6, 9 e 12.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This work directly impacts research on the treatment and recovery of metals from acid mine drainage. By demonstrating how the substrate influences the effect of heavy metals and sulfide production, it enables new studies on substrate selection according to waste composition. Furthermore, it contributes to clean technologies, resource recovery, and environmental management, aligning with Sustainable development goals (SDGs) 6, 9, and 12.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	GUILHERME SALVADOR PERES NETO 11/04/1999
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	PERES NETO, G. S.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Bioquímica e Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 993508229
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/1299536353609205
ORCID	URL
outro identificador	URL
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2017/2022	Licenciatura em Química – Licenciado em Química
2024/2024	Bolsa de estágio e pesquisa no exterior (BEPE) – Universidade de Galway, Irlanda
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
PERES NETO, G. S.; COSTA, R. B.; LENS, P. L. N.; BEVILAQUA, D. Biostimulation with lactate as co-substrate in sulfidogenic bioreactors fed with brewery spent grain for acid mine drainage treatment. In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2024, Campinas. Apresentação de pôster. PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 29° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2020, São Carlos. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 29º SIICUSP, 2021. PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 33° Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020, Araraquara. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 33º CIC, 2021.	

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 28° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2020, São Carlos. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 28º SIICUSP, 2020.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 28° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2020, São Carlos. Trabalhos Apresentados na 2ª Fase do 28º SIICUSP, 2020.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 32° Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020, Araraquara. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 32º CIC, 2020.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 32° Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020, Araraquara. Trabalhos Apresentados na 2ª Fase do 32º CIC, 2020.

PERES NETO, G. S; MORALLES, V. A; BEVILAQUA, D. Química Ambiental: poluição e recuperação de metais pesados. Araraquara: Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2025.

OPINI, M. M; PERES NETO, G. S; BEVILAQUA, D. Minérios do amanhã: a jornada rumo a sustentabilidade. Araraquara: Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2025.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

Bancas de trabalhos de conclusão

Orientações

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

PERES NETO, G. S.; COSTA, R. B.; LENS, P. L. N.; BEVILAQUA, D. Biostimulation with lactate as co-substrate in sulfidogenic bioreactors fed with brewery spent grain for acid mine drainage treatment. In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2024, Campinas. Apresentação de pôster.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 29° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2020, São Carlos. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 29º SIICUSP, 2021.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 33° Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020, Araraquara. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 33º CIC, 2021.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 28° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2020, São Carlos. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 28º SIICUSP, 2020.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 28° Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2020, São Carlos. Trabalhos Apresentados na 2ª Fase do 28º SIICUSP, 2020.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 32° Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020, Araraquara. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do 32º CIC, 2020.

PERES NETO G. S.; COSTA, R. B. ; BEVILAQUA, D. . Bagaço de cana de açúcar como substrato para recuperação de metais. In: 32° Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2020, Araraquara. Trabalhos Apresentados na 2ª Fase do 32º CIC, 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por todo apoio para que eu pudesse me dedicar aos meus objetivos. Especialmente agradeço minha mãe por sempre me dar o suporte necessário e me incentivar nos estudos e perseguir meu real sonho. À minha namorada Ariane, por ser um porto seguro, sempre me acolhendo com amor e apoio.

Agradeço também meu grupo de pesquisa do instituto de química Bioprocessos aplicados a mineração e ao meio ambiente (BAMMA), por toda bagagem e ensinamentos durante esses quase seis anos. Agradeço a professora Denise Bevilaqua pela oportunidade de trabalhar nessa pesquisa, por todo apoio acadêmico e emocional. Minha coorientadora Rachel Biancalana Costa por toda sua dedicação no meu projeto, correções e puxadas de orelha necessárias. Gostaria também de agradecer o professor Piet Lens da Universidade de Galway por me proporcionar uma experiência tão gratificante em uma universidade estrangeira.

Agradeço a UNESP e ao Instituto de Química de Araraquara por minha formação. Um agradecimento a parte para a professora Kelly Johanna Dussán Medina pela ajuda com o tratamento dos dados da minha pesquisa.

Agradeço a FAPESP pelo financiamento do meu projeto de mestrado (Processo FAPESP 2023/03148-0) e também pela bolsa de estágio e pesquisa no exterior (BEPE) (Processe FAPESP 2023/16400-0). O presente trabalho também teve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui, afinal, nenhuma conquista importante é feita de forma solitária.

“Se você vai ter que conviver com você mesmo até o fim,
se você vai ter que se aguentar até o fim,
se você vai ser espectador de você mesmo até o fim,
é melhor que se encante com o que faz.”

(Clóvis de Barros Filho)

RESUMO

O tratamento e recuperação de metais de drenagens ácidas de minas (DAM) usando bactérias redutoras de sulfato (BRS) é promissor, mas a formação de partículas finas dificulta sua aplicação em larga escala. Afinal, quanto menores as partículas, mais difícil se torna separar os cristais por métodos físicos como filtração. Materiais lignocelulósicos (ML) como doadores de elétrons de lenta liberação (DELL) buscam contornar esse problema, promovendo a formação de precipitados de sulfetos metálicos maiores e diminuindo o custo do processo. Este trabalho investigou o uso de ML em duas etapas complementares. Primeiramente, buscou-se analisar e comparar o efeito de metais (Fe, Cu, Co, Ni, Zn) em diferentes substratos utilizando planejamento experimental. Um *design* Plackett-Burman selecionou os metais influentes na produção de sulfeto com bagaço de cana de açúcar (BCA) como substrato. Em sequência, um planejamento fatorial fracionário (PFF) foi empregado com os metais selecionados (zinco e ferro) em reatores alimentados com BCA ou um *mix* de doadores de elétrons (lactato, glicerol, sacarose). O cobre também foi testado mesmo não sendo significativo na primeira etapa por se tratar de um metal comumente associado as DAM. Para o BCA, ferro e zinco apresentaram efeitos significativos (p-valor = 0,000001 e 0,01, respectivamente), enquanto o cobre apresentou um efeito não significativo. Para o *mix*, os três metais testados foram significativos. Zinco, cobre e ferro (p-valor respectivamente 0,00003, 0,0007 e 0,003). Esta etapa revelou como o tipo de substrato modula a influência e o efeito dos metais nos biorreatores, O BCA apresentou maior produção de sulfeto em todas as condições. Na segunda etapa, foram operados dois reatores contínuos de leito estruturado e fluxo descendente. Grão gasto de cevada (GGC) foi o DELL e material suporte. Para o reator (R_{GGC}), GCC foi a única fonte de carbono, enquanto no outro ($R_{co\text{-}sub}$), lactato foi adicionado como co-substrato para avaliar a bioestimulação das bactérias redutoras de sulfato. Na fase inicial, o $R_{co\text{-}sub}$ exibiu maior produção de sulfeto (150.0 mg L^{-1}) e potencial redox mais favorável (-250 mV) comparado ao R_{GGC} (90.0 mg L^{-1} e -100 mV), mantendo superioridade mesmo sob exposição a 50 mg L^{-1} de cobre e zinco. A análise microbiana 16S rRNA indicou enriquecimento de BRS em ambos os reatores, com dominância de bactérias fermentativas. Os resultados demonstram que o substrato usado pode influenciar a toxicidade dos metais nos reatores e que o uso de um co-substrato associado a um DELL pode facilitar o processo sulfetogênico nas fases iniciais. A pesquisa também mostrou que nas condições estudadas o bagaço de cana de açúcar foi mais eficiente na redução de sulfato do que o *mix* usado.

Palavras-chave: redução biológica de sulfato; drenagens ácidas de mina; bioestimulação; metais pesados;

ABSTRACT

The treatment and recovery of metals from acid mine drainage (AMD) using sulfate-reducing bacteria (SRB) is promising; however, the formation of fine particles hinders its large-scale application. Indeed, the smaller the particles, the more difficult it becomes to separate crystals through physical methods such as filtration. Lignocellulosic materials (LM) as slow-release electron donors (SRED) aim to overcome this issue by promoting the formation of larger metal sulfide precipitates and reducing process costs. This study investigated the use of LM in two complementary stages. First, the effect of metals (Fe, Cu, Co, Ni, Zn) on different substrates was analyzed and compared using experimental design. A Plackett–Burman design was applied to identify the metals influencing sulfide production with sugarcane bagasse (SB) as substrate. Subsequently, another fractional factorial design (FFD) was performed with the selected metals (zinc and iron) in reactors fed with SB or a mix of electron donors (lactate, glycerol, sucrose). Copper was also tested, despite being non-significant in the first stage, due to its common occurrence in AMD. For SB, iron and zinc showed significant effects (p-value = 0.000001 and 0.01, respectively), whereas copper had a non-significant effect. For the mix, all three tested metals were significant: zinc, copper, and iron (p-value = 0.00003, 0.0007, and 0.003, respectively). This stage revealed how the type of substrate modulates the influence and effect of metals in the bioreactors. Reactors with SB exhibited higher sulfide production under all conditions. In the second stage, two continuous downflow structured-bed reactors were operated. Brewer's spent grain (BSG) was used as both SRED and support material. For one reactor (R_{BSG}), BSG was the sole carbon source, while in the other ($R_{co\text{-}sub}$), lactate was added as a co-substrate to assess biostimulation of sulfate-reducing bacteria. In the initial phase, $R_{co\text{-}sub}$ exhibited higher sulfide production (150.0 mg L^{-1}) and a more favorable redox potential (-250 mV) compared to R_{BSG} (90.0 mg L^{-1} and -100 mV), maintaining superiority even under exposure to 50 mg L^{-1} of copper and zinc. The 16S rRNA microbial analysis indicated SRB enrichment in both reactors, with dominance of fermentative bacteria. The results demonstrate that the substrate employed can influence metal toxicity in the reactors and that the use of a co-substrate in association with an SRED can facilitate the sulfidogenic process in the early stages. The study also showed that, under the conditions evaluated, sugarcane bagasse was more efficient in sulfate reduction than the tested donor mix.

Keywords: biological sulfate reduction; acid mine drainage; biostimulation; heavy metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da lignocelulose formada por celulose, hemicelulose e lignina 22
Figura 2. Desenho experimental da metodologia usada para estudo do efeito dos metais nos biorreatores sulfetogênicos 29
Figura 3. Gráfico de Pareto com efeito dos metais no ensaio Plackett-Burman 30
Figura 4. Gráfico de Pareto com efeitos dos metais na primeira semana do ensaio Plackett-Burman. 32
Figura 5. Produção de sulfeto durante o ensaio PFF, a composição de cada condição está apresentada na Tabela 3. 33
Figura 6. Gráfico de Pareto com os efeitos para o BCA como substrato para o período total do ensaio PFF. 36
Figura 7. Gráfico de Pareto com os efeitos dos metais na primeira semana com o BCA como substrato. Fonte: próprio autor 37
Figura 8. Gráfico de valores observados x valores previstos para o BCA como substrato Fonte: próprio autor 37
Figura 9. Gráfico de Pareto com os efeitos na primeira semana com o *mix* como substrato ... 39
Figura 10. Variação do pH durante o ensaio PFF nas diferentes condições apresentadas na Tabela 3. 40
Figura 11. (A) principais constituintes da hemicelulose e sua estrutura química, (B) principais componentes da lignina (Lee, Hamid e Zain, 2014) e (C) estrutura linear da celulose (Donini *et al.*, 2010). 43
Figura 12. Estrutura dos reatores e arranjo do material de suporte. (A) Reator R_{GGC} durante a operação. (B) Pacotes de GGC e o suporte estrutural usado para seu arranjo dentro dos reatores. 53
Figura 13. Desenho experimental da operação dos biorreatores contínuos. 55
Figura 14. Análises físico-químicas da operação do reator $R_{co\text{-}sub}$ (Esquerda) e do reator R_{GGC} (Direita). (A, B) Produção de sulfeto. (C, D) Redução de sulfato. 58
Figura 15. Análises físico-químicas da operação do reator $R_{co\text{-}sub}$ (Esquerda) e do reator R_{GGC} (Direita). (A, B) Potencial de oxirredução (Eredox). (C, D) pH. 59
Figura 16. Análises físico-químicas da operação do reator $R_{co\text{-}sub}$ (esquerda) e do reator R_{BSG} (direita). (A, B) Demanda química de oxigênio total (DQOt). (C, D) Demanda química de oxigênio solúvel (DQOs). (E) Perfil de ácidos graxos voláteis (AGVs) em cada fase. Entrada e saída 1 ($R_{co\text{-}sub}$) e entrada e saída 2 (R_{BSG}). 61

Figura 17. Perfil de sulfato, sulfeto e AGVs no teste de atividade. Teste de atividade antes do contato da biomassa com metais (A) e após o contato com metais (B). Perfil de AGVs antes do contato da biomassa com metais (esquerda) e após o contato com metais (direita) (C). 66
Figura 18. Produção de AGVs no ensaio relação Substrato/Sulfato nas condições com diferentes massas de GGC (4, 8, 15, 25 e 35 g de GGC). 67
Figura 19. Perfil de sulfeto (A), DQOs (B) e açúcares totais (C), para o ensaio substrato/sulfato. 69
Figura 20. Análise físico-química do ensaio de pré-tratamento do inóculo. (A) Produção de sulfeto. (B) Redução de sulfato. (C) pH. (D) DQOs. (E) Perfil de AGVs. GGC (condição sem inóculo), LNT (lodo não triturado) e LT (lodo triturado)..... 70
Figura 21. Abundância relativa da comunidade microbiana encontrada nos reatores e no lodo granular anaeróbio. 72
Figura 22. Imagens de MEV e análise EDX do material de suporte do reator Rco-sub ao final da operação. A, Comunidade microbiana no material de suporte (GGC), com as setas indicando algumas das bactérias aderidas. B, Partícula com aspecto cristalino próxima à comunidade microbiana aderida. C, EDX da partícula encontrada 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica de algumas biomassas lignocelulósicas. 21

Tabela 2 - Matriz usada para o ensaio Plackett-Burman com as concentrações dos metais em cada condição, valores expressos em mg L^{-1} 26

Tabela 3 - Matriz usada para montagem dos reatores no ensaio PFF 27

Tabela 4 - Dados brutos usados para análise estatística do ensaio PFF indicando as 24 corridas únicas. O substrato 1 representa o BCA e o substrato 2 representa o mix de doadores de elétrons. 34

Tabela 5 - ANOVA para o BCA como substrato no ensaio PFF. 35

Tabela 6 - ANOVA para o mix como substrato no ensaio PFF. 38

Tabela 7 - Teste "t" comparando as melhores condições de cada substrato em relação a concentração (mg L^{-1}) máxima de sulfeto. 41

Tabela 8 - Concentrações de cobre e zinco encontradas na literatura 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGVs – Ácidos graxos voláteis

AM – Arqueias metanogênicas

BCA – Bagaço de cana de açúcar

BRS – Bactérias redutoras de sulfato

DAM – Drenagem ácida de minas

DELL – Doador de elétrons de lenta liberação

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DQOs - Demanda Química de Oxigênio solúvel

DQOt - Demanda Química de Oxigênio total

EDX – Energia dispersiva de raio-X

Eredox - Potencial de oxirredução

GGC – Grão gasto de cevada

ML – Material lignocelulósico

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO JUSTIFICATIVA 18

CAPÍTULO 1. ANÁLISE DO EFEITO DOS METAIS FE, CU, ZN, NI E CO NA PRODUÇÃO DE SULFETO EM REATORES SULFETOGÊNICOS ABASTECIDOS COM DIFERENTES DOADORES DE ELÉTRONS. 20

2 INTRODUÇÃO 20

3 OBJETIVOS 25

3.1 OBJETIVO GERAL: ANALISAR O EFEITO DOS METAIS FE, CU, NI, ZN E CO, EM REATORES SULFETOGÊNICOS ABASTECIDOS COM DIFERENTES DOADORES DE ELÉTRONS, CHECANDO COMO A PRODUÇÃO DE SULFETO É IMPACTADA. 25

3.1.1 Objetivos específicos: 25

4 MATERIAIS E MÉTODOS 26

4.1 FONTE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E INÓCULO 26

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 26

4.3 MATRIZ PLACKETT-BURMAN 26

4.4 MATRIZ PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{3-1} (PFF) 27

4.5 SOLUÇÃO DOS METAIS PESADOS 28

4.6 EFEITO DOS METAIS EM REATORES ABASTECIDOS COM BCA 28

4.7 EFEITO DOS METAIS NOS REATORES ABASTECIDOS COM DIFERENTES DOADORES DE ELÉTRONS. 29

5 RESULTADOS 29

5.1 PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN: EFEITO DOS CINCO METAIS NOS REATORES ALIMENTADOS COM BCA 29

5.2 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DOS METAIS EM REATORES SULFETOGÊNICOS ABASTECIDOS COM DIFERENTES DOADORES DE ELÉTRONS NO ENSAIO PFF 32

5.2.1 Análise dos efeitos dos metais usando o BCA como substrato 35

5.2.2 Análise dos efeitos dos metais usando o *mix* como substrato 38

CONCLUSÃO 44

REFERÊNCIAS 45

CAPÍTULO 2. BIOESTIMULAÇÃO COM LACTATO EM REATORES SULFETOGÊNICOS PARA TRATAMENTO DE DRENAGENS ÁCIDAS DE MINAS. 50

1 INTRODUÇÃO 50
2 OBJETIVOS 51
2.1 OBJETIVO GERAL: AVALIAR O ESTABELECIMENTO DO PROCESSO SULFETOGÊNICO NA FASE INICIAL DE UM REATOR CONTÍNUO, FORNECENDO UM DOADOR DE ELÉTRONS DE LIBERAÇÃO LENTA (DELL) E UM CO-SUBSTRATO DE BAIXO PESO MOLECULAR 51
2.1.1 Objetivos específicos: 51
3 MATERIAIS E MÉTODOS 51
3.1 ORIGEM E PREPARO DA BIOMASSA 51
3.2 MEIO BASAL E DAM SINTÉTICA 52
3.3 REATORES CONTÍNUOS 52
3.4 TESTE DE ATIVIDADE MICROBIANA 53
3.5 ENSAIOS EM BATELADA 53
3.6 *DESIGN* EXPERIMENTAL 54
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS 55
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 56
3.9 AMOSTRAGEM E ANÁLISE DE DNA 56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
4.1 OPERAÇÃO DOS REATORES CONTÍNUOS 57
4.1.1 Fase de inoculação e aclimatação (Fase I) 57
4.1.2 Fase II: alteração da composição do meio de cultura 61
4.1.2.1 Fase IIa: omissão do extrato de levedura e diminuição da carga de cisteína. 61
4.1.2.2 Fase IIb: reintrodução da cisteína nos valores iniciais de 500 mg L^{-1} 63
4.1.3 Fase III: adição de metais ao meio de cultivo (DAM sintética) 64
4.1.3.1 Fase IIIa: adição de 10 mg L^{-1} de cobre e zinco ao sistema 64
4.1.3.2 Fase IIIb: adição de 50 mg L^{-1} de cobre e zinco ao sistema 64
4.2 TESTE DE ATIVIDADE MICROBIANA 66
4.3 TESTES EM REATORES BATELADA 67
4.3.1 Teste de relação substrato/SO_4^{2-} 67
4.3.2 Teste de pré-tratamento no inóculo 69
4.4 ANÁLISE DO DNA NO INÓCULO INICIAL E NA BIOMASSA DOS REATORES CONTÍNUOS 71
4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 74
CONCLUSÃO 75

REFERÊNCIAS.....77
APÊNDICE A.....83

1 INTRODUÇÃO JUSTIFICATIVA

O trabalho aqui apresentado propõe um estudo para identificar se a mudança de substrato poderia afetar o efeito que os metais infligem nos reatores sulfetogênicos. Afinal, há na literatura da área uma lacuna sobre o entendimento dos metais e seus efeitos sobre as bactérias redutoras de sulfato, principalmente em culturas enriquecidas. Como trabalhamos com materiais lignocelulósicos, no caso deste trabalho o bagaço de cana de açúcar, a ideia foi comparar seu uso com um mix de doadores de elétrons de baixo peso molecular (glicerol, lactato e sacarore). O mix foi escolhido com base no trabalho da coorientadora desta pesquisa Profª. Drª. Rachel B. Costa para que fosse possível também comparar os resultados com o seu artigo publicado. No artigo em questão os resultados mostraram que o consórcio microbiano alimentado com o mix apresentou uma comunidade microbiana mais robusta em relação aos metais pesados testados, comparado com os reatores abastecidos com os substratos de forma isolada.

A segunda parte do trabalho foi pensada com base em trabalhos que mostraram que fazer o processo de aclimatação dos microrganismos já de forma contínua, pode favorecer o crescimento de bactérias mais resistentes ao resíduo a ser tratado e a mudanças como pH, TRH e temperatura. Evitando também o processo de *washout* que pode ocorrer quando se parte de uma batelada para um sistema continuo. Dessa forma, por se tratarem da mesma temática e apresentarem objetivos complementares, os trabalhos foram separados em dois capítulos:

O primeiro capítulo da dissertação buscou analisar se a escolha do substrato pode afetar o efeito dos metais sobre os microrganismos sulfato redutores nos biorreatores. Para isso, com auxílio de ferramentas e modelos estatísticos, incluindo o planejamento Plackett-Burman e o planejamento fatorial fracionário, comparou-se o uso do bagaço de cana de açúcar (BCA) com um *mix* de doadores de elétrons de baixo peso molecular (lactato, glicerol e sacarose). Os efeitos dos metais foram então analisados e comparados, identificando qual substrato foi superior na produção de máxima sulfeto. Os metais cobre, zinco, ferro, níquel e cobalto foram escolhidos por serem usualmente estudados pela literatura especializada.

O segundo capítulo testou a hipótese de que o uso de um co-substrato prontamente disponível como doador de elétrons poderia bioestimular as bactérias redutoras de sulfato. Para tanto, foram operados dois reatores contínuos de leito estruturado e fluxo descendente: um com grão gasto de cevada (GGC) como única fonte de carbono (R_{GGC}) e outro com adição de lactato como co-substrato ($R_{co\text{-}sub}$) na corrente afluente. O GGC foi empregado nesta segunda etapa por ser uma biomassa lignocelulósica com larga produção na Irlanda. O estudo visou avaliar a bioestimulação do lactato e o impacto dos metais (cobre e zinco), na performance dos reatores

na comunidade microbiana formada. Os dois metais foram selecionados por serem comuns em drenagens ácidas de mina e estarem associados a diversos estudos da literatura. Nesta segunda etapa, o número de espécies de metais foi reduzido para os dois metais mais trabalhados dentro da área.

CAPÍTULO 1. ANÁLISE DO EFEITO DOS METAIS FE, CU, ZN, NI E CO NA PRODUÇÃO DE SULFETO EM REATORES SULFETOGÊNICOS ABASTECIDOS COM DIFERENTES DOADORES DE ELÉTRONS.

2 INTRODUÇÃO

Um dos principais impactos ambientais associados à atividade mineradora é a geração de drenagens ácidas de mina (DAM), resultante da exposição de minerais sulfetados, como a pirita (FeS_2), ao oxigênio atmosférico e à água (Kaksonen e Puhakka, 2007). Esse processo desencadeia a oxidação dos sulfetos, formando um resíduo com elevado teor de metais dissolvidos, como ferro, cobre, zinco e manganês, além de íons sulfato e pH ácido (2–4). Esses efluentes, se não forem adequadamente tratados, podem contaminar corpos hídricos superficiais e subterrâneos, bem como solos, representando um risco ambiental significativo.

Entre as abordagens convencionais de tratamento, destaca-se o uso de produtos alcalinos, como o hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), para neutralização do pH (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). Embora eficaz na correção da acidez, esse método não promove a remoção completa dos metais dissolvidos e ainda gera grandes volumes de lodo químico, dificultando o manejo e aumentando os custos operacionais. Nesse contexto, surgem alternativas biotecnológicas mais sustentáveis e eficazes (Panda *et al.*, 2021), como a utilização de sistemas baseados na redução biológica de sulfato (RBS) acoplada à precipitação de metais com o sulfeto gerado**.**

O processo de RBS é conduzido por bactérias redutoras de sulfato (BRS)**,** que utilizam o íon sulfato como aceptor final de elétrons em seu metabolismo anaeróbio. Como doadores de elétrons, esses microrganismos podem utilizar hidrogênio ou compostos orgânicos, como ácidos graxos voláteis (AGVs). O produto da RBS, o sulfeto, reage quimicamente com os metais dissolvidos, promovendo sua remoção via precipitação na forma de sulfetos metálicos insolúveis (Costa *et al.*, 2021; Hammack, Edenborn e Dvorak, 1994). Diferentemente dos hidróxidos, esses sulfetos apresentam constantes de solubilidade baixas, o que permite sua formação mesmo em ambientes ácidos, característica vantajosa para o tratamento de DAM.

A RBS pode ser aplicada em configurações passivas, como *wetlands* e barreiras permeáveis, mas a recuperação de metais só é possível nos reatores biológicos. Os reatores sulfetogênicos operam com maior controle de parâmetros fundamentais como temperatura, pH, concentrações de sulfeto e metais. Esse controle resulta em uma maior eficiência na remoção de sulfato, diminuição na concentração de metais no efluente, pouca produção de resíduos perigosos e principalmente a possibilidade de recuperação dos metais (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014).

Diversos substratos já foram testados como fontes de carbono e energia para as BRS, principalmente compostos orgânicos de baixo peso molecular como o lactato, etanol, glicerol, sacarose e outros (Costa *et al.*, 2021; Nevatalo *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2022; Vieira *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022a). Apesar de sua boa biodisponibilidade e eficiência, o uso desses compostos pode aumentar significativamente os custos operacionais do processo. Como alternativa, a literatura especializada propõe a utilização de substratos complexos e economicamente viáveis, como resíduos orgânicos agroindustriais ricos em material lignocelulósico (ML)**,** tais como casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar (BCA), palha de milho e grãos de cevada. Os ML são compostos por celulose, hemicelulose e lignina em diferentes quantidades dependendo do tipo de biomassa (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição típica de algumas biomassas lignocelulósicas.

Biomassa	**Celulose/% em massa**	**Hemicelulose/% em massa**	**Lignina/% em massa**
Madeira dura (Álamo)	50,8–53,3	26,2–28,7	15,5–16,3
Madeira macia (Pinus)	45,0–50,0	25,0–35,0	25,0–35,0
Palha de trigo	35,0–39,0	23,0–30,0	12,0–16,0
Sabugo de milho	33,7–41,2	31,9–36,0	6,1–15,9
Caule de milho	35,0–39,6	16,8–35,0	7,0–18,4
Palha de arroz	29,2–34,7	23,0–25,9	17,0–19,0
Casca de arroz	28,7–35,6	12,0–29,3	15,4–20,0
Bagaço de cana-de-açúcar	25,0–45,0	28,0–32,0	15,0–25,0
Palha de sorgo	32,0–35,0	24,0–27,0	15,0–21,0
Palha de cevada	36,0–43,0	24,0–33,0	6,3–9,8
Gramíneas	25,0–40,0	25,0–50,0	10,0–30,0
Capim rabo de raposa	35,0–40,0	25,0–30,0	15,0–20,0

Fonte: adaptado de Cai et al. (2017) – tradução livre

Essas macromoléculas formam em conjunto uma estrutural resistente à degradação microbiana (Figura 1), o que resulta em uma liberação gradual dos monossacarídeos e demais compostos orgânicos. Essa característica confere a esses resíduos o papel de doadores de elétrons de lenta liberação (DELL) (Costa, Bevilaqua e Lens, 2020; Reyes-Alvarado *et al.*, 2017, 2018), o que pode representar uma vantagem importante nos sistemas de RBS,

especialmente no que tange à cinética de precipitação dos metais. Com a produção rápida de sulfeto, são geradas zonas supersaturadas que tendem a favorecer o mecanismo de nucleação, resultando em partículas pequenas, pouco aglomeradas e de difícil recuperação por unidades de separação convencionais, como decantadores (Costa et al., 2020; Lewis 2010). Por outro lado, processos mais lentos favorecem o mecanismo de aglomeração, gerando partículas maiores e, portanto, mais sedimentáveis (Costa, Bevilaqua e Lens, 2020).

O BCA foi escolhido por se tratar do maior resíduo agroindustrial do Brasil. A safra de cana de açúcar 2025/2026 estima uma produção de 668,8 milhões de toneladas de cana de açúcar (Conab, 2025). Desse valor aproximadamente 30% resta como bagaço de cana de açúcar, embora existam estudos para uso do BCA para gerar etanol de segunda geração e energia térmica o material ainda existe em excesso.

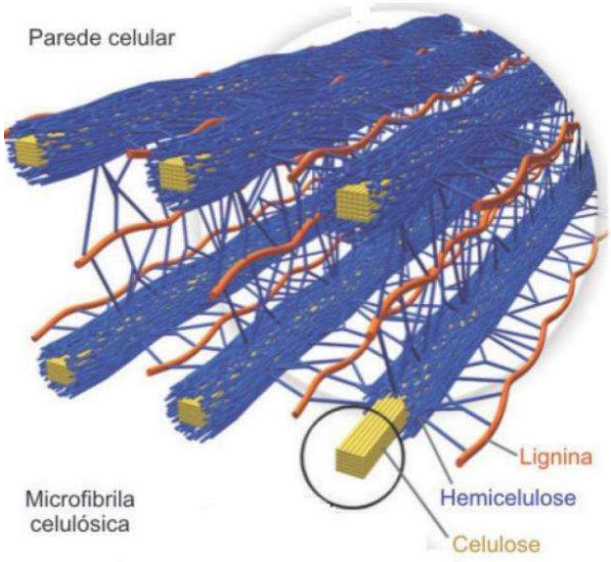


Figura 1. Estrutura da lignocelulose formada por celulose, hemicelulose e lignina
Fonte: Cordeiro (2016, p. 37)

Uma problemática que surge com os biorreatores é o efeito adverso dos metais nos microrganismos, impactando o processo. Além de afetarem negativamente o desempenho dos processos biológicos, os metais pesados podem afetar negativamente o desempenho dos processos biológicos por exercer diferentes tipos de toxicidade ou inibição sobre os microrganismos, variando conforme a natureza e a concentração do metal presente no sistema. O cobre, por exemplo, tende a ser mais letal que o zinco, provocando maior taxa de morte celular (Hao *et al.*, 1994). Por outro lado, o zinco, embora menos tóxico, pode inibir de forma mais significativa a atividade microbiana para redução biológica de sulfato (Hao *et al.*, 1994). Diante do estresse causado, os microrganismos podem lançar mão de diversos mecanismos de resistência, como a atividade de enzimas desintoxicantes, sequestro intracelular ou extracelular dos metais e até o transporte ativo para expulsão de íons metálicos do interior celular (Yin *et*

al., 2019). Cabe destacar que essas respostas são altamente dependentes da espécie microbiana envolvida, resultando em diferentes graus de tolerância a cada tipo de metal. De acordo com Costa et al. (2021) o uso de diferentes fontes de carbono pode aumentar a robustez dos consórcios microbianos, ativando múltiplas rotas metabólicas e aumentando a resistência frente à toxicidade dos metais.

Quando materiais lignocelulósicos são utilizados como fonte de elétrons, a eficiência da redução biológica de sulfato passa a estar relacionada à produção de metabólitos provenientes das etapas de hidrólise e fermentação. Esse processo favorece o desenvolvimento de múltiplas rotas metabólicas. As bactérias redutoras de sulfato identificadas em reatores alimentados com esse tipo de substrato mostraram-se capazes de utilizar uma ampla gama de doadores de elétrons, como hidrogênio, lactato e ácidos graxos voláteis (Natale Jr, 2022). Ainda que estudos com materiais lignocelulósicos tenham evidenciado a formação de comunidades microbianas diversificadas e resilientes, bem como uma recuperação mais eficiente de metais na forma sedimentável (Costa, Bevilaqua e Lens, 2020), pouco se sabe sobre o impacto direto dos metais pesados nesses sistemas. As pesquisas existentes até o momento concentraram-se em condições controladas, geralmente com meios de cultivo definidos e sem a adição de íons metálicos. No entanto, para que essa abordagem seja aplicada ao tratamento de drenagens ácidas de mina (DAM), é fundamental avaliar a resistência do sistema microbiano à presença de metais e comparar com os principais substrato já utilizados.

Com esse fim, foram usados diferentes *designs* de experimentos (DOE). O design de experimentos é uma técnica que permite realizar uma série de experimentos de forma eficiente, coletando o máximo de informações com o mínimo de testes (Vanaja e Rani, 2007). O modelo Plackett-Burman (PB) usado na primeira etapa, é um tipo de planejamento saturado, isto é, tem a vantagem de utilizar o mínimo de observações para calcular os efeitos de determinado fator (Vanaja; Rani, 2007). Uma característica desse design é que o tamanho da amostra é um múltiplo de quatro, diferentemente de outros designs, que geralmente usam potências de dois. Além disso, o número de experimentos nesse caso é igual a "n + 1", onde "n" é o número de fatores escolhidos. O design baseado na matriz PB é uma ferramenta importante em pesquisas iniciais, pois permite que melhores decisões sejam tomadas em maiores escalas (Vanaja; Rani, 2007). Desta forma, o ensaio PB foi usado para selecionar os metais estatisticamente influentes na produção máxima de sulfeto quando o BCA é usado como substrato, foram testados Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} e Co^{2+}. Uma vez que os metais-chave foram determinados, a abordagem foi estendida por meio de um planejamento fatorial fracionário (PFF). Ao se utilizar o PFF um número reduzido de ensaios poderia ser feito, usando triplicatas do sistema para melhorar a

confiabilidade do ensaio. Se tratando de ensaios biológicos réplicas são importantes para garantir confiabilidade nos resultados. Esse novo ensaio foi usado para comparar o efeito dos metais entre um doador de elétrons de lenta liberação e um *mix* de doadores de elétrons prontamente disponíveis (lactato, glicerol e sacarose).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral: analisar o efeito dos metais Fe, Cu, Ni, Zn e Co, em reatores sulfetogênicos abastecidos com diferentes doadores de elétrons, checando como a produção de sulfeto é impactada.

3.1.1 Objetivos específicos:

a) Identificar quais metais apresentam resultados estatisticamente negativos na produção máxima de sulfeto;

b) Comparar a resposta metabólica aos metais, entre os reatores abastecidos com material lignocelulósico e os reatores abastecidos com o *mix* (glicose, lactato e sacarose).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fonte de material lignocelulósico e inóculo

O bagaço de cana de açúcar utilizado como substrato foi coletado em uma empresa sucroenergética da região de Araraquara. O material foi coletado seco e com auxílio de um moinho de lâminas foi moído até passar por uma peneira com abertura de 30 MESH (0,59 mm) (Apêndice A - Figura A1). O inóculo utilizado estava sendo mantido pelo grupo de pesquisa com inoculações periódicas apenas para manutenção do consórcio microbiano. O consórcio já era formado por uma comunidade microbiana selecionada com uso de BCA em estudos anteriores. Para início do projeto foram realizadas novas inoculações para que os reatores chegassem as taxas de produção de sulfeto e consumo de sulfato visualizadas em ensaios anteriores. As culturas foram mantidas em mesas de agitação a 150 rpm e 30 °C.

4.2 Análises físico-químicas

O sulfeto dissolvido foi medido através do kit Hach (kit ref. #2244500, Hach Company, CO, USA), baseado no método do azul de metileno (Broenkow e Cline, 1969). O sulfeto total foi calculado com base na constante de equilíbrio para o pH do meio correspondente. O monitoramento de sulfato foi feito pelo método turbidimétrico (APHA, 2005). O pH foi medido com um pHmetro de eppendorf (GEHAKA, modelo PG 1800, São Paulo, São Paulo).

4.3 Matriz Plackett-Burman

Com auxílio do software STATISTICA 10.0 uma matriz no modelo Plackett-Burman de planejamento de experimentos foi construída. Foram usados 5 fatores, sendo estes os metais Fe, Cu, Zn, Co e Ni e os níveis mínimos (-1) e máximos (+1) bem como os pontos centrais (PC). O resultado foi uma matriz contendo 12 reatores únicos e uma triplicata dos pontos centrais (Tabela 2). Os resultados do experimento estão descritos na seção 4.1. A resposta avaliada para análise estatística foi a produção máxima de sulfeto em cada condição.

Tabela 2 - Matriz usada para o ensaio Plackett-Burman com as concentrações dos metais em cada condição, valores expressos em mg L^{-1}.

Matriz PB	Ferro	Cobre	Zinco	Níquel	Cobalto
1	0	20	0	0	0
2	100	0	20	0	0
3	100	20	0	20	0
4	0	20	20	0	20
5	100	0	20	20	0
6	100	20	0	20	20
7	100	20	20	0	20
8	0	20	20	20	0

9	0	0	20	20	20
10	0	0	0	20	20
11	100	0	0	0	20
12	0	0	0	0	0
PC	50	10	10	10	10
PC	50	10	10	10	10
PC	50	10	10	10	10

Fonte: próprio autor

4.4 Matriz planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} (PFF)

A partir dos resultados obtidos no ensaio sob design Plackett-Burman, o ensaio PFF foi desenhado contendo as três variáveis que foram significativas no processo usando o BCA como substrato. A nova matriz foi então usada para um segundo ensaio no qual se comparou o uso dos dois substratos BCA e o *mix* de doadores de elétrons. A Tabela 3 ilustra o delineamento experimental utilizado para os fatores zinco, ferro e cobre no ensaio PFF. Esta matriz consiste em 4 combinações únicas desses três fatores (cada um em dois níveis distintos), o que caracteriza um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{3-1}. Cada uma dessas 4 corridas únicas foi replicada duas vezes, resultando em um total de 12 experimentos. A resposta avaliada para análise estatística foi a produção máxima de sulfeto em cada condição.

Tabela 3 - Matriz usada para montagem dos reatores no ensaio PFF

Condição	Corrida	Doador de elétrons	Concentração Zn (mg L^{-1})	Concentração Fe (mg L^{-1})	Concentração Cu (mg L^{-1})
BCA1	1	BCA	0	0	20
	2	BCA	0	0	20
	3	BCA	0	0	20
BCA2	4	BCA	0	100	0
	5	BCA	0	100	0
	6	BCA	0	100	0
BCA3	7	BCA	20	0	0
	8	BCA	20	0	0
	9	BCA	20	0	0
BCA4	10	BCA	20	100	20
	11	BCA	20	100	20
	12	BCA	20	100	20
*MIX*1	13	*MIX*	0	0	20
	14	*MIX*	0	0	20
	15	*MIX*	0	0	20
*MIX*2	16	*MIX*	0	100	0
	17	*MIX*	0	100	0
	18	*MIX*	0	100	0
*MIX*3	19	*MIX*	20	0	0
	20	*MIX*	20	0	0
	21	*MIX*	20	0	0
*MIX*4	22	*MIX*	20	100	20
	23	*MIX*	20	100	20
	24	*MIX*	20	100	20

Fonte: próprio autor

4.5 Solução dos metais pesados

Como fonte dos metais a serem analisados foram usados os sais presentes na Tabela 4. Foram preparadas soluções concentradas dos metais a 1.000 mg L^{-1} para o ferro e 200 mg L^{-1} para os demais metais usando o meio de cultura como solvente. As soluções foram filtradas em millipore com filtro de 0,22 nm garantindo esterilidade. De acordo com as matrizes dos ensaios sob design Plackett-Burman e Fatorial Fracionário, alíquotas de 15 mL das soluções foram adicionadas de acordo com cada configuração dos reatores.

Tabela 4 - Cátions e sais utilizados

Metal	**Sal utilizado**
Fe^{2+}	$FeSO_4.7H_2O$
Cu^{2+}	$CuSO_4.5H_2O$
Zn^{2+}	$ZnCl_2$
Ni^{2+}	$NiSO_4.6H_2O$
Co^{2+}	$CoSO_4.7H_2O$

Fonte: próprio autor

4.6 Efeito dos metais em reatores abastecidos com BCA

Usando a matriz tabela 2 os reatores foram montados com suas respectivas composições. Os valores (concentrações dos metais) foram selecionados com base na literatura especializada. Contudo, é importante ressaltar a variabilidade dos valores nos estudos revisados (Gu, Cui e Shang, 2020; Hao *et al.*, 1994; Kiran, Pakshirajan e Das, 2017). Afinal, as características do consórcio utilizado bem como a configuração dos reatores podem afetar significativamente o efeito dos metais. Deste modo, foram estabelecidos valores médios para o ensaio. Os valores estabelecidos para os metais Cu, Zn, Co e Ni foram 20 mg L^{-1} no nível (+1) e 0 mg L^{-1} no nível (-1) e para o Fe os valores foram 100 mg L^{-1} no nível (+1) e 0 mg L^{-1} no nível (-1). Os pontos centrais foram montados com os valores médios de cada metal (0) em triplicata para fornecer o erro puro do experimento sem comprometer os graus de liberdade. Foram usados frascos de borossilicato de 250 mL com volume reacional de 150 mL e tampas de butila para manter anaerobiose. A composição usada foi do meio basal para cultivo de anaeróbios (Stams *et al.*, 1993), a alíquota da solução concentrada de metais e o inóculo (15 mL da geração enriquecida). Foram adicionados 2 g de BCA como substrato e Na_2SO_4 foi usado como fonte de sulfato para uma concentração de 1500 mgSO_4^{2-} L^{-1}. Salienta-se que a concentração dos sais de sulfato dos metais utilizados foi considerada e descontada da massa que foi pesada de sulfato de sódio para cada reator individualmente. Após inoculação os reatores foram submetidos a um fluxo de

argônio por três minutos para garantir anaerobiose. Os reatores foram mantidos em uma mesa de agitação de 150 rpm a 30°C durante 25 dias, análises foram feitas duas vezes por semana e amostras foram guardadas para análises futuras.

4.7 Efeito dos metais nos reatores abastecidos com diferentes doadores de elétrons.

Os reatores foram montados de forma similar a seção anterior, contudo a matriz que se seguiu foi a da tabela 3. Além disso para o meio de cultura com o *mix* uma solução contendo os três componentes foi usada. Cada composto foi responsável por providenciar uma DQO de 500 mg L^{-1} estabelecendo nos reatores uma relação DQO/SO_4^{2-} de 1. Após inoculação os reatores também foram submetidos a um fluxo de argônio por três minutos para garantir anaerobiose. Os reatores foram mantidos em uma mesa de agitação de 150 rpm a 30°C durante 25 dias. A Figura 2 resume o desenho experimental que foi usado para análise estatística dos resultados e como os metais foram selecionados.

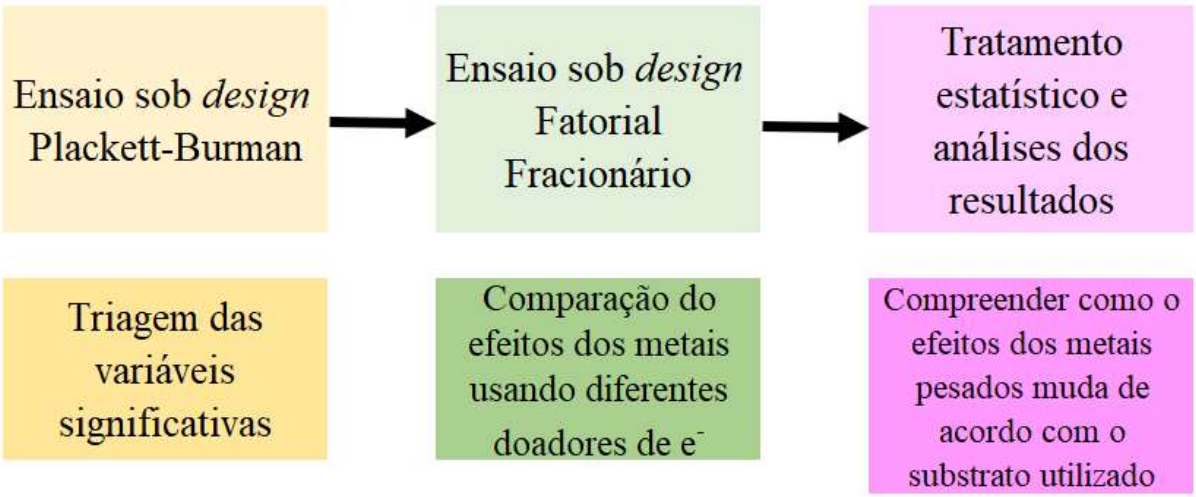


Figura 2. Desenho experimental da metodologia usada para estudo do efeito dos metais nos biorreatores sulfetogênicos
Fonte: próprio autor

5 RESULTADOS

5.1 Planejamento Plackett-Burman: efeito dos cinco metais nos reatores alimentados com BCA

A matriz da seção 4.1 foi empregada para montagem e configuração dos reatores. Neste primeiro momento o ensaio foi conduzido utilizando-se apenas o BCA como substrato. Foram montados 12 reatores únicos e uma triplicata do ponto central (PC).

O parâmetro analisado para verificar o efeito dos metais sobre a performance dos reatores foi a produção máxima de sulfeto. A Figura 3 apresenta o gráfico de Pareto para a produção máxima de sulfeto durante todo o ensaio. As colunas horizontais representam individualmente cada metal e seus respectivos valores de efeito sobre o sistema. Os valores

encontram-se em ordem decrescente em relação ao módulo do efeito. As colunas que cruzam a linha vermelha perpendicular (p = 0,05) representam os metais que foram significativos para o processo. Nota-se que os valores dos efeitos nos metais que tiveram efeito estatístico na produção de sulfeto possuem o sinal negativo (-). Isso demonstra que entre as concentrações utilizadas para uma melhora da resposta (produção de sulfeto) os metais devem estar em seu nível inferior (0 mg L^{-1}). Entretanto, podem existir concentrações entre as selecionadas que favoreçam a sulfetogênese. O meio basal possui os metais em usados em concentrações traço para que sejam usados como cofatores enzimáticos pelos microrganismos. Portanto, as concentrações usadas no ensaio PB são adicionais as concentrações presentes no meio.

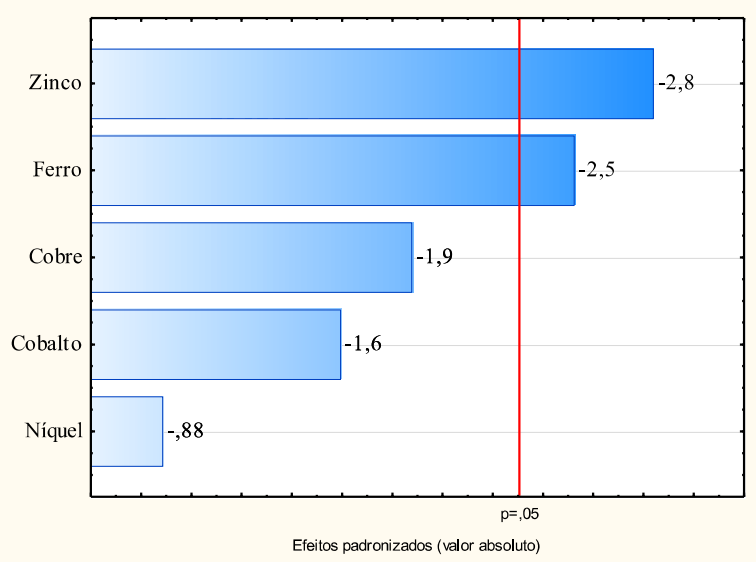


Figura 3. Gráfico de Pareto com efeito dos metais no ensaio Plackett-Burman
Fonte: próprio autor

Os metais que apresentaram influência estatisticamente significativa para o processo foram zinco e ferro. Esse resultado vai de encontro ao trabalho de Hao et al. (1994), no qual os autores discorrem sobre a influência do zinco e do cobre nos reatores sulfetogênicos. Segundo os autores, o zinco apresentou-se como um metal inibitório, diminuindo a eficiência metabólica dos microrganismos sulfato redutores em aproximadamente 90% na concentração de 20 mg L^{-1}. O cobre, por sua vez, se mostrou mais tóxico levando a maior morte celular nos reatores. O fato de o cobre possuir um efeito não significativo pode ser pela diferença na solubilidade dos metais. O Kps do sulfeto de cobre é $8x10^{-37}$ e do sulfeto de zinco $2x10^{-25}$, desta forma, certamente o cobre é o primeiro metal a precipitar. A formação do sulfeto de cobre diminui a biodisponibilidade do metal e por consequência, diminui sua toxicidade nos biorreatores. A biodisponibilidade é compreendida como a fração dos metais presentes no meio que pode de fato afetar os seres vivos, não sendo considerados metais em formas não solúveis ou

sequestrados pela matriz do meio (Bruemmer, Gerth e Herms, 1986; Fortin, 2024; Kim *et al.*, 2007, 2015) . Comparando as condições 9 e 10 é possível notar uma melhora na produção de sulfeto ao se retirar o zinco do reator (Apêndice A- Tabela A1). Um ponto de destaque pode ser feito em relação a condição 1, na qual apenas o cobre foi adicionado (Tabela 2). Sabe-se que além dos metais, o sulfeto também é tóxico aos microrganismos (Dalcin Martins *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2024; Muyzer e Stams, 2008). Portanto, na primeira condição, a reação do cobre com o sulfeto biogênico levou a uma diminuição da toxicidade de ambos compostos (reação 1). Esse fator pode explicar a melhor performance do reator 1 frente aos outros reatores com adição de mais de um metal. O mesmo foi discutido por (Gonzalez-Silva *et al.*, 2009) em relação a adição de ferro em reatores sulfeto gênicos. No estudo em questão, concentrações mais baixas de ferro foram benéficas para os biorreatores, justamente pela precipitação concomitante do metal e do sulfeto.

$$Cu^{2+}_{(aq)} + H_2S_{(aq)} \rightarrow CuS_{(s)} + 2H^{+}_{(aq)} \text{ (Reação 1)}$$

Em relação ao ferro, esperava-se uma resposta não significativa para o processo. Afinal, a literatura da área discute sobre os benefícios de se adicionar ferro aos reatores sulfetogênicos (Gonzalez-Silva *et al.*, 2009; Liu, Zhang e Ni, 2015; Vlyssides, Barampouti e Mai, 2009). Entretanto, é possível que a concentração escolhida para o ensaio tenha sido alta e inibitória para os microrganismos operando em reatores batelada. Os trabalhos apresentados usam concentrações similares ou superiores, mas operaram com reatores UASB. Além disso, diferente da condição 1, os reatores com ferro apresentavam também outros metais, o que é um fator determinante para a toxicidade nos reatores (Yin *et al.*, 2019). Afinal, quanto maior a variedade de metais, mais rotas metabólicas e diferentes microrganismos podem ser impactados.

Para o níquel e cobalto, destaca-se que ambos foram significativos na primeira semana de experimento como demonstra a Figura 4. O níquel apresenta-se como um metal mais tóxico às BRS em relação ao cobalto (Liu et al., 2021). Entretanto, foi demonstrado que os microrganismos redutores de sulfato possuem proteínas específicas que permitem o sequestro extracelular do níquel atenuando sua toxicidade (Liu *et al.*, 2021). Portanto, uma hipótese é que no início do ensaio o níquel apresentou a inibição dos microrganismos, mas com a produção dessas proteínas sua toxicidade foi mitigada. O cobalto por sua vez, pode favorecer a sulfetogênese em concentração superior à do níquel. Outra característica é a precipitação recorrente do metal na presença de sulfeto, o que auxilia na diminuição da sua toxicidade. Liu

et al. (2021) demonstraram que em concentrações similares de níquel e cobalto, o cobalto tende a precipitar mais facilmente (kps NiS e CoS, respectivamente $3x10^{-19}$ e $4x10^{-21}$). Portanto, no início do ensaio o cobalto foi significativo para o processo, mas à medida que os microrganismos atenuam a toxicidade dos metais e o sulfeto é produzido, o cobalto precipita.

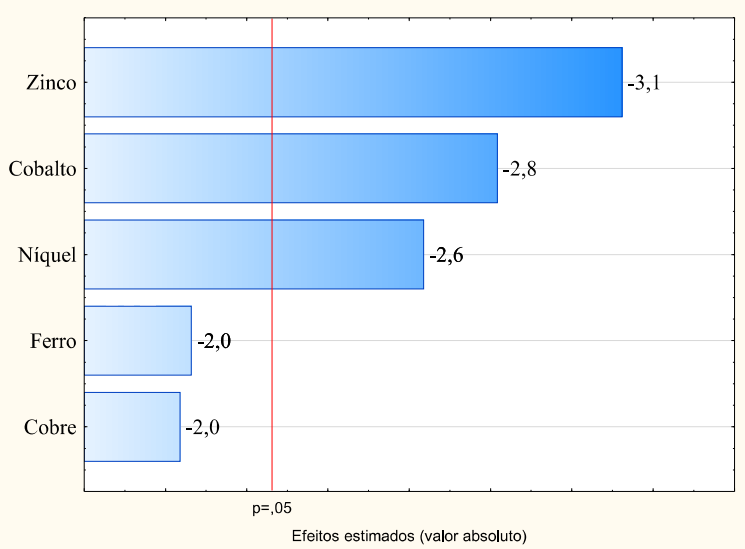


Figura 4. Gráfico de Pareto com efeitos dos metais na primeira semana do ensaio Plackett-Burman.
Fonte: próprio autor

5.2 Comparação dos efeitos dos metais em reatores sulfetogênicos abastecidos com diferentes doadores de elétrons no ensaio PFF

Com base nos metais selecionados na etapa anterior (zinco e ferro) e com a adição do cobre por se tratar de um metal comumente associado as DAM, os três metais foram usados para o ensaio PFF. A análise estatística usada foi feita com base na produção máxima de sulfeto dos reatores após aproximadamente 3 semanas de experimento e na primeira semana de operação. A Figura 5 apresenta o gráfico da produção de sulfeto durante o ensaio PFF em cada triplicata para ambos os substratos (BCA e *mix*). A maior produção medida durante o ensaio para cada condição foi usada no *software* para gerar os gráficos discutidos posteriormente.

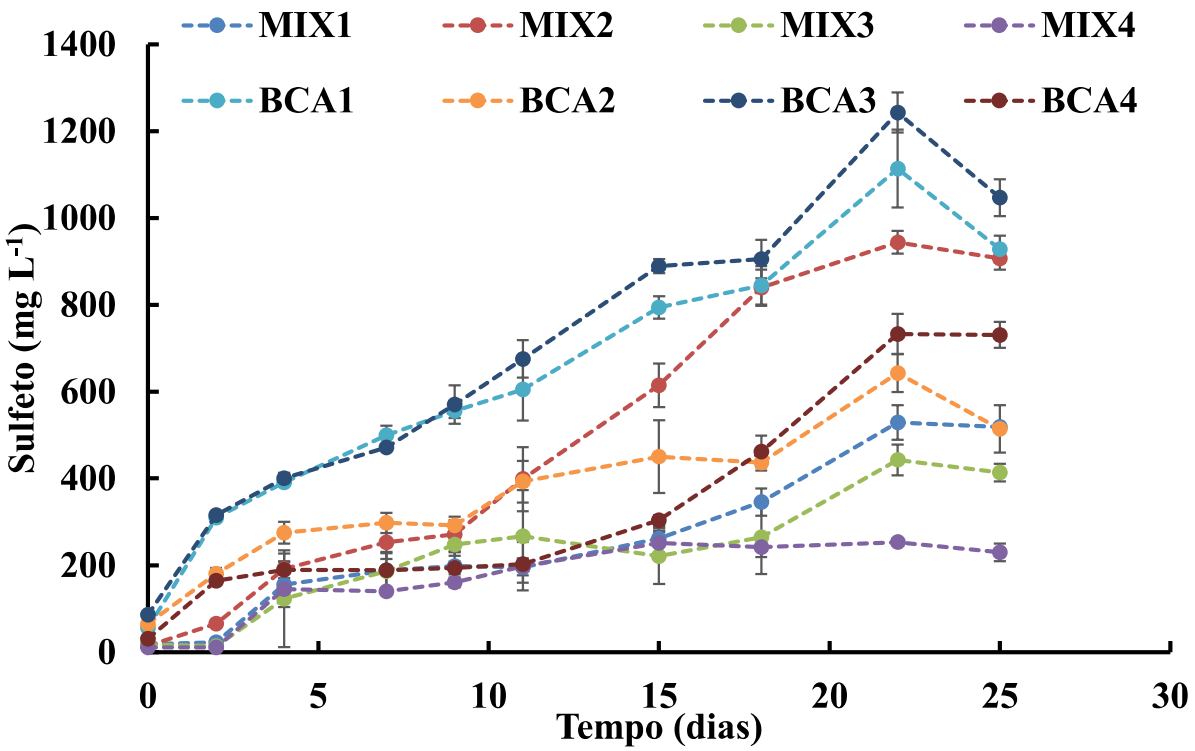


Figura 5. Produção de sulfeto durante o ensaio PFF, a composição de cada condição está apresentada na Tabela 3.

Fonte: próprio autor

A Tabela 4 exibe os dados brutos resultantes das corridas realizadas, organizados para análise estatística. As colunas 1, 2 e 3 representam os fatores zinco, ferro e cobre, respectivamente, cada um testado em dois níveis (0 e 20 para zinco e cobre; 0 e 100 para ferro), os quais correspondem aos valores codificados (-1 e +1) utilizados na concepção do planejamento experimental. A coluna 4 registra a "Concentração máxima de sulfeto" obtida, sendo esta, a variável resposta e dependente. Por fim, a coluna 5 identifica o substrato utilizado, com dois níveis (1 para BCA e 2 para o *mix* de doadores de elétrons).

Tabela 4 - Dados brutos usados para análise estatística do ensaio PFF indicando as 24 corridas únicas. O substrato 1 representa o BCA e o substrato 2 representa o mix de doadores de elétrons.

	1 Zinco	2 Ferro	3 Cobre	4 Concentração máxima de sulfeto	5 **Substrato**
1	0	0	20	1012	1
2	0	0	20	1150	1
3	0	0	20	1180	1
4	0	100	0	602	1
5	0	100	0	637	1
6	0	100	0	690	1
7	20	0	0	1218	1
8	20	0	0	1296	1
9	20	0	0	1215	1
10	20	100	20	688	1
11	20	100	20	781	1
12	20	100	20	729	1
13	0	0	20	501	2
14	0	0	20	557	2
15	0	0	20	798	2
16	0	100	0	914	2
17	0	100	0	957	2
18	0	100	0	961	2
19	20	0	0	418	2
20	20	0	0	468	2
21	20	0	0	1617	2
22	20	100	20	247	2
23	20	100	20	262	2
24	20	100	20	251	2

Fonte: próprio autor

No software STATISTICA 10.0 os resultados de produção máxima de sulfeto obtidos em cada condição foram usados para a análise estatística. Salienta-se que na condição da linha 21 (correspondente ao substrato *mix* de doadores de elétrons), uma das réplicas apresentou um valor significativamente discrepante em relação às demais do mesmo ponto experimental. Devido a esse resultado, optou-se pela exclusão desta observação. Essa prática foi estendida a todos os pontos experimentais para manter a uniformidade da modelagem estatística. Desta forma, as análises seguiram-se em duplicata quando o *mix* de doadores estava sendo analisado, excluindo-se a réplica mais discrepante.

As análises estatísticas foram feitas para os dois substratos de forma isolada. Tratando-se de um planejamento fatorial fracionário $2^{\wedge 3-1}$ a resolução do delineamento é III, o que poderia causar confusão entre os efeitos de primeira e segunda ordem. Contudo, na forma como os ensaios foram montados, os metais são analisados individualmente em três corridas únicas e

são colocados em conjunto em apenas uma das corridas. Pode-se então inferir que de forma prática os efeitos correspondem apenas ao fator principal.

5.2.1 Análise dos efeitos dos metais usando o BCA como substrato

A análise de variância para o substrato BCA Tabela 5 revela um modelo com bom ajuste estatístico aos dados ($R^2 \approx 0,996$). O zinco e o ferro demonstraram efeitos estatisticamente significativos ($p<0,0002$ para ambos) na concentração máxima de sulfeto, com o ferro exercendo a maior influência. O cobre, mais uma vez, não apresentou um efeito significativo neste substrato ($p> 0,05$).

Tabela 5 - ANOVA para o BCA como substrato no ensaio PFF.

ANOVA; Var.:Concentração máxima de sulfeto; R^2=,99616; Aj:,99327
2^(3-1) design; MS Erro Puro=295
DV: Concentração máxima de sulfeto

Fator	SS	df	MS	F	p
(1)Zinco	66783,8	1	66783,8	225,9141	0,000114
(2)Ferro	238706,7	1	238706,7	807,4893	0,000009
(3)Cobre	986,1	1	986,1	3,3356	0,141825
Erro Puro	1182,5	4	295,6		
Total SS	307659,1	7			

Fonte: próprio autor

A Figura 6 apresenta o gráfico de Pareto quando o BCA foi utilizado como substrato. Os resultados mostram que assim como sob o design Plackett-Burman, o cobre não foi significativo em relação a produção de sulfeto. O ferro e o zinco seguiram sendo significativos, entretanto a ordem dos efeitos foi invertida. O ferro apresentou uma magnitude do efeito de -28 o que significa que, no nível +1 (100 mg L^{-1}) ocorre diminuição da produção de sulfeto. O zinco, por sua vez, apesar de ser significativo, apresenta uma magnitude de +15, evidenciando um efeito positivo na produção de sulfeto quando está na concentração de 20 mg L^{-1}.

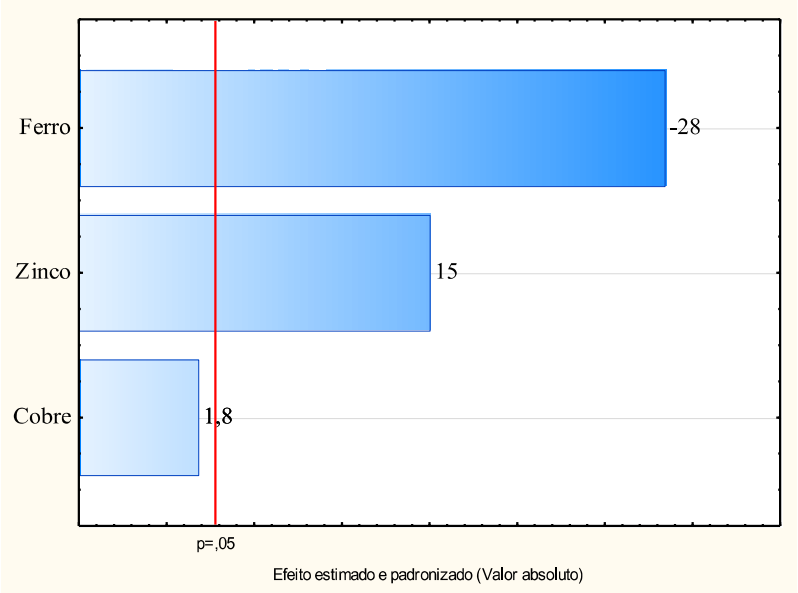


Figura 6. Gráfico de Pareto com os efeitos para o BCA como substrato para o período total do ensaio PFF.
Fonte: próprio autor.

A comparação entre o gráfico de Pareto do BCA para o período total e analisando a primeira semana do experimento (Figura 7) demonstra a mudança do efeito dos metais com o passar do tempo de operação. O efeito do ferro, o mais influente dos metais para o BCA, teve sua magnitude mantida entre os períodos de -25 e -28, respectivamente da primeira semana até o final do experimento. Uma hipótese para esse resultado é que a concentração de ferro usada é a maior entre os metais, levando a um efeito agudo no início do ensaio e se mantendo biodisponível em maiores concentrações. A mudança mais expressiva, contudo, é observada no zinco, cujo efeito inverteu sua direção de negativo (-7) na primeira semana para (+15) no ao fim do experimento. Por fim, o cobre, que não demonstrou significância na análise geral (efeito de 1,8), foi um fator estatisticamente significativo e negativo (-4) na primeira semana. De modo geral, os metais parecem ter maior efeito nos estágios iniciais do sistema. Isso faz sentido, uma vez que os microrganismos apresentam diferentes mecanismos para defesa contra os metais pesados (Roy *et al.*, 2024; Sreedevi, Suresh e Jiang, 2022; Yin *et al.*, 2019), e com o passar dos dias a toxicidade dos metais diminui. Além disso, com a produção de sulfeto os metais também precipitam, diminuindo sua biodisponibilidade e por consequência sua toxicidade.

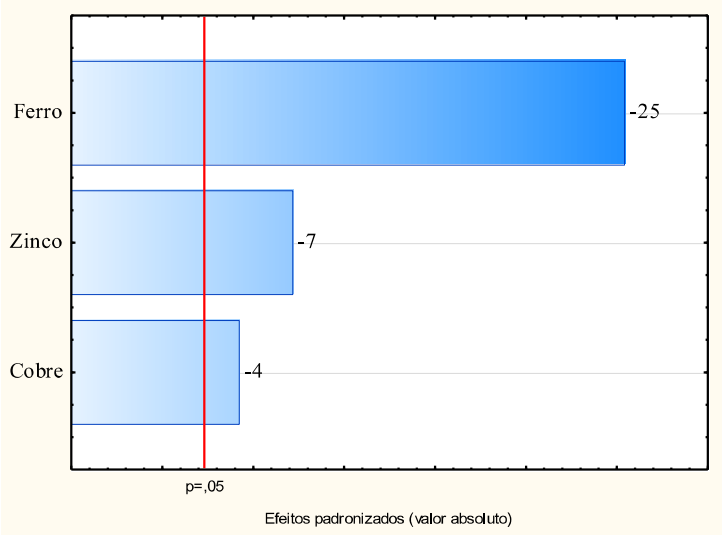


Figura 7. Gráfico de Pareto com os efeitos dos metais na primeira semana com o BCA como substrato.
Fonte: próprio autor

A Figura 8 apresenta o gráfico de dos valores observados em função dos valores previstos para o substrato BCA. O gráfico reflete a capacidade preditiva e o ajuste do modelo. A concentração dos pontos de dados muito próximos à linha diagonal de 45 graus (onde os valores observados e previstos são idênticos) indica que o modelo pode ser eficaz em estimar a concentração máxima de sulfeto, refletindo uma forte correlação entre as previsões do modelo e os resultados experimentais reais.

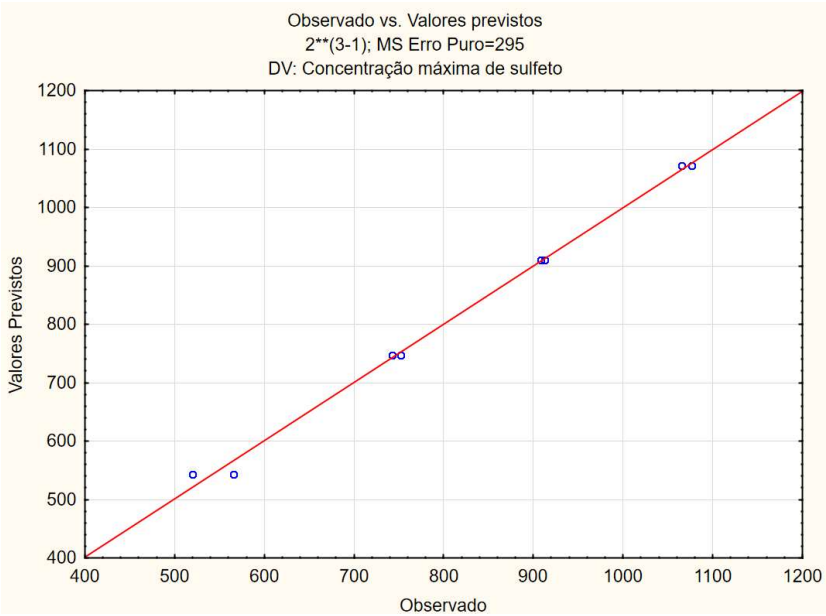


Figura 8. Gráfico de valores observados x valores previstos para o BCA como substrato
Fonte: próprio autor

5.2.2 Análise dos efeitos dos metais usando o *mix* como substrato

A análise de variância do delineamento para o substrato *mix* Tabela 6 revela um modelo com bom ajuste estatístico aos dados ($R^2 \approx 0,995$). Em relação ao impacto dos metais na concentração máxima de sulfeto, os fatores zinco (p=0,000032), ferro (p=0,0030) e cobre (p=0,000084) demonstraram todos os efeitos estatisticamente significativos neste substrato para o período todo de operação.

Tabela 6 - ANOVA para o mix como substrato no ensaio PFF.

ANOVA; Var.:Concentração máxima de sulfeto; R^2=,99459; Aj:,99053
Planejamento 2**(3-1); MS Erro Puro=721,625
DV: Concentração máxima de sulfeto

Fator	SS	df	MS	F	p
(1)Zinco	310866,1	1	310866,1	430,7862	0,000032
(2)Ferro	29646,1	1	29646,1	41,0825	0,003044
(3)Cobre	190036,1	1	190036,1	263,3447	0,000084
Erro Puro	2886,5	4	721,6		
Total SS	533434,9	7			

Fonte: próprio autor

No caso do *mix* de doadores de elétrons, o gráfico de Pareto (Figura) apresenta um perfil diferente. Para esse substrato, todos os metais usados foram significativos no processo. As maiores magnitudes de efeitos foram para o zinco e o cobre, -33 e -21, respectivamente. Ambos com sinal negativo mostrando um efeito desfavorável a produção de sulfeto quando estes estão nas concentrações de 20 mg L^{-1}. O ferro por sua vez se mostrou com efeito positivo quando em concentração de 100 mg L^{-1}, aumentando a produção de sulfeto.

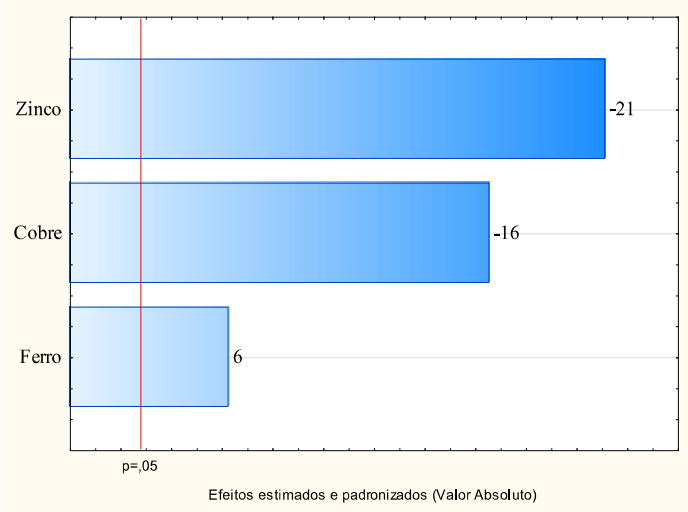


Figura 9. Gráfico de Pareto com os efeitos para o *mix* como substrato
Fonte: próprio autor

Para o substrato *mix*, há um contraste com os resultados do BCA. Nos estágios iniciais (primeira semana) (Figura 9), observa-se que as magnitudes dos efeitos são consideravelmente

menores em comparação com seus efeitos ao final do experimento. O zinco passou de não significativo na primeira semana (efeito -2) para o metal com o maior efeito ao fim do experimento (efeito -21). O cobre foi significativo durante todo o processo, mas a magnitude do seu efeito aumentou de -3 para -16. Ambos os metais apresentaram um sinal de efeito negativo quando significativos, o que como já discutido, demonstra que seu nível +1 leva a uma diminuição da resposta (produção de sulfeto). O ferro, por sua vez, passou de não significativo na primeira semana para significativo ao fim do experimento, contudo com um sinal positivo. Portanto o ferro quando significativo, aumentou a produção de sulfeto no seu nível +1. Esses resultados sugerem que, para este substrato, a atuação desses metais na concentração máxima de sulfeto é menos pronunciada nos estágios iniciais.

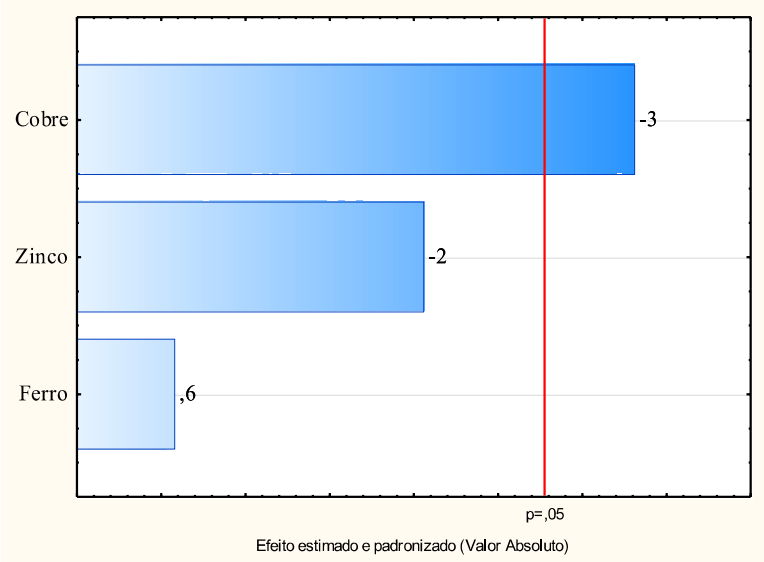


Figura 9. Gráfico de Pareto com os efeitos na primeira semana com o *mix* como substrato
Fonte**:** próprio autor

Um ponto crucial é que existem outros fatores que podem influenciar os reatores e mascarar o efeito dos metais. O pH por exemplo possui uma influência sob o metabolismo celular e na própria precipitação dos sulfetos metálicos. Para o *mix* de doadores de elétrons o pH inicial foi corrigido com NaOH para garantir um pH inicial similar ao meio com BCA (~6.0) (Figura 10). Mesmo com essa correção o pH dos reatores foi menor que o pH dos reatores com BCA em todas as condições. Inclusive no tempo t=2 nota-se uma queda mais acentuado em todas as condições nas quais o *mix* foi usado como substrato. Um ponto importante é a alta abundância relativa de microrganismos fermentativos no inóculo e no consórcio enriquecido testados anteriormente a esta pesquisa (Apêndice A - Figura A2). Das cinco principais unidades taxonômicas operacionais encontradas na cultura enriquecida, as três mais abundantes foram fermentativas. *Macellibacteroides* correspondia a 17,9%, fermenta açúcares simples para

produzir lactato, acetato, butirato e isobutirato (Gao *et al.*, 2024; Yin *et al.*, 2024); *Rikenellaceae_bacterium* registrada com 7,31%, fermenta glicose, lactose e manose produzindo ácido acético e butírico; *Dysgonomonadaceae* registrada com 5,14%, fermenta açúcares simples produzindo ácidos orgânicos (Owusu-Agyeman, Plaza e Cetecioglu, 2022). A presença de microrganismos fermentativos e o uso de um *mix* com sacarose, permitiu que o processo fermentativo ocorresse no início do ensaio, possivelmente acidificando o meio. Costa *et al*. (2021) usaram o mesmo *mix* e obtiveram a maior diversidade de microrganismos fermentativos comparando com reatores alimentados separadamente com cada substrato. Essa diferença no pH pode ter mascarado os efeitos dos metais, o que explica a magnitude menor nos efeitos visualizados.

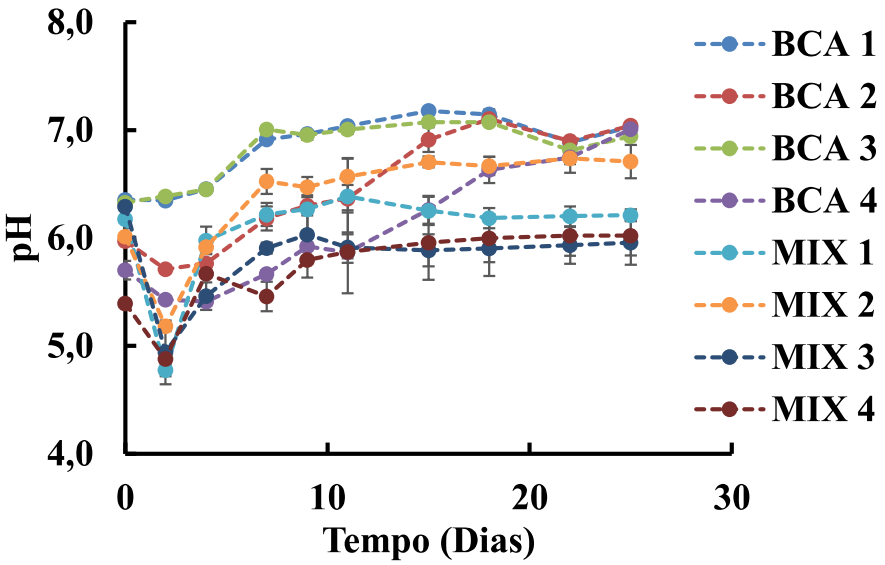


Figura 10. Variação do pH durante o ensaio PFF nas diferentes condições apresentadas na Tabela 3.
Fonte: próprio autor.

Outra análise estatística usada foi o teste “t” para compreender se nas condições de maior produção de sulfeto em cada substrato, a diferença na concentração de sulfeto seria estatisticamente significativa. A Tabela 7 apresenta a análise feita com as condições BCA3 e *MIX*2 em relação a produção máxima de sulfeto. Como pode ser notado pelo valor de $p < 0,05$, a diferença de produção de sulfeto no BCA foi significativa e superior a produção de sulfeto com o *mix*, comparando as melhores condições de cada substrato.

Tabela 7 - Teste "t" comparando as melhores condições de cada substrato em relação a concentração (mg L^{-1}) máxima de sulfeto.

T-tests; Grupo: Substrato
Grupo 1: MIX melhor condição
Grupo 2: BCA melhor condição

Variável	Média MIX	Média BCA	t-value	df	p	Valid N MIX	Valid N BCA	Dev.Pad. MIX	Dev.Pad. BCA	F-ratio Variances	p Variances
Concentração máxima de sulfeto	944,0000	1243,018	-9,77158	4	0,000615	3	3	26,05763	46,15427	3,137285	0,483409

Fonte: próprio autor

Portanto, por mais que o efeito e a significância entre os metais se altere de acordo com o substrato, o BCA se mostra melhor para a redução biológica de sulfato frente ao *mix* de doadores de elétrons usado. Entretanto, essa melhor produção de sulfeto não reflete em um substrato superior para o tratamento e recuperação de metais de DAM. Para estudos futuros, seria importante evidenciar se essa maior produção de sulfeto não pode na realidade ser desfavorável a recuperação dos metais. Afinal, o BCA é usado justamente por se tratar de um DELL, favorecendo a formação de partículas mais sedimentáveis e maiores por uma cinética mais lenta de produção de sulfeto. Portanto, é possível que ao se utilizar o BCA a produção de sulfeto não seja tão lenta quanto se espera e a cinética de precipitação prejudique o crescimento dos cristais. Um ponto de destaque é que o inóculo usado foi o mesmo tanto para os reatores abastecidos com BCA quanto o *mix*. Esse inóculo foi, durante anos, alimentado com o BCA, tornando a comunidade microbiana selecionada para esse tipo de substrato. Isso pode ter feito o consórcio especializado mais apto a usar o BCA de forma mais rápida.

Outro ponto de análise reside na estequiometria entre o sulfato disponível e o sulfeto produzido. Com uma concentração de sulfato providenciada de 1500 mg L^{-1}, a produção teórica máxima de sulfeto esperada era de 500 mg L^{-1}. No entanto, em algumas condições, particularmente com o substrato BCA, foram observadas concentrações de sulfeto de até 1200 mg L^{-1}. Essa diferença já havia sido notada em ensaios anteriores, embora de forma menos acentuada, chegando a concentrações de aproximadamente 650 mg L^{-1} de sulfeto. As hipóteses iniciais para essa discrepância incluem a presença de outras fontes de enxofre no meio, uma vez que as BRS podem utilizar outras fontes oxidadas de enxofre além do sulfato (e.g. enxofre elementar, sulfito e tiossulfato). A cisteína e vitaminas adicionadas, bem como o extrato de levedura que contém proteínas, poderiam fornecer fontes extras de enxofre. Além disso, o BCA pode apresentar formas oxidadas de enxofre na sua composição (Palma *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2005), ainda assim as quantidades presentes não seriam suficientes para explicar uma concentração tão elevada de sulfeto. A hipótese mais consistente para a diferença observada está na forma como a amostragem e a medição do sulfeto são realizadas. Durante a amostragem, que utiliza seringas e agulhas, é provável que partículas já precipitadas de sulfeto metálico

sejam succionadas. Posteriormente, na etapa de análise com o uso de reagentes ácidos para a leitura do sulfeto (seção 3.2), essas partículas são dissolvidas e contabilizadas como sulfeto total. Dessa forma, as medidas de sulfeto foram superestimadas, uma conclusão reforçada pelo fato de que essa diferença mais discrepante na concentração de sulfeto ocorre exclusivamente nas condições com a presença de metais pesados. Com base nos valores e desvios entre as triplicatas, considera-se que os resultados podem ser levados em consideração para uma análise estatística embora não representem a real produção de sulfeto nas condições estudadas.

Algumas outras hipóteses foram levantadas para explicar a melhor performance do BCA: o material lignocelulósico age adsorvendo os metais e mitigando sua toxicidade; heterogeneidade de rotas metabólicas no BCA é maior que no *mix*; a presença de sacarose no *mix* de doadores pode ser prejudicial aos microrganismos sulfato redutores, favorecendo bactérias fermentativas.

Como discutido na introdução, a composição do BCA e dos materiais lignocelulósicos é como uma rede orgânica cristalina Figura 11, e sua estrutura porosa pode agir adsorvendo diferentes contaminantes orgânicos e inorgânicos (Albertini et al., 2007; Paz, Garnica e Curbelo, 2018; Silva, Gomes e Alsina, 2007; Xavier et al., 2021). Dessa forma, a concentração inicial de metais biodisponível para causar algum efeito deletério aos microrganismos é menor quando o BCA é usado como substrato. Com uma menor biodisponibilidade dos metais, as BRS podem então se desenvolver nos estágios iniciais e posteriormente precipitar os metais com o sulfeto, e como já discutido, a precipitação concomitante de metais e sulfeto, gera um ambiente menos tóxico.

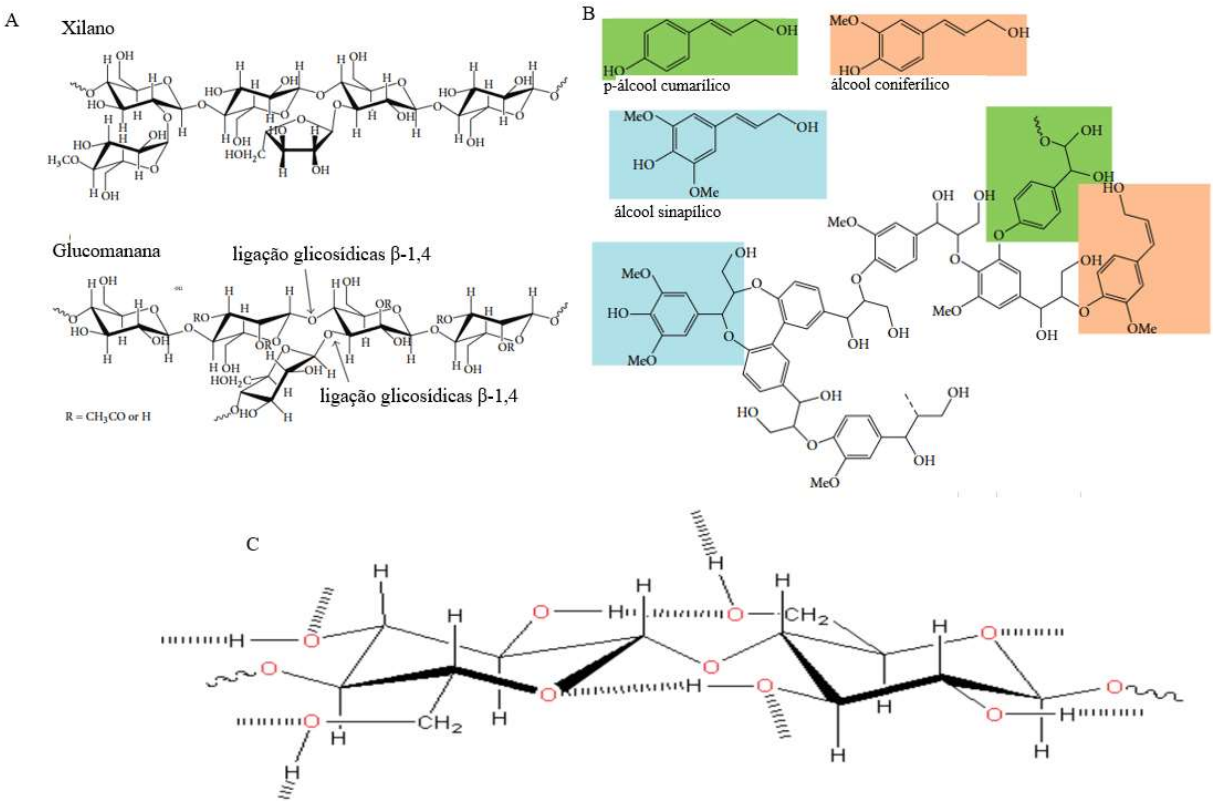


Figura 11. (A) principais constituintes da hemicelulose e sua estrutura química, (B) principais componentes da lignina (Lee, Hamid e Zain, 2014) e (C) estrutura linear da celulose (Donini *et al*., 2010).
Fonte: adaptado de (Lee, Hamid e Zain, 2014) – Tradução livre e (Donini *et al*., 2010)

O BCA apresenta uma composição mais rica em possíveis substrato para as BRS e outros microrganismos que formam uma relação sintrófica com estas, como é o caso das bactérias fermentativas. A celulose presente na biomassa lignocelulósica, após hidrolisada, libera glicose no meio, que pode ser fermentada e providenciar diferentes ácidos orgânicos às BRS. A hemicelulose possui uma estrutura heterogênea e pode liberar diferentes monômeros (e.g. glicose, manose, galactose, xilose, arabinose e outros) (Kumagai e Endo, 2021). A lignina por sua vez é a parte mais recalcitrante entre as três estruturas e pode desfavorecer a eficiência das BRS se usada de forma isolada (Coetser et al., 2006; Zhang et al., 2022). Por outro lado a presença da lignina com outras fontes de carbono se mostra favorável na cooperação de microrganismos, refletindo em uma maior diversidade microbiana (Zhang et al., 2022). Dessa forma, mesmo que os metais impactem alguma rota metabólica que possui determinado substrato como doador de elétrons, outras rotas podem ser empregadas, mantendo os microrganismos ativos.

A escolha do substrato é um fator determinante para a eficiência da sulfato-redução nos biorreatores. Afinal, a escolha do substrato pode moldar a comunidade microbiana formada afetando diretamente a performance dos reatores (Cao *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2023). Os

açúcares por sua vez, podem levar a acidificação dos reatores pela seleção de bactérias fermentativas e acúmulo de AGVs (Cao *et al.*, 2012). Como mencionado, no segundo dia do ensaio, as corridas realizadas com *mix* de doadores de elétrons contendo sacarose apresentaram uma queda no pH. Em pH mais ácido, tanto os ácidos orgânicos quanto o sulfeto e os metais pesados tornam-se mais tóxicos, afetando ainda mais o metabolismo celular. Em pH ácido o equilíbrio de formação dos AGVs e do sulfeto (H_2S) se deslocam para a formação de suas estruturas moleculares (moléculas neutras), estas podem adentrar as células mais facilmente do que suas formas iônicas (Ghose e Wiken, 1955; Moloantoa *et al.*, 2023). Uma vez dentro das células, nas quais o pH está neutro, elas ionizam-se e o H^+ liberado pode causar danos intracelulares. Além de desbalancear o pH no interior das células, o sulfeto pode agir desnaturando enzimas primárias e causando danos ao DNA (Dai *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022a). Os metais em meio ácidos também tendem a estar solúveis (forma iônica), sendo assim mais biodisponíveis e causando maiores danos aos seres vivos (Ippolito *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021). Como discutido sobre as estruturas que formam a lignocelulose, o BCA também apresentar açúcares em sua composição. Entretanto, sendo um DELL, a liberação desses compostos é feita de forma mais gradual o que pode balancear a acidificação do sistema com a produção de bicarbonato e o próprio consumo dos AGVs realizados pelas BRS.

CONCLUSÃO

As principais respostas obtidas da comparação dos substratos evidenciam que a significância dos fatores (metais) e a natureza de seus efeitos alteram-se diretamente de acordo com o substrato empregado nos reatores. Por exemplo, o cobre não foi estatisticamente significativo na produção máxima de sulfeto quando bagaço de cana de açúcar (BCA) foi usado, mas foi no *mix* de doadores de elétrons, com um efeito de -16. Os efeitos também podem ser de direções opostas: enquanto no BCA o zinco teve um efeito de +15, no *mix* seu efeito foi de -21. O ferro, por sua vez, registrou um efeito negativo de -28 no BCA, contrastando com um efeito positivo de +6 no *mix*.

A natureza dos substratos mostra-se, portanto, importante para o efeito dos metais, indicando que, de acordo com a composição da drenagem ácida de mina diferentes substratos devem ser empregados. A presença de sacarose no *mix*, com a consequente acidificação, pode ter levado à superioridade do BCA, demonstrando a importância de se escolher o substrato com cautela. Além disso, a própria estrutura do BCA pode auxiliar a diminuir a biodisponibilidade dos metais por meio da adsorção. E por fim, pluralidade de rotas metabólicas é importante para a manutenção das diferentes comunidades microbianas formadas.

REFERÊNCIAS

AKBARI, A.; SADANI, M.; AMIN, M. M.; TEIMOURI, F.; KHAJEH, M.; MAHDAVI, M.; HADI, M. Managing sulfate ions produced by sulfate radical-advanced oxidation process using sulfate-reducing bacteria for the subsequent biological treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 5, p. 5929–5937, 2018.

ALBERTINI, S.; FRANCISCO, L.; GONZAGA, L.; FILHO, P. Utilização de serragem e bagaço de cana-de-açúcar para adsorção de cádmio Use of sawdust and pulp from cane as adsorbents of cadmium**. Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, p. 113-118, 2007.

BRUEMMER, G. W.; GERTH, J.; HERMS, U. Heavy metal species, mobility and availability in soils. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, v. 149, n. 4, p. 382–398, 1986.

BRUEMMER, G. W.; GERTH, J.; HERMS, U. Heavy metal species, mobility and availability in soils. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v. 149, n. 4, p. 382–398, 1986.

CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass**. Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 76, p. 309-322, 2017.

CAO, J.; ZHANG, G.; MAO, Z. S.; LI, Y.; FANG, Z.; YANG, C. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. **International Journal of Mineral Processing**, v. 106–109, p. 58–64, 20, 2012.

COETSER, S. E.; PULLES, W.; HEATH, R. G. M.; CLOETE, T. E. Chemical characterisation of organic electron donors for sulfate reduction for potential use in acid mine drainage treatment. **Biodegradation**, v. 17, n. 2, p. 169–179, 2006.

CORDEIRO, M. DE A. **Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (*Euterpe Oleraceae* Mart) para produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Pará, Belém. 2016.

COSTA, R. B.; BEVILAQUA, D.; LENS, P. N. L. Pre-treatment and temperature effects on the use of slow-release electron donor for biological sulfate reduction. **Journal of Environmental Management**, v. 275, p. 111216, 2020.

COSTA, R. B.; GODOI, L. A. G.; BRAGA, A. F. M.; DELFORNO, T. P.; BEVILAQUA, D. Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors: Influence of electron donors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123622, 2021.

DAI, X.; HU, C.; ZHANG, D.; DAI, L.; DUAN, N. Impact of a high ammonia-ammonium-pH system on methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in mesophilic anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 598–605, 2017.

DALCIN MARTINS, P.; MONLEVAD, J. P. R. C. DE; ECHEVESTE MEDRANO, M. J.; LENSTRA, W. K.; WALLENIUS, A. J.; HERMANS, M.; SLOMP, C. P.; WELTE, C. U.; JETTEN, M. S. M.; HELMOND, N. A. G. M. VAN. Sulfide Toxicity as Key Control on Anaerobic Oxidation of Methane in Eutrophic Coastal Sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 58, n. 26, p. 11421–11435, 2024.

FORTIN, C. Metal bioavailability in aquatic systems— beyond complexation and competition. **Frontiers in Environmental Chemistry**, v. 5, p. 1345484, 2024.

GAO, Y.; TANG, X.; ZHONG, L.; ZHANG, B.; LI, S.; WANG, M.; XIAO, H.; FAN, C.; ZHENG, J. Co-pretreatment (calcium peroxide + freeze) to improve anaerobic fermentation of waste activated sludge: Method optimization and mechanism insights. **Chemical Engineering Journal**, v. 480, p. 148339, 2024.

GHOSE, T. K.; WIKEN, T. Inhibition of Bacterial Sulphate-Reduction in Presence of Short Chaiu Fatty Acids. **Physiologia Plantarum**, v. 8, n. 1, 1955.

GONZALEZ-SILVA, B. M.; BRIONES-GALLARDO, R.; RAZO-FLORES, E.; CELIS, L. B. Inhibition of sulfate reduction by iron, cadmium and sulfide in granular sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 400–407, 2009.

GU, Q.; CUI, X.; SHANG, H. Optimization of a modular continuous flow bioreactor system for acid mine drainage treatment using Plackett–Burman design. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 15, p. e2469, 2020.

HAMMACK, R. W.; EDENBORN, H. M.; DVORAK, D. H. Treatment of water from an open-pit copper mine using biogenic sulfide and limestone: a feasibility study**. War. Res**. v. 28, n. 11, p. 2321-2329, 1994.

HAO, J. O.; HUANG, L.; CHEN, J. M.; BUGLASS, R. L. Effects Of Metal Additions On Sulfate Reduction Activity In Wastewaters. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 197–212, 1994.

HU, C.; YANG, Z.; CHEN, Y.; TANG, J.; ZENG, L.; PENG, C.; CHEN, L.; WANG, J. Unlocking soil revival: the role of sulfate-reducing bacteria in mitigating heavy metal contamination. **Environmental Geochemistry and Health,** v. 46, n. 10, p. 417, 2024.

IPPOLITO, J. A.; BERRY, C. M.; STRAWN, D. G.; NOVAK, J. M.; LEVINE, J.; HARLEY, A. Biochars Reduce Mine Land Soil Bioavailable Metals. **Journal of Environmental Quality**, v. 46, n. 2, p. 411–419, 2017.

KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Sulfate reduction-based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals**. Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 6, p. 541-564, 2007.

KIM, K.-R.; OWENS, G.; NAIDU, R.; KIM, K.-H. Assessment techniques of heavy metal bioavailability in soil. **Korean J. Soil Sci. Fert.**, v. 40, n. 4, p. 311–325, 2007.

KIM, R. Y.; YOON, J. K.; KIM, T. S.; YANG, J. E.; OWENS, G.; KIM, K. R. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 37, n. 6, p. 1041–1061, 2015.

KIRAN, M. G.; PAKSHIRAJAN, K.; DAS, G. Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: Mechanism and cell surface characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 62–70, 2017.

KUMAGAI, A.; ENDO, T. Effects of hemicellulose composition and content on the interaction between cellulose nanofibers. **Cellulose**, v. 28, n. 1, p. 259–271, 2021.

LIU, Y.; SERRANO, A.; WYMAN, V.; MARCELLIN, E.; SOUTHAM, G.; VAUGHAN, J.; VILLA-GOMEZ, D. Nickel complexation as an innovative approach for nickel-cobalt selective recovery using sulfate-reducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123506, 2021.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; NI, B. J. Evaluating enhanced sulfate reduction and optimized volatile fatty acids (VFA) composition in anaerobic reactor by Fe (III) addition. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 4, p. 2123–2131, 2015.

MATOS PAZ, J. E. DE; CURBELO GARNICA, A. I.; CURBELO, F. D. DA S. Estudo da adsorção de chumbo utilizando como adsorvente bagaço de cana de açúcar ativado. **HOLOS**, v. 8, p. 3–18, 2018.

MOLOANTOA, K.; KHETSHA, Z.; MOCHANE, M.; UNUOFIN, J.; ATANGANA, A.; CASON, E.; HEERDEN, E. VAN; CASTILLO, J. Evaluating the effects of pH and temperature on sulphate-reducing bacteria and modelling of their effects in stirred bioreactors. **Environmental Pollutants and Bioavailability**, v. 35, n. 1, 2023.

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

NATALE JR, R. **Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Araraquara: Instituto de Química - UNESP Araraquara, 2022.

NEVATALO, L. M.; MÄKINEN, A. E.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Biological hydrogen sulfide production in an ethanol-lactate fed fluidized-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 276–284, 2010.

OWUSU-AGYEMAN, I.; PLAZA, E.; CETECIOGLU, Z. Long-term alkaline volatile fatty acids production from waste streams: Impact of pH and dominance of *Dysgonomonadaceae*. **Bioresource Technology**, v. 346, p. 126621, 2022.

PALMA, K. R. DE; TOMAZ, E.; SORIA-VERDUGO, A.; SILVA, M. A. The influence of the elemental and structural chemical composition on the ash fusibility of sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Fuel**, v. 304, p. 121404, 2021.

PANDA, S.; COSTA, R. B.; SHAH, S. S.; MISHRA, S.; BEVILAQUA, D.; AKCIL, A. Biotechnological trends and market impact on the recovery of rare earth elements from bauxite residue (red mud) – A review**. Resources, Conservation and Recycling,** v. 171, p. 105645, 2021.

REYES-ALVARADO, L. C.; CAMARILLO-GAMBOA, Á.; RUSTRIAN, E.; RENE, E. R.; ESPOSITO, G.; LENS, P. N. L.; HOUBRON, E. Lignocellulosic biowastes as carrier material and slow-release electron donor for sulphidogenesis of wastewater in an inverse fluidized bed bioreactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5115–5128, 2018.

REYES-ALVARADO, L. C.; OKPALANZE, N. N.; RENE, E. R.; RUSTRIAN, E.; HOUBRON, E.; ESPOSITO, G.; LENS, P. N. L. Carbohydrate based polymeric materials as slow release electron donors for sulphate removal from wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 407–415, 2017.

ROY, R.; SAMANTA, S.; PANDIT, S.; NAAZ, T.; BANERJEE, S.; RAWAT, J. M.; CHAUBEY, K. K.; SAHA, R. P. An Overview of Bacteria-Mediated Heavy Metal Bioremediation Strategies**. Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 196, n. 3, p. 1712-1751, 2024.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; SANZ, J. L.; BIJMANS, M. F. M.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, p. 98–109, 2014.

SANTOS, A. M. DOS; COSTA, J. M.; BRAGA, J. K.; FLYNN, T. M.; BRUCHA, G.; SANCINETTI, G. P.; RODRIGUEZ, R. P. Lactate as an effective electron donor in the sulfate reduction: impacts on the microbial diversity. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 43, n. 20, p. 3149–3160, 2022.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. v. 2, p. 27–32, 2007.

SINGH, R.; SINGH, S.; TRIMUKHE, K. D.; PANDARE, K. V.; BASTAWADE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane bagasse:

Preparation, purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 1, p. 57–66, 2005.

SREEDEVI, P. R.; SURESH, K.; JIANG, G. Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. **Journal of Water Process Engineering,** v. 48, p. 102884, 2022.

STAMS, A. J. M.; DIJK, J. B. VAN; DIJKEMA, C.; PLUGGE, C. M. Growth of Syntrophic Propionate-Oxidizing Bacteria with Fumarate in the Absence of Methanogenic Bacteria**. Applied and environmental microbiology,** v. 59, n. 4, p. 1114-1119, 1993.

VANAJA, K.; RANI, R. H. S. Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design. **Clinical Research and Regulatory Affairs**, v. 24, n. 1, p. 1-23, 2007.

VIEIRA, B. F.; RODRIGUEZ, R. P.; PAULA, E. C. DE; BRAGA, J. K.; SIMÕES, G. F. Sustainable treatment of real-mine drainage using crude glycerol and brewery waste as electron donors in a micro-aerobic system. **Journal of Water Process Engineering**, v. 36, p. 101297, 2020.

VLYSSIDES, A.; BARAMPOUTI, E. M.; MAI, S. Influence of ferrous iron on the granularity of a UASB reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 146, n. 1, p. 49–56, 2009.

XAVIER, C. S. F.; CRISPINIANO, F. F.; NASCIMENTO, K. K. R. DO; ALMEIDA, M. M. DE; VIEIRA, F. F. Drying and evaluation of sugarcane bagasse, as adsorbent of textile dyes present in aqueous solutions. **Revista Materia**, v. 26, n. 1, 2021.

YIN, K.; WANG, Q.; LV, M.; CHEN, L. Microorganism remediation strategies towards heavy metals**. Chemical Engineering Journal,** v. 360, p. 1553-1563, 2019.

YIN, L.; ZHOU, A.; WEI, Y.; VARRONE, C.; LI, D.; LUO, J.; HE, Z.; LIU, W.; YUE, X. Deep insights into the roles and microbial ecological mechanisms behind waste activated sludge digestion triggered by persulfate oxidation activated through multiple modes. **Environmental Research,** v. 252, p. 118905, 2024.

ZHANG, ZHAO; ZHANG, C.; YANG, Y.; ZHANG, ZHUOWEI; TANG, Y.; SU, P.; LIN, Z. A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment**. Journal of Cleaner Production,** v. 376, p. 134109, 2022.

ZHAO, C.; CHEN, N.; LIU, T.; FENG, C. Effects of adding different carbon sources on the microbial behavior of sulfate-reducing bacteria in sulfate-containing wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 392, p. 136332, 2023.

ZHAO, Z.; LI, Y.; QUAN, X.; ZHANG, Y. Towards engineering application: Potential mechanism for enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with different types of conductive materials. **Water Research**, v. 115, p. 266–277, 2017.

CAPÍTULO 2. BIOESTIMULAÇÃO COM LACTATO EM REATORES SULFETOGÊNICOS PARA TRATAMENTO DE DRENAGENS ÁCIDAS DE MINAS.

1 INTRODUÇÃO

Nos biorreatores, uma fase essencial é o período inicial de adaptação microbiana (aclimatação), durante o qual as populações de microrganismos de interesse se estabelecem. No caso dos reatores sulfetogênicos busca-se criar condições propícias para o estabelecimento de BRS e a redução de sulfato (Neculita e Zagury, 2008; Waybrant, Ptacek e Blowes, 2002). Normalmente, essa etapa ocorre em batelada e pode se estender por semanas, o que acaba retardando o processo de tratamento e comprometendo sua eficiência econômica. Para superar essa limitação, pesquisas recentes têm explorado a possibilidade de aclimatação contínua dos microrganismos, utilizando DELL (Miranda *et al.*, 2022; Sato *et al.*, 2022). A ideia central é que ao fazer a aclimatação de forma contínua e muitas vezes já na presença do resíduo, ocorre uma pressão seletiva favorecendo o crescimento de microrganismos mais robustos e eficientes nos tratamentos empregados. Apesar de apresentarem benefícios econômicos para a recuperação de metais e o tratamento das DAM, os DELL podem impactar a demanda química de oxigênio (DQO), o que pode afetar negativamente a fase inicial do reator (Reyes-Alvarado *et al.*, 2018). A relação entre DQO/SO_4^{2-} é determinante para a eficiência da redução de sulfato, sendo que uma quantidade insuficiente de matéria orgânica limita esse processo (Costa *et al.*, 2021; Mizuno e Noike, 1994; O'flaherty *et al.*, 1998). Embora os DELL tenham demonstrado resultados promissores em sistemas batelada (Costa *et al.*, 2020), a atividade das BRS em operação contínua não se estabelece facilmente, e uma mistura de compostos orgânicos de baixo peso molecular mostrou melhor desempenho.

A partir disso, a hipótese levantada foi de que a adição de um co-substrato facilmente degradável durante o início do funcionamento contínuo do reator pode acelerar a consolidação do processo sulfetogênico. Para isso, o resíduo da produção de cerveja, grão gasto de cevada (GGC) direto do inglês (*brewery spent grain* – BSG), amplamente disponível na Irlanda e já utilizado em estudos similares, foi empregado como DELL. O co-substrato escolhido foi o lactato, pois é reconhecido como um doador de elétrons preferencial para as BRS (Liamleam e Annachhatre, 2007; Nagpal *et al.*, 2000; Neculita e Zagury, 2008). Para a DAM sintética testada foram usados cobre e zinco, que como mencionado no primeiro capítulo, são metais comumente associados as drenagens ácidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral: Avaliar o estabelecimento do processo sulfetogênico na fase inicial de um reator contínuo, fornecendo um doador de elétrons de liberação lenta (DELL) e um co-substrato de baixo peso molecular.

2.1.1 Objetivos específicos:

a) Avaliar o uso do lactato como co-substrato para aclimatação de forma contínua.
b) Avaliar e comparar a performance de dois reatores: um alimentado apenas com GCG e outro com GCG e lactato como co-substrato.
c) Comparar a robustez dos reatores em relação a presença de cobre e zinco.
d) Analisar se o pré-tratamento do lodo granular anaeróbio pode levar a uma melhora na produção de sulfeto.
e) Avaliar diferentes relações substrato/sulfato em reatores batelada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem e preparo da biomassa

Para este estudo, o inóculo usado foi lodo granular obtido de um reator anaeróbio de uma fazenda de laticínios em Carbery, localizada em Cork, Irlanda. Antes de ser introduzido nos reatores, o lodo passou por um processo de limpeza. Essa etapa consistiu na lavagem com uma solução tampão de fosfato (PBS) para eliminar qualquer resíduo que fornecesse demanda química de oxigênio (DQO) que estivesse dissolvida. O procedimento de lavagem envolveu a centrifugação do lodo, misturado com PBS, em uma centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra X-30R (Califórnia, EUA), equipada com rotor SX4400. A centrifugação foi realizada a 4700 rpm por 15 minutos, a uma temperatura de 25°C. Após cada ciclo, o sobrenadante era descartado, e o processo foi repetido mais duas vezes para garantir a limpeza. Ao final da lavagem com PBS, a análise do lodo revelou concentrações de sólidos totais (ST) de 80.7 ± 1.5 g L^{-1} e de sólidos voláteis totais (SVT) de 58.1 ± 1.2 g L^{-1}. Adicionalmente, os grãos gastos de cevada (GGC) obtidos de uma fabricante de cerveja *lager* na Irlanda foram incorporados sem qualquer pré-tratamento e ainda estado úmido. Este material também desempenhou o papel de fonte de inóculo (microrganismos endógenos). A porcentagem de ST no GGC foi determinada em 50.2 (± 3) % (m/m).

3.2 Meio basal e DAM sintética

O meio basal utilizado apresentou a seguinte composição (mg L^{-1}): KH_2PO_4 (408), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (534), NH_4Cl (300), NaCl (300), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (100), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (110), Resazurina (0,500), Cisteína (500), Extrato de Levedura (100). O meio também foi suplementado com elementos-traço (mg L^{-1}): HCl (1,8), H_3BO_3 (0,0618), $MnCl_2$ (0,0613), $FeCl_2$ (0,944), $CoCl_2$ (0,0645), $NiCl_2$ (0,0129), $ZnCl_2$ (0,0677), $CuCl_2$ (0,0134), NaOH (0,4), Na_2SeO_3 (0,0173), Na_2WO_4 (0,0294), Na_2MoO_4 (0,0205). Vitaminas também foram adicionadas (mg L^{-1}): biotina (0,02), nicotinamida (0,2), ácido p-aminobenzóico (0,1), tiamina (0,2), ácido pantotênico (0,1), piridoxamina (0,5), cianocobalamina (0,1) e riboflavina (0,1) (Stams et al., 1993). O pH foi ajustado para 6,0 com HCl e a concentração de sulfato foi definida em 2000 mg L^{-1} utilizando-se Na_2SO_4. Para o reator $R_{co\text{-}sub}$, lactato (300 mgO_2 L^{-1} como DQO) também foi adicionado durante o período de aclimatação. Para tamponar o meio, utilizou-se 0,8 g L^{-1} de $NaHCO_3$. A adição de metais foi realizada utilizando $ZnCl_2$ e $Cu(NO_3)_2$ como fontes de zinco e cobre, respectivamente. A cada preparo de um novo meio, foi aplicado fluxo de argônio durante o resfriamento para remover o oxigênio residual.

3.3 Reatores contínuos

O experimento utilizou dois reatores de leito estruturado com fluxo descendente (DFSBR), cada um com um volume total de 1 L e um volume operacional de 850 mL. O material de suporte e, ao mesmo tempo, substrato para o leito estruturado consistia em 24 pacotes, cada um contendo 2 g de GCG úmido, os quais foram empacotados em um tecido de nylon e amarrados com fio de nylon (Figura 12B). Os pacotes foram fixados em uma haste plástica e dispostos transversalmente em toda a extensão do reator, desde a parte superior até a inferior (Figura 12). Os reatores foram operados sob um tempo de residência hidráulica (TRH) de 16 h, mantendo uma vazão de entrada constante de 0.88 mL min^{-1}. A temperatura operacional foi a ambiente, com uma média de 20°C.

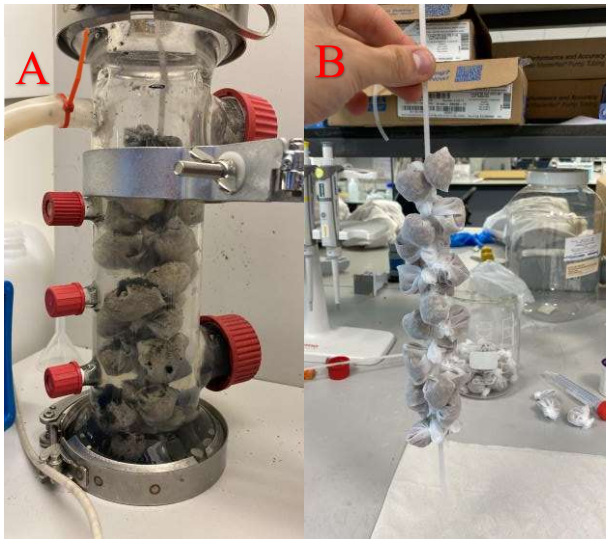


Figura 12. Estrutura dos reatores e arranjo do material de suporte. (A) Reator R_{GGC} durante a operação. (B) Pacotes de GGC e o suporte estrutural usado para seu arranjo dentro dos reatores. Fonte: próprio autor.

3.4 Teste de atividade microbiana

A avaliação da atividade microbiana foi conduzida em frascos de borossilicato de 250 mL, com um volume reacional de 150 mL e em triplicatas. O ensaio foi realizado para verificar a atividade sulfato redutora da biomassa antes e após o contato com os metais. Foram realizados dois conjuntos de experimentos: o primeiro antes da introdução dos metais no sistema e o segundo ao término da operação. A composição do meio de reação replicou a composição no reator contínuo, incluindo a solução tampão para estabelecer um pH neutro. A concentração de sulfato foi ajustada para 1500 mg L^{-1}, e o lactato foi empregado como substrato, com uma relação DQO/SO_4^{2-} de 1. Para cada batelada, dois pacotes de GGC foram retirados da parte central de cada reator e rapidamente transferidos para os frascos (um pacote por frasco). Para a remoção do oxigênio residual, utilizou-se um fluxo de argônio por três minutos em cada frasco.

3.5 Ensaios em batelada

Os ensaios em batelada foram conduzidos em frascos de 1 L, cada um contendo 600 mL de meio reacional. A composição desse meio era a mesma empregada nos reatores contínuos, porém, sem a adição de metais e com uma concentração de cisteína de 500 mg L^{-1}. O objetivo do ensaio foi investigar a relação ideal entre substrato e sulfato, foram preparados cinco conjuntos de testes, cada um em triplicata, com diferentes quantidades de GGC: 4, 8, 15, 25 e 35 g. A condição que utilizou 35 gramas de GGC foi ajustada para ser proporcional à massa de GGC contida nos reatores contínuos, garantindo assim uma quantidade que pudesse ser comparada entre ambos os sistemas.

Adicionalmente, com o objetivo de avaliar o impacto do pré-tratamento do inóculo inicial, foram montados três conjuntos de testes em triplicata. O primeiro consistia apenas do meio de cultura e 35 g de GGC. O segundo combinava 35 g de GGC com 8 g de lodo não triturado. Por fim, o terceiro conjunto incluía 35 g de GGC e 8 g de lodo triturado. A trituração do lodo foi realizada com o uso de um almofariz e pistilo até que os grânulos estivessem completamente desfeitos. A concentração de cisteína no meio, para esta série de testes, foi reduzida para 100 mg L^{-1}, mimetizando as condições da fase II do reator contínuo. Em todas as preparações, um fluxo de argônio foi empregado para remover o oxigênio do meio.

3.6 *Design* experimental

Os dois reatores utilizados foram inoculados e entraram em funcionamento simultaneamente (Figura 13). Para a etapa de inoculação, uma mistura de 850 mL de lodo e meio basal, na proporção de 1:10, foi adicionada a cada reator. O material de suporte permaneceu em contato com essa solução por um período de 24 horas. Após o contato inicial da biomassa, cada sistema de reator foi acoplado a frascos contendo 500 mL de meio basal e o sistema foi operado em modo batelada em ciclo por cinco dias. Esse processo é compreendido como inoculação do sistema, não refletindo o período de aclimatação ou operação. Ao final desse período de inoculação, o fluxo contínuo foi ativado para ambos os reatores, que permaneceram em operação por um total de 126 dias.

Na fase inicial, o meio empregado para o crescimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS) continha 100 mg L^{-1} de extrato de levedura e 500 mg L^{-1} de cisteína, sem a adição de tampão. Durante a realização do teste de efeito das vitaminas (que ocorreu entre os dias 36 e 66), o extrato de levedura foi retirado do meio, e a concentração de cisteína foi ajustada para 100 mg L^{-1}. Após esse intervalo, a concentração de cisteína foi novamente elevada para 500 mg L^{-1}, mantendo-se assim até o término da operação.

No dia 107, deu-se início à Fase III, com a adição de cobre e zinco, cada um na concentração de 10 mg L^{-1}. Posteriormente, no dia 114, a concentração de ambos os metais foi elevada para 50 mg L^{-1}, e permaneceu nessa faixa até o fim da operação. Observou-se uma redução no pH em ambos os reatores em momentos distintos do período operacional: no reator R_{GGC}, a queda ocorreu no dia 36, enquanto no reator $R_{co\text{-}sub}$, foi no dia 69. Para contornar essa diminuição de pH, uma solução tampão de bicarbonato começou a ser empregada (4 g L^{-1}), e um novo pH de trabalho de 8.0 foi estabelecido, sendo mantido até o fim do experimento.

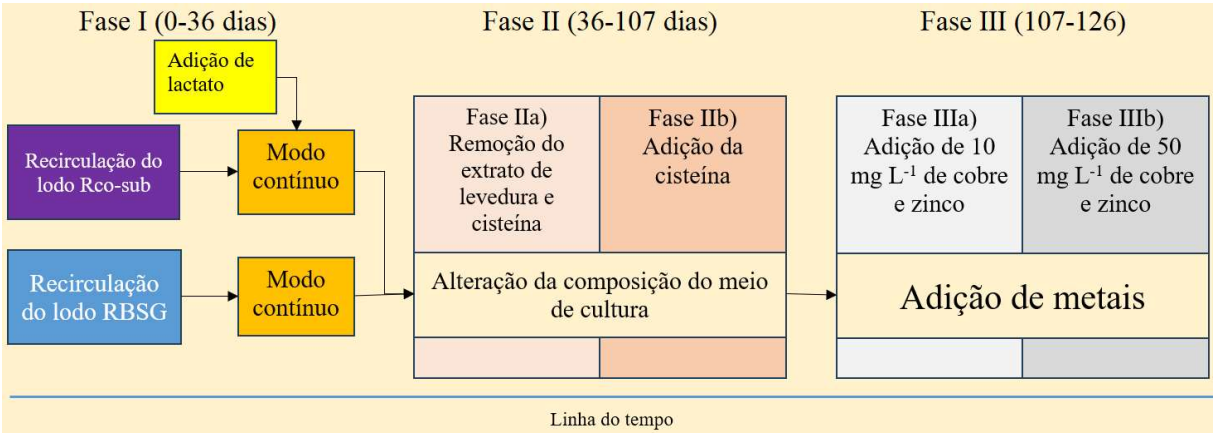


Figura 13. Desenho experimental da operação dos biorreatores contínuos.

Fonte: próprio autor

3.7 Métodos analíticos

A quantificação do sulfeto dissolvido total, foi feita utilizando o kit colorimétrico HACH® que utiliza o método do azul de metileno, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a adição dos reagentes do kit, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro HACH® (modelo DR 3900, Ames, EUA) em um comprimento de onda de 665 nanômetros (APHA, 1999). A medição de sulfato foi feita utilizando um cromatógrafo de íons (Thermo Scientific, modelo Dionex Aquion, Waltham, EUA). Para a separação, foram utilizadas uma pré-coluna Thermo Scientific Ion Pac AS14A e uma coluna de trabalho Thermo Scientific Ion Pac AG14A, conforme a metodologia detalhada por (Costa, Bevilaqua e Lens, 2020). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL min^{-1}, e o tempo de corrida para cada amostra foi de 37 minutos. As amostras foram previamente filtradas com filtro de seringa de 0.22 µm.

O monitoramento do pH do afluente e efluente dos reatores foi feito com um pHmetro (Mettler Toledo, modelo Fiveeasy F20, Columbus, EUA). O potencial de oxirredução (Eredox), por sua vez, foi determinado com um pHmetro Orion Dual Star (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Ambas as medições foram feitas diretamente nas amostras brutas (sem filtragem prévia). A quantificação de AGVs foi feita por cromatografia gasosa, utilizando um equipamento Varian Saturn 2000 GC acoplado a um amostrador automático CombiPal e um detector de ionização por chama (Costa, Bevilaqua e Lens, 2020)

A análise de açúcares totais seguiu o método fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), com as amostras sendo posteriormente lidas em um espectrofotômetro a 490 nm. O monitoramento de DQO total (DQOt) foi feito segundo o método colorimétrico, com auxílio de kit comercial (Reagecon, Shannon, Irlanda), onde as amostras brutas (não filtradas) dos reatores foram adicionadas diretamente aos frascos do kit. As amostras foram incubadas a 150 °C por 2 horas e, em seguida, analisadas no mesmo espectrofotômetro utilizado para sulfeto, mas com

um comprimento de onda de 435 nanômetros, conforme metodologia de Mills *et al*. (2021). A DQO solúvel (DQOs) foi determinada seguindo o mesmo protocolo, porém, as amostras foram previamente filtradas com um filtro de seringa de 0.42 μm.

As concentrações de cobre e zinco foram analisadas por ICP-OES (ThermoFisher, EUA). As condições operacionais do espectrômetro ICP-OES incluíram: potência de RF de 1.2 kW, vazão de plasma de argônio de 12 litros por minuto, vazão auxiliar de argônio de 1.0 litro por minuto, vazão de argônio do nebulizador de 0.7 litro por minuto, e vazão da amostra de 1.0 litro por minuto, de acordo com o procedimento descrito por Costa, Bevilaqua e Lens (2020).

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Ao término do experimento com os reatores contínuos, duas amostras de aproximadamente 1 g foram coletadas de cada reator, sendo uma da porção inferior (precipitados) e outra do material de suporte (GGC). Imediatamente após a coleta, essas amostras foram transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL e colocados em presença de um fixador primário. O fixador era composto por 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, com pH ajustado para 7.2. As amostras permaneceram em contato com o fixador por um período de duas horas.

Após a fixação, o fixador foi cuidadosamente removido vertendo os eppendorfs, e as amostras foram submetidas a duas lavagens com tampão cacodilato de sódio 0.2 M. Para cada lavagem, as amostras permaneceram em contato com a solução por 5 minutos. Concluídas as lavagens, o tampão foi descartado, e as amostras passaram por um processo de desidratação gradual com etanol. Inicialmente, foi adicionada uma solução de etanol a 30%, na qual as amostras permaneceram por dois períodos de 15 minutos. Esse mesmo protocolo de lavagem e contato de 15 minutos foi repetido sequencialmente com soluções de etanol a 50%, 70%, 90% e, por fim, 100%, como demonstrado por Mills et al. (2021).

Após essa etapa de desidratação, as amostras foram posicionadas em suportes de alumínio, utilizando uma fita adesiva dupla-face. Em seguida, as amostras foram revestidas com ouro por pulverização catódica (*sputter coating*). Finalmente, as amostras preparadas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um equipamento Hitachi S-2600 (Mountain View, CA, EUA), conforme a metodologia também descrita por Mills *et al*. (2021).

3.9 Amostragem e análise de DNA

Para a análise de DNA, foram coletadas três amostras em duplicata: o lodo granular inicial (inóculo) e o biofilme formado no material suporte de cada reator ao final da operação. Ao final do período de operação, os pacotes de GGC foram removidos dos reatores. O GGC foi

retirado de cada pacote e porção de aproximadamente 20 g foi submetida a um processo de sonicação. Este processo ocorreu por 30 minutos, à temperatura ambiente, em 90 mL de tampão PBS, com o objetivo de suspender os microrganismos aderidos ao material de suporte.

Após a sonicação, 40 mL do sobrenadante foram filtrados através de um tecido estéril, para eliminar fibras e partículas maiores, e transferidos para um tubo estéril de 50 mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7197 *g* por 30 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Com o *pellet* formado, entre 1.5 e 2.0 mL de PBS foram adicionados ao tubo falcon de 50 mL para ressuspender o *pellet*, que então foi transferido para um tubo de centrifugação de 2.0 mL. Após a transferência, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 8000 *g*, sendo posteriormente congelado por choque em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -20 °C. A metodologia empregada foi adaptada de um protocolo para suspensão de biomassa de grama e vegetais.

A extração de DNA e as análises subsequentes foram realizadas pela empresa Novogene. O sequenciamento metagenômico de amplicon foi executado na plataforma Illumina Sequencing PE250, resultando em aproximadamente 100.000 *tags* por amostra. As regiões V4 e V5 do gene 16S rRNA foram amplificadas utilizando os *primers* 515F e 907R, o que gerou fragmentos com cerca de 450 pares de bases.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Operação dos reatores contínuos

4.1.1 Fase de inoculação e aclimatação (Fase I)

A etapa inicial, abrange a etapa de inoculação dos reatores e a aclimatação dos microrganismos nos reatores. Após aproximadamente três semanas de operação (dia 21), a concentração de sulfeto atingiu uma concentração em torno de 90 mg L^{-1} de modo estável em ambos os sistemas. Após duas semanas (dia 33) a concentração elevou-se ainda mais no reator $R_{co\text{-}sub}$, alcançando 140 mg L^{-1} (Figura 14A). É provável que o período inicial, principalmente de aderência da biomassa no material suporte e crescimento inicial das BRS, foi similar para os reatores (Figura 14A, B). Entretanto o lactato estimulou as BRS fazendo com que o reator com co-substrato superasse o R_{GGC} na produção de sulfeto. Comparando os reatores (R_{GGC} e $R_{co\text{-}sub}$),

fica claro o efeito positivo do lactato na fase de aclimatação, demonstrado pela concentração de sulfeto em torno de 64% superior no $R_{co\text{-}sub}$.

Fonte: próprio autor

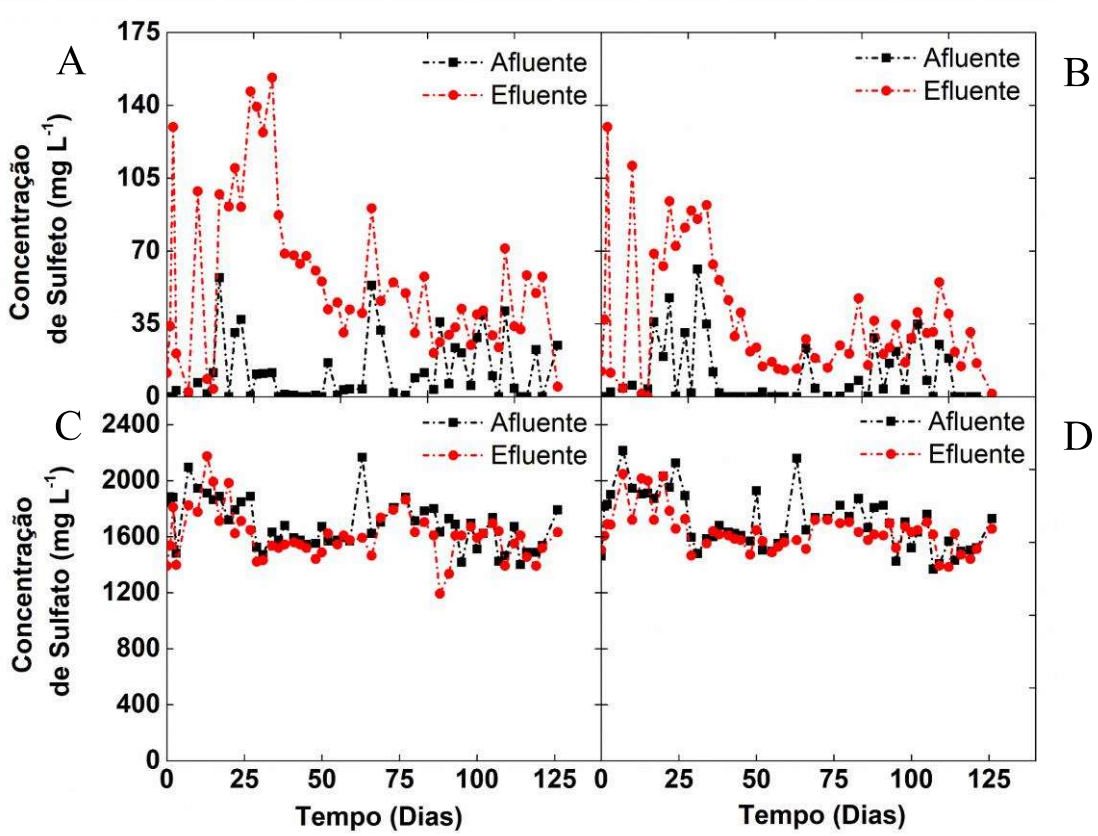


Figura 14. Análises físico-químicas da operação do reator $R_{co\text{-}sub}$ (Esquerda) e do reator R_{GGC} (Direita). (A, B) Produção de sulfeto. (C, D) Redução de sulfato.
Fonte: próprio autor

Pesquisas anteriores como a de Kumar, Sinharoy e Pakshirajan (2018), que utilizaram um reator de leito fixo contínuo, registraram concentrações de sulfeto menores, cerca de 20 mg L^{-1}, no mesmo período de fase inicial, empregando monóxido de carbono (CO) como substrato. Outros estudos também apontaram para uma partida menos eficiente em biorreatores que usaram etanol e lactato como substrato, como o de Nevatalo et al. (2010), que atingiram uma média de 82 mg L^{-1} de sulfeto em 188 dias de operação.

Em relação ao Eredox (Figura 15A, B), o reator $R_{co\text{-}sub}$ exibiu um perfil mais favorável para um sistema de redução de sulfato. Após o dia 17, seu potencial atingiu -200 mV e se manteve próximo a esse valor até o dia 36. Em contrapartida, o reator R_{GGC}, embora o Eredox do afluente tenha diminuído e alcançado um valor próximo a -300 mV no dia 17, sustentando esse nível até o dia 36, o Eredox de efluente não conseguiu manter o mesmo potencial ficando em torno de -100 mV. Ressalta-se que o Eredox nessa faixa é considerado ideal para o

crescimento e desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS), conforme apontado por diversos estudos (Villa-Gomez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022a). No entanto, mesmo com valores negativos, o Eredox no reator R_{GGC} permaneceu mais elevado em comparação com o $R_{co\text{-}sub}$. A presença do lactato estimulando as BRS fez com que o reator com co-substrato tivesse uma ação maior sob o Eredox, diminuindo esses valores e mantendo uma atmosfera mais ideal para a redução de sulfato.

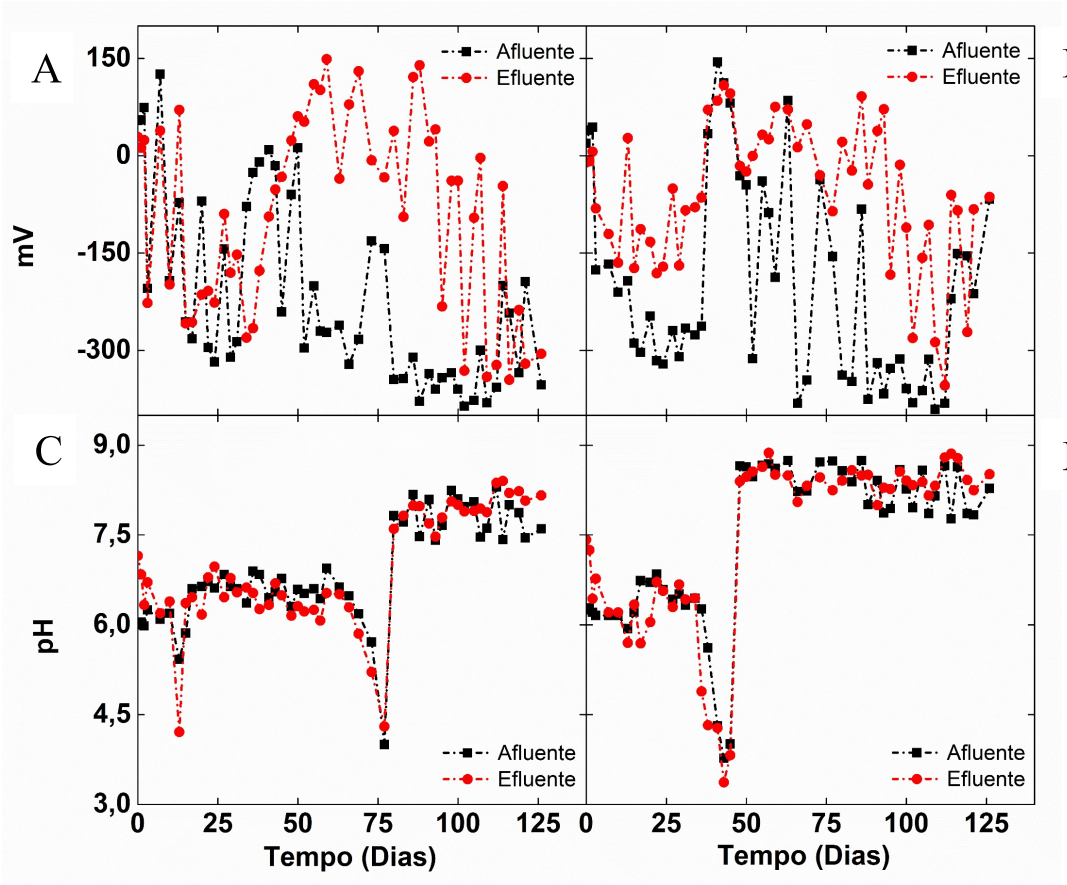


Figura 15. Análises físico-químicas da operação do reator $R_{co\text{-}sub}$ (Esquerda) e do reator R_{GGC} (Direita). (A, B) Potencial de oxirredução (Eredox). (C, D) pH.
Fonte: próprio autor.

A demanda química de oxigênio (DQO) é um fator determinante para com a eficiência do sistema, afinal ela indica indiretamente a quantidade de matéria orgânica. Assim, pode demonstrar se o substrato disponível está sendo usada e para qual rota é empregado. Os dados coletados para DQO total e solúvel são apresentados na Figura 16 No afluente dos reatores a principal fonte de DQO foi a cisteína. No caso do reator $R_{co\text{-}sub}$, o lactato também contribuiu significativamente promovendo uma DQO de aproximadamente 300 mgO_2 L^{-1}. Para o $R_{co\text{-}sub}$, os níveis de DQO no afluente foram de 709 ± 206 mg L^{-1} para a DQOt e 245 ± 92 mg L^{-1} para a DQOs. No efluente, esses valores foram reduzidos para 363 ± 191 mg L^{-1} de DQOt e 65 ± 42 mg L^{-1} de DQOs, o que representa uma eficiência de remoção de 51% para DQOt e 57% para

DQOs. Já no reator R_{GGC}, a DQOt e a DQOs na entrada foram de 477 ± 216 mg L^{-1} e 134 ± 75 mg L^{-1}, respectivamente, com valores de saída de 172 ± 48 mg L^{-1} de DQOt e 43 ± 35 mg L^{-1} de DQOs, resultando em eficiências de remoção de 64% e 68%, respectivamente. Ressalta-se sobre a DQO que o sistema empregava o substrato GGC como o material de suporte no interior dos reatores, portanto a DQO liberada pelo material não foi monitorada. Há possibilidade da remoção da DQO nesse sentido, ter sido ainda maior.

Os resultados da DQO consumida e a produção de sulfeto sugerem que outros compostos orgânicos estavam sendo produzidos como ácidos graxos voláteis (AGVs), e provavelmente gases (H_2 e metano). A DQOt refletia a presença de compostos sólidos do meio, enquanto a DQOs devia-se principalmente à contribuição do lactato e da cisteína, que são totalmente solúveis. Por isso, esperava-se uma diferença mais acentuada na DQOs entre os reatores, devido à adição extra de lactato no $R_{co\text{-}sub}$. No afluente havia produção de sulfeto, principalmente na fase I, é provável que o lactato estivesse sendo consumido ainda nos tanques de alimentação.

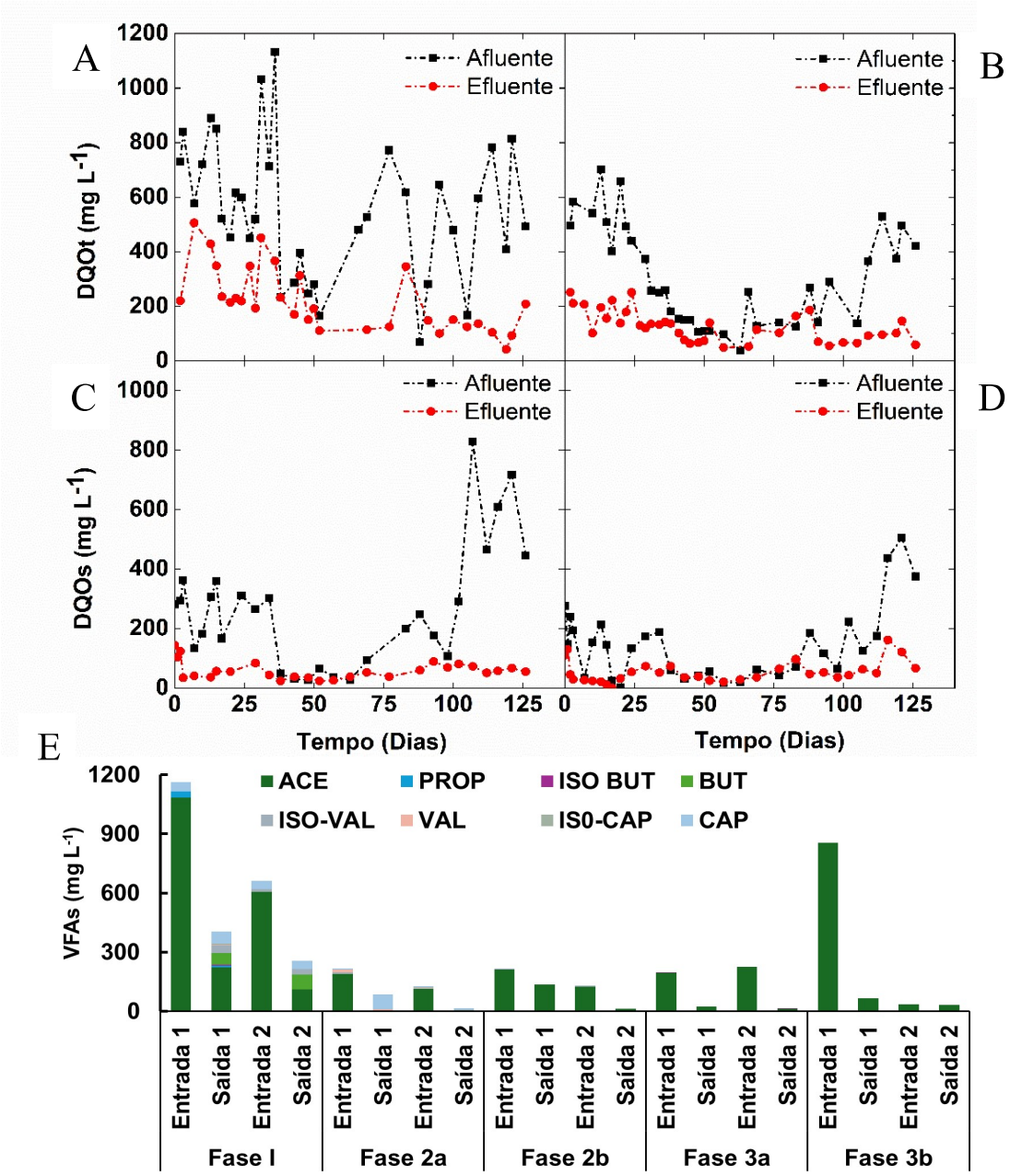


Figura 16. Análises físico-químicas da operação do reator $R_{co\text{-}sub}$ (esquerda) e do reator R_{BSG} (direita). (A, B) Demanda química de oxigênio total (DQOt). (C, D) Demanda química de oxigênio solúvel (DQOs). (E) Perfil de ácidos graxos voláteis (AGVs) em cada fase. Entrada e saída 1 ($R_{co\text{-}sub}$) e entrada e saída 2 (R_{BSG}).
Fonte: próprio autor.

4.1.2 Fase II: alteração da composição do meio de cultura

4.1.2.1 Fase IIa: omissão do extrato de levedura e diminuição da carga de cisteína

A Fase IIa, que se estendeu do dia 36 ao dia 66, foi delineada para investigar os impactos das alterações no meio de cultivo, especificamente a retirada do extrato de levedura e a diminuição da concentração de cisteína que além de fontes de DQO: a cisteína é um agente redutor usado para retirar oxigênio do meio, ajudando no estabelecimento de valores menores

de Eredox (Göbbels *et al.*, 2021; Harman, Mottley e Mason, 1984). O extrato de levedura além de micronutrientes fornece vitaminas para o meio (York e Ingrain, 1996; Zarei, Dastmalchi e Hamzeh-Mivehroud, 2016). A mudança foi feita principalmente para retirar a DQO do afluente o que deveria acarretar na suspensão da produção de sulfeto nos tanques de alimentação.

Após a omissão da cisteína, o Eredox no reator $R_{co\text{-}sub}$ apresentou um aumento significativo, indo de -165.5 mV no dia 36 para +148.7 mV no dia 59. Essa elevação impactou negativamente a atividade das BRS e, consequentemente, a redução de sulfato. No reator R_{GGC}, a resposta foi similar: o Eredox passou de -36.5 mV no dia 36 para +150.9 mV no dia 43. Pelo volume dos reatores e TRH usado, provavelmente a retirada da cisteína impactou a concentração de oxigênio dissolvido, fazendo com que o Eredox fosse para valores positivos impactando as BRS. Fica notório a diminuição na concentração de sulfeto após as alterações no meio de cultura no dia 36 (Figura 14A, B). Os valores caíram de aproximadamente 150 para 40 mg L^{-1} no $R_{co\text{-}sub}$ e 92 para 13 mg L^{-1} no $R_{BSG.}$

O reator R_{GGC} foi mais impactado com essa modificação no meio. Seu pH caiu de 6.0 para 3.7 entre os dias 36 e 45 (Figura 15D). Essa queda se deve ao impacto direto do Eredox mais elevado, que inibiu a capacidade das BRS de reduzir sulfeto, levando provavelmente a um acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) e, por consequência, à diminuição do pH. Adicionalmente, em pH mais ácidos, o sulfeto torna-se mais tóxico, uma vez que o equilíbrio favorece a formação de H_2S, sendo essa molécula mais impactante ao metabolismo celular (Jung *et al.*, 2022; Oleszkiewicz, Marstaller e McCartney, 1989). A produção de sulfeto começou a diminuir em ambos os reatores, ficando por volta de 40 mg L^{-1} para o $R_{co\text{-}sub}$ e 13 mg L^{-1} para o R_{GGC}. Mesmo com a introdução da solução tampão de bicarbonato, o R_{GGC} não conseguiu restabelecer os níveis de produção de sulfeto.

O reator $R_{co\text{-}sub}$ apresentou concentrações no afluente de 311 ± 252 mg L^{-1} para a DQOt e 39 ± 15 mg L^{-1} para a DQOs. Essa redução nos níveis de DQO eram esperados, considerando que a cisteína e o extrato de levedura também são fontes significativas de DQOs (nas concentrações usadas no meio, respectivamente, 500 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1}). As concentrações no efluente para o $R_{co\text{-}sub}$ foram de 176 mg L^{-1} de DQOt e 31 mg L^{-1} de DQOs, correspondendo a eficiências de remoção de aproximadamente 43% e 21%, respectivamente.

Em comparação, o reator R_{GGC} registrou concentrações de DQOt mais baixas tanto no afluente (135 ± 57 mg L^{-1}) quanto no efluente (85 ± 40 mg L^{-1}), resultando em uma eficiência de remoção de aproximadamente 37%. As concentrações de DQOs no R_{GGC} permaneceram estáveis em 34 ± 16 e 34 ± 17 mg L^{-1} tanto na entrada quanto na saída. Valores mais elevados

de DQOs eram esperados no $R_{co\text{-}sub}$ devido à adição de lactato, é provável que o lactato ainda estivesse sendo consumido nos tanques de alimentação.

4.1.2.2 Fase IIb: reintrodução da cisteína nos valores iniciais de 500 mg L^{-1}

A Fase IIb, teve início no dia 66 e foi finalizada no dia 107, a ideia central foi verificar se a produção de sulfeto nos reatores poderia ser restaurada aos patamares observados na fase I. Contudo, a reintrodução da cisteína não foi suficiente para reestabelecer a produção de sulfeto aos níveis da primeira fase da operação. O Eredox em ambos os reatores permaneceu em valores positivos, exibindo uma oscilação irregular. É provável que, embora a cisteína conseguisse influenciar o Eredox por um breve período, a atividade fermentativa nos reatores rapidamente se sobrepunha à das bactérias redutoras de sulfato (BRS), impedindo uma queda mais expressiva no potencial.

A adição da cisteína no valor inicial levou o o $R_{co\text{-}sub}$ a apresentar uma queda considerável no valor de pH do efluente. A partir do dia 69 o pH começou a decair indo de 6.0 para 4.0 no dia 76 (Figura 15C). Assim como no R_{GGC} uma solução tampão passou a ser usada e ambos reatores começaram a operar com um novo pH de 8.0. Após essa redução no pH, o $R_{co\text{-}sub}$ passou a exibir concentrações de sulfeto mais próximas às do R_{GGC}. Esse resultado demonstra que essa queda do pH foi definitivamente impactante para a comunidade de BRS formadas no reator. Uma possível explicação para esse cenário seria um efeito de *washout* (desprendimento da biomassa do material suporte) da comunidade de BRS, o que pode estar alinhado com os resultados de DNA apresentados na seção 4.4.

A partir do dia 95, ambos os reatores apresentaram um Eredox próximo a -200 mV, no efluente. O $R_{co\text{-}sub}$ apresentou certa instabilidade nos valores de Eredox do afluente, contudo não há explicação definitiva do porquê dessa diferença entre os tanques de alimentação dos reatores. Em geral, o desempenho dos reatores demonstrou uma melhora, mas não conseguiu alcançar os mesmos níveis de produção de sulfeto observados na fase inicial. A concentração de sulfeto nos dois reatores se manteve em torno de 30 mg L^{-1} até o dia 107, momento em que os metais foram adicionados, iniciando a Fase III.

Em relação à DQO na Fase IIb, o reator $R_{co\text{-}sub}$ registrou concentrações de entrada de 445 ± 248 mg L^{-1} para a DQOt e 167 ± 86 mg L^{-1} para a DQOs. As concentrações de saída diminuíram para 148 ± 84 mg L^{-1} e 87 ± 62 mg L^{-1}, respectivamente, o que corresponde a eficiências de remoção de aproximadamente 67% para DQOt e 48% para DQOs. Comparativamente, o reator R_{GGC} apresentou concentrações de entrada de 198 ± 90 mg L^{-1} para DQOt e 101 ± 59 mg L^{-1} para DQOs, com valores de saída de 103 ± 49 mg L^{-1} e 50 ± 18 mg L^{-1}, respectivamente. Isso resultou em eficiências de remoção de cerca de 52% para DQOt e

49,5% para DQOs. Mais uma vez, a diferença de DQO entre os afluentes dos reatores está associada a DQOt, e a DQOs se mostra similar em ambos.

4.1.3 Fase III: adição de metais ao meio de cultivo (DAM sintética)

4.1.3.1 Fase IIIa: adição de 10 mg L^{-1} de cobre e zinco ao sistema

A fase IIIa durou dos dias 107 ao 114 da operação, os reatores exibiram uma resposta similar à introdução de metais, aumentando a concentração de sulfeto. No $R_{co\text{-}sub}$ a concentração atingiu 71.3 mg L^{-1} e 55.0 mg L^{-1} no R_{GGC}. A adição dos metais também provocou uma queda no Eredox, ambos reatores se estabilizaram com valores próximas de -300 mV.

Durante essa fase, o reator $R_{co\text{-}sub}$ apresentou concentrações de entrada de 686 ± 132 mg L^{-1} para a DQOt e 646 ± 256 mg L^{-1} para a DQOs. As concentrações de saída diminuíram significativamente para 120 ± 23 mg L^{-1} DQOt e 62 ± 16 mg L^{-1} DQOs, o que corresponde a eficiências de remoção de aproximadamente 83% e 87%, respectivamente. Isso demonstra uma redução eficaz tanto da matéria orgânica total quanto da solúvel nesse período. De modo semelhante, o reator R_{GGC} registrou concentrações de entrada de 446 ± 117 mg L^{-1} de DQOt e 136 mg L^{-1} de DQOs, com valores de saída caindo para 94 mg L^{-1} e 51 mg L^{-1}, respectivamente. Suas eficiências de remoção foram de aproximadamente 79% para DQOt e 85% para DQOs.

Esses resultados sugerem que a presença dos metais pode ter limitado a atividade microbiana nos tanques de entrada, resultando em maiores valores de DQO uma vez que os microrganismos não foram capazes de usar essa matéria orgânica. No entanto, o desempenho dos reatores na remoção de DQO não foi prejudicado; pelo contrário, houve um aumento na eficiência de remoção. Dessa forma é possível que os metais uma vez dentro dos reatores favoreceram rotas alternativas a sulfato redução, consumindo a DQO disponível.

4.1.3.2 Fase IIIb: adição de 50 mg L^{-1} de cobre e zinco ao sistema

O aumento da concentração de cobre e zinco para 50 mg L^{-1} no dia 114 marcou início da fase IIIb. O reator R_{GGC} teve um aumento em seus níveis de Eredox, atingindo cerca de -60.0 mV. Já no $R_{co\text{-}sub}$, o Eredox aumentou para -46.7 mV, mas em apenas dois dias, já estava novamente próximo de -300 mV. A concentração de sulfeto no R_{GGC} começou a diminuir, chegando próximo a 0 mg L^{-1} no dia 126.

Apesar de uma produção de sulfeto baixa, ambos os reatores demonstraram uma capacidade de precipitação completa dos metais ao longo das três semanas de operação (dados não apresentados). O $R_{co\text{-}sub}$ registrou concentrações de entrada de 571 ± 213 mg L^{-1} para DQOt e 590 ± 136 mg L^{-1} para DQOs, com valores de saída de 115 ± 85 mg L^{-1} e 60 ± 6 mg L^{-1}, respectivamente. Isso representa eficiências de remoção de aproximadamente 80% para DQOt e 90% para DQOs. Em comparação, o R_{GGC} apresentou concentrações de entrada de 430 ± 62

mg L^{-1} de DQOt e 399 ± 59 mg L^{-1} de DQOs, com valores de saída de 103 ± 44 mg L^{-1} e 85 ± 35 mg L^{-1}, respectivamente, resultando em eficiências de remoção de cerca de 76% para DQOt e 79% para DQOs. A remoção de DQO permaneceu relativamente alta ao longo de todo o processo em ambos os reatores, mesmo com baixa produção de sulfeto. Esses resultados sugerem que o processo não foi eficiente para a sulfetogênese, mas sim para rotas alternativas como fermentativa e metanogênica.

A investigação do impacto do cobre e zinco em sistemas redutores de sulfato já é estudada há décadas (Buglass, Huang e Chen, 1994; Utgikar *et al*., 2003). As concentrações utilizadas no presente estudo foram selecionadas para abranger valores médios e conservadores em comparação com as concentrações tóxicas e estudadas na literatura (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentrações de cobre e zinco encontradas na literatura

Referência	Cobre (mg L^{-1})	Zinco (mg L^{-1})	Substrato	Tipo de efluente	Configuração do reator	Cultura de BRS
Hao *et al*. (1994)	0–20	0–25	Lactato	Efluente sintético	Tubos de ensaio e batelada	Cultura mista
Utgikar *et al*. (2001)	2-96	2-116	Acetato	Efluente sintético	Tubos Hungate	Cultura mista
Utgikar *et al*. (2003)	6-19	6-20	Acetato	Efluente sintético	Batelada	Cultura mista
Azabou *et al*. (2007)	–	0–200	Lactato	Efluente sintético	Batelada	Cultura mista
Guo *et al*. (2017)	-	10-90	Lactato	Efluente sintético	Batelada	Cultura mista
Jin *et al*. (2017)	0.8–30	–	Lactato	Efluente sintético	Batelada	Cultura mista
Zampieri *et al*. (2021)	19–318	20–650	Lactato	Sedimentos e meio anaeróbio	Batelada	Cultura mista
Este estudo	10-50	10-50	Grão gasto de cevada e lactato	Efluente sintético	Reatores em batelada e contínuos	Cultura mista

Fonte: próprio autor

No estudo de Miranda et al. (2022), o GGC foi empregado como substrato para a aclimatação de biorreatores sulfetogênicos de forma contínua. De forma comparativa com o presente trabalho, eles obtiveram uma fase inicial de operação mais lenta, contudo uma melhor performance geral do sistema. Uma diferença determinante entre as duas pesquisas foi o TRH. O TRH usado no presente trabalho foi de 16h enquanto o artigo comparado usou 3 e 7 dias. Um TRH maior se correlaciona com melhorias na redução de sulfato e na eficiência da remoção de DQO (Alshammari, Fallah e Iranshahi, 2024; Piña-Salazar *et al.*, 2011).

4.2 Teste de atividade microbiana

O teste de atividade foi realizado duas vezes, primeiramente antes da introdução dos metais na fase III do reator e outra ao fim da operação. A Figura 17 demonstra que as condições (antes e após contato da biomassa com metais) apresentaram produção de sulfeto próximas entre si. Isso sugere que os microrganismos estavam inibidos nos reatores, mas não foram eliminados.

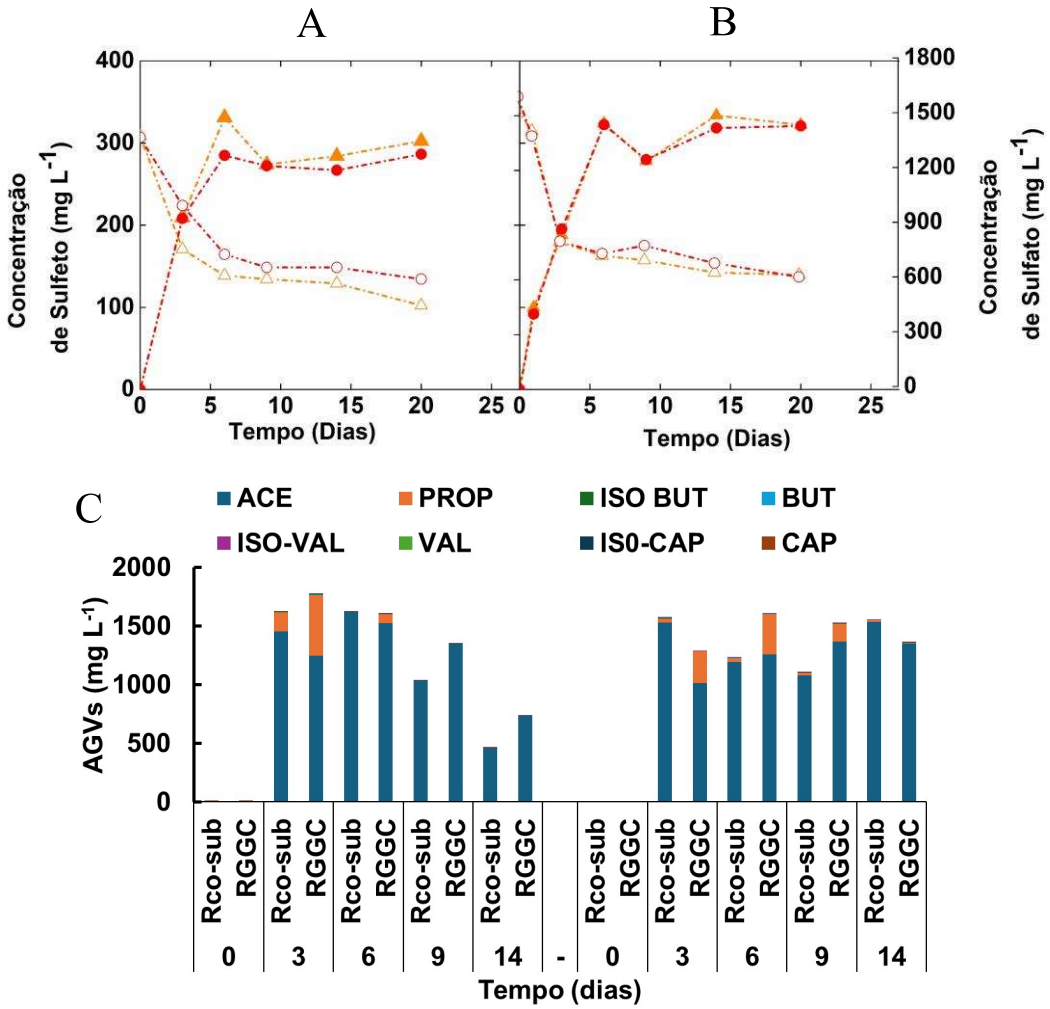


Figura 17. Perfil de sulfato, sulfeto e AGVs no teste de atividade. Teste de atividade antes do contato da biomassa com metais (A) e após o contato com metais (B). Perfil de AGVs antes do contato da biomassa com metais (esquerda) e após o contato com metais (direita) (C).
Fonte: próprio autor

O gráfico apresentado na figura 17C apresenta o perfil de AGVs produzidos no ensaio. Nota-se que as condições tiverem um acúmulo de acetato, mesmo havendo produção de sulfeto. Esse resultado juntamente com a análise de DNA realizada (seção 4.4) demonstra que os principais microrganismos sulfato redutores enriquecidos foram oxidantes incompletos.

4.3 Testes em reatores batelada

4.3.1 Teste de relação substrato/SO_4^{2-}

Das condições testadas, a que obteve a pior performance em relação a produção de sulfeto foi a condição com 35 g de substrato (GGC), apresentando elevadas concentrações de AGVs**.** Os principais ácidos orgânicos produzidos foram os ácidos butírico (1903.2 mg L^{-1}) e acético (2729.5 mg L^{-1}), conforme ilustrado na Figura 18. Esse excesso de AGVs provocou uma diminuição do pH do meio, criando um ambiente mais tóxico para as bactérias redutoras de sulfato. Em pH mais ácidos como discutido, o equilíbrio de ionização dos ácidos orgânicos é deslocado, favorecendo a formação de ácidos não dissociados e com carga neutra. Essas formas neutras têm a capacidade de penetrar as células, causando danos e comprometendo sua funcionalidade (Ghose e Wiken, 1955; Moloantoa *et al.*, 2023).

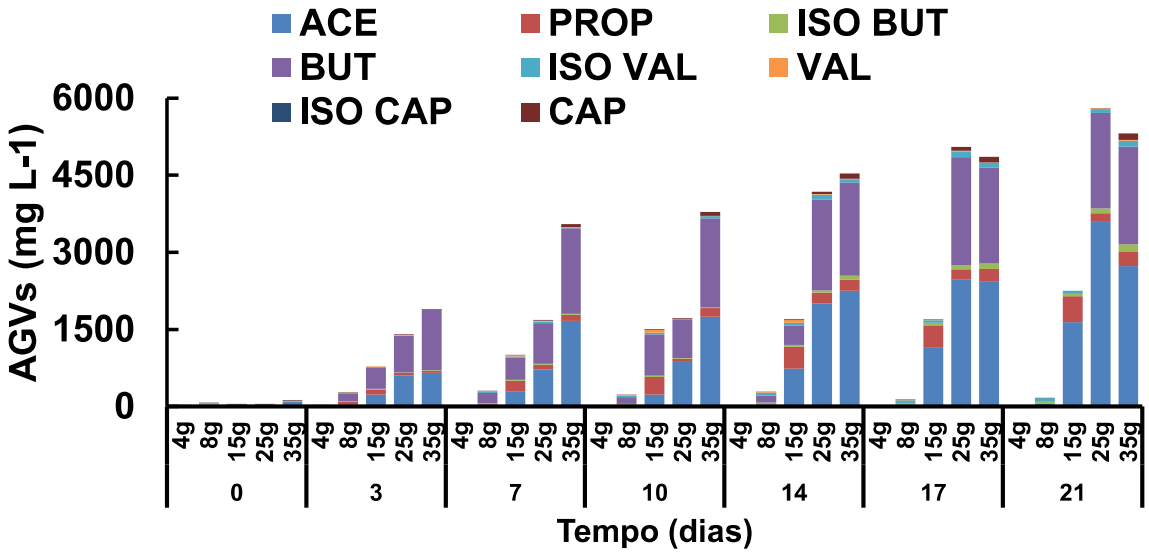


Figura 18. Produção de AGVs no ensaio relação Substrato/Sulfato nas condições com diferentes massas de GGC (4, 8, 15, 25 e 35 g de GGC).
Fonte: próprio autor.

A condição com 8 g de GGC proporcionou a melhor condição, permitindo que as BRS se desenvolvessem sem acúmulo tóxico de AGVs, resultando na maior produção de sulfeto (532.3 mg $L^{-1)}$ (19 A). A condição de 15 g de GGC alcançou concentrações de sulfeto similares às da condição de 8 g, mas sua fase inicial foi mais impactada (Figura 19A). O acúmulo inicial de AGVs provavelmente limitou a produção de sulfeto, pois o ambiente se tornou mais tóxico durante os estágios iniciais do experimento. No entanto, após duas semanas, o processo estabilizou e a produção de sulfeto aumentou, indicando que o sistema eventualmente se adaptou a concentração de substrato.

Em relação aos açúcares, as concentrações mais altas foram observadas no dia 0 (Figura 19C), devido aos açúcares residuais presentes no GGC. Os açúcares prontamente disponíveis permitiram que microrganismos fermentativos começassem a produzir AGVs logo na fase inicial dos reatores. Sem a etapa limitante da hidrólise, a fermentação pode ter ocorrido muito rapidamente para que as BRS metabolizassem os AGVs e produzissem sulfeto, particularmente nas condições de substrato mais alto (por exemplo, 25 g e 35 g de GGC). Açúcares não são um substrato direto para o crescimento de BRS e podem acelerar a queda de pH em biorreatores pela atividade de bactérias fermentativas, prejudicando assim o crescimento dos redutores de sulfato (Cao et al., 2012; Zhao et al., 2023).

Fonte: próprio autor

Os dados de DQO vão ao encontro da literatura da área, uma vez que a relação DQO/SO_4^{2-} desempenha um papel crucial na redução biológica de sulfato. Conforme evidenciado na Figura 19B, as condições experimentais que apresentaram o melhor desempenho (8 e 15 g de GGC) registraram relações DQO/SO_4^{2-} de 1.0 e 0.3, respectivamente. A literatura indica que uma relação inferior a 0.67 possibilita a utilização completa da matéria orgânica para a redução de sulfato (Lens *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2022a). Por outro lado, proporções mais elevadas podem prejudicar o desenvolvimento das BRS. Mizuno e Noike. (1994) demonstraram que, com uma relação de 2.0, as arqueias metanogênicas (AM) tornavam-se o grupo dominante no consumo de matéria orgânica. Akbari et al. (2018) obtiveram os melhores resultados em seus reatores com uma relação DQO/SO_4^{2-} de 1.34, alcançando eficiências de remoção de DQO e sulfato de 74% e 93%, respectivamente. A combinação de uma relação elevada com os efeitos tóxicos dos ácidos orgânicos nas BRS pode explicar a baixa produção de sulfeto observada para as condições de 25 e 35 gramas de substrato, onde as relações eram de aproximadamente 1.5 e 2.0, respectivamente, já no dia 3 da operação. Parvage e Herbert (2023) reportaram um aumento na redução de sulfato em condições com uma relação DQO/SO_4^{2-} superior a 12, após a adição de lactato em um reator alimentado com lascas de madeira. No entanto, é fundamental salientar que a maior parte da DQO fornecida nesse estudo (5000 mg L^{-1}) era proveniente do lactato, o que provavelmente favoreceu os microrganismos redutores de sulfato. Isso mostra a importância não apenas da seleção de um co-substrato adequado, mas também da otimização de sua concentração. No presente estudo, a DQO disponível pelo GGC nas fases iniciais derivava principalmente de açúcares, os quais são

reconhecidos por induzir acidificação de sistemas sulfato redutores (Costa, Bevilaqua e Lens, 2020; Zhao *et al*., 2023).

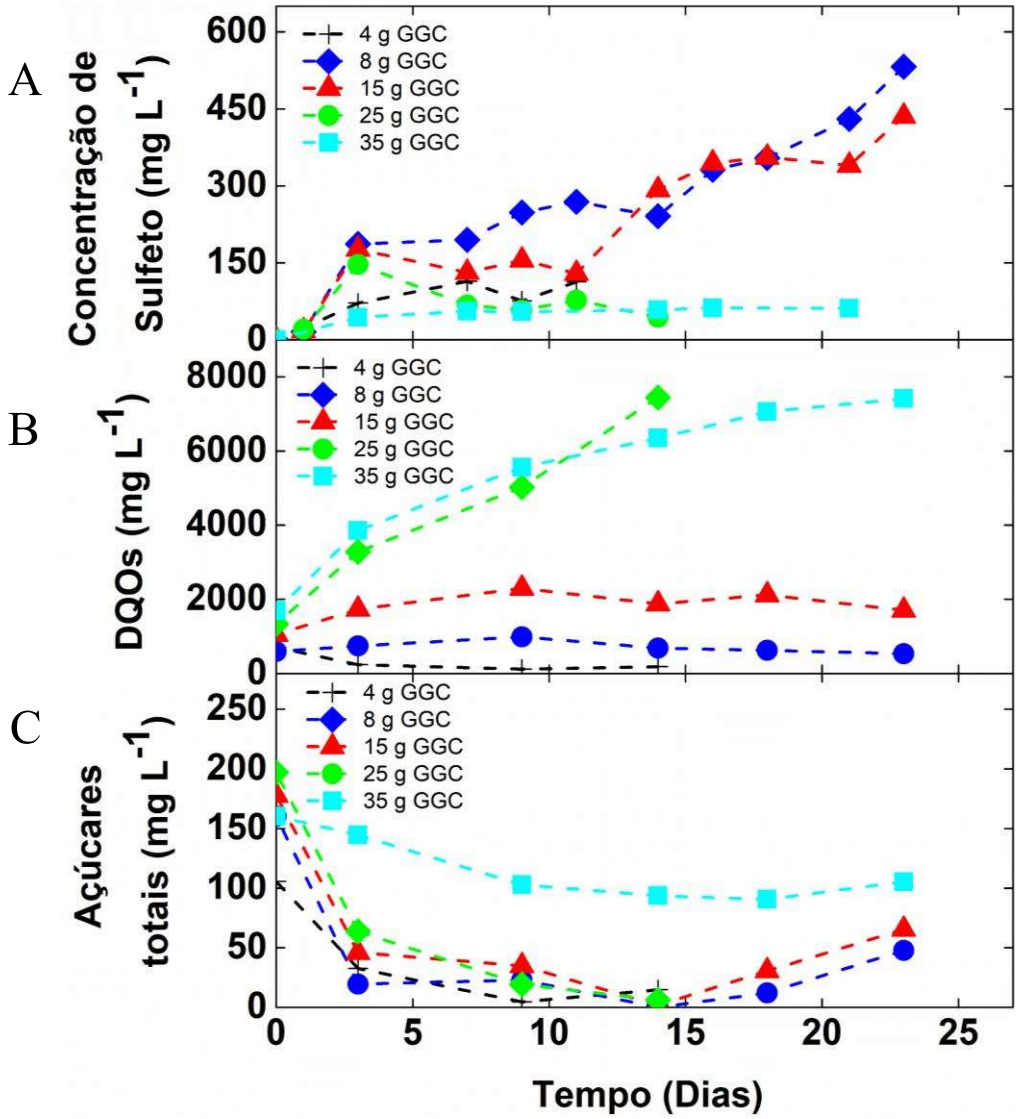


Figura 19. Perfil de sulfeto (A), DQOs (B) e açúcares totais (C), para o ensaio substrato/sulfato. Fonte: próprio autor.

Na menor massa de substrato testada (4 g), as concentrações de AGVs foram mínimas. Contudo, a produção de sulfeto também foi reduzida (aproximadamente 100 mg L-1). Esse resultado mostra que apesar de um ambiente menos tóxico, a disponibilidade de doadores de elétrons se mostrou insuficiente para sustentar uma a redução biológica de sulfato. Assim, mostra-se importante encontrar um balanço entre substrato disponível e a formação de produtos tóxicos para otimizar a eficiência do processo.

4.3.2 Teste de pré-tratamento no inóculo

O ensaio foi realizado para determinar se um tratamento prévio do lodo granular anaeróbio poderia alterar a performance dos reatores em relação a sulfato redução. A hipótese levantada era que a estrutura do granulo poderia dificultar a ação das BRS e a abertura do

granulo poderia aumentar a eficiência do lodo granular na sulfato redução. Contudo, os resultados obtidos não indicam diferenças significativas entre o lodo triturado e o não triturado (Figura 20). Não houve variações notáveis em relação à produção de sulfeto, ao perfil de ácidos graxos voláteis (AGVs), à redução de sulfato e aos níveis de DQOs.

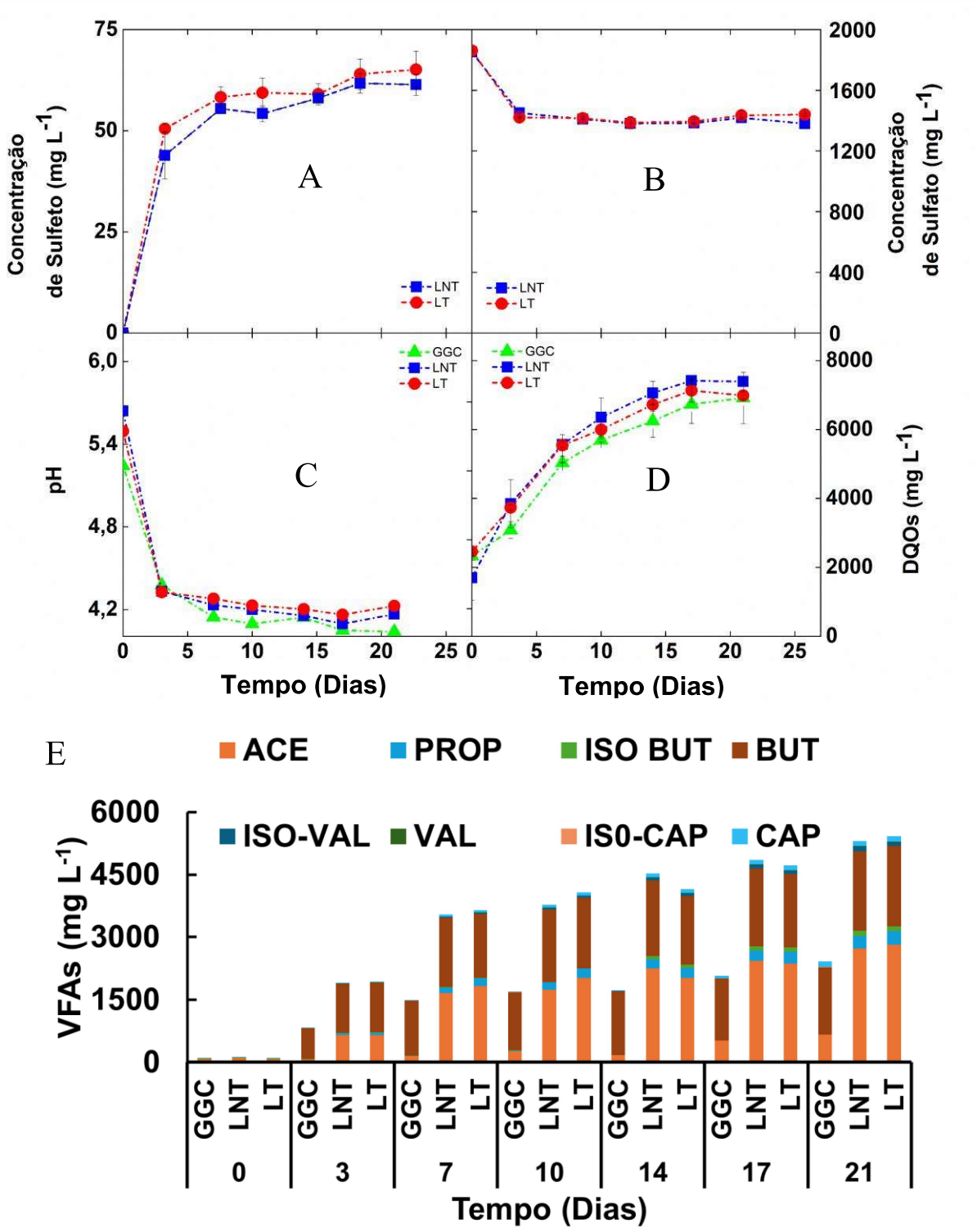


Figura 20. Análise físico-química do ensaio de pré-tratamento do inóculo. (A) Produção de sulfeto. (B) Redução de sulfato. (C) pH. (D) DQOs. (E) Perfil de AGVs. GGC (condição sem inóculo), LNT (lodo não triturado) e LT (lodo triturado).

Fonte: próprio autor

Foi observado que a condição que continha somente GGC, sem adição de inóculo, também exibiu uma produção considerável de AGVs e níveis elevados de DQOs. Esse resultado ressalta a importância dos microrganismos endógenos já presentes no substrato. No caso específico do GGC, parece que bactérias fermentativas, particularmente responsáveis pela produção de butirato, eram abundantes no material. A queda de pH que ocorreu em todas as três condições sugere que a acidificação observada nos reatores contínuos pode ter sido influenciada pelo próprio GGC. O material contribuiu para a diminuição do pH do meio. Por fim, a adição do inóculo resultou em uma maior produção de acetato, um fenômeno já discutido anteriormente em relação às BRS oxidantes incompletas. Mas pela baixa produção de sulfeto, o acetato certamente foi produzido principalmente por bactérias fermentativas presentes do lodo. Como será discutido na seção 4.4 sobre a análise de DNA, o inóculo usado apresentava alta abundância relativa de microrganismos fermentativos, o que impactou a operação dos reatores. Um enriquecimento prévio do consórcio, selecionando um número maior de BRS, poderia ter um impacto positivo na produção de sulfeto nos reatores contínuos.

4.4 Análise do DNA no inóculo inicial e na biomassa dos reatores contínuos

A análise de DNA e a discussão acerca dos resultados encontrados foi feita avaliando os gêneros encontrados nas amostras (Figura 21). As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) cuja abundância foi inferior a 1% foram postas na categoria "outros". Notou-se um aumento na abundância de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ambos reatores, com uma maior abundância no R_{GGC}. Contudo, destaca-se que a análise baseada em abundância relativa é qualitativa e deve ser considerada como forma de comparação entre os reatores, não implicando necessariamente um dado definitivo. Assim, as comparações entre os reatores não refletem contagens microbianas absolutas (Tettamanti et al., 2020).

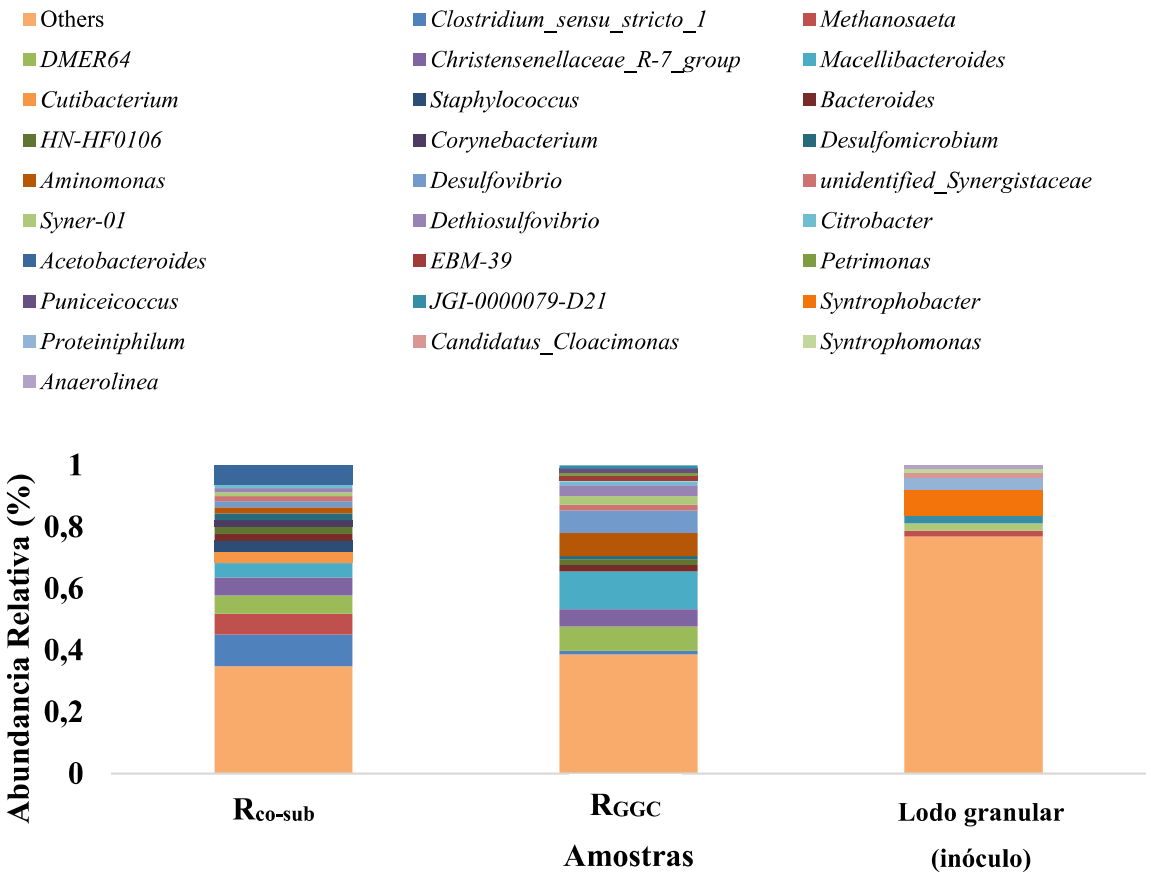


Figura 21. Abundância relativa da comunidade microbiana encontrada nos reatores e no lodo granular anaeróbio.
Fonte: próprio autor

Entre as BRS, o gênero mais abundante no lodo de inóculo foi *Desulfovibrio* (<1% de abundância relativa), que foi enriquecido em ambos os reatores para 7.2% no R_{GGC} e 1.9% no $R_{co\text{-}sub}$. O grupo mais abundante de microrganismos encontrado no lodo usado como inóculo foram bactérias fermentativas, incluindo *Proteiniphilum* (3.8%), que não utilizam açúcares ou ácidos orgânicos, mas podem fermentar piruvato, peptona e extrato de levedura em acetato e ácido propiônico (Vos De et al., 2009). *Syner-01* (2.4%) está relacionado a microrganismos oxidantes de acetato e aminoácidos (Wang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2017). *JGI-0000079-D21* (2.1%) é um microrganismo hidrolítico e acidificante também relacionado à oxidação de contaminantes em efluentes (Fan *et al.*, 2022). *Syntrophomonas* (1.2%) é responsável pela beta-oxidação de ácidos graxos, produzindo principalmente H_2 e também formato (Krieg *et al.*, 2010), e cresce melhor em relações sintróficas com microrganismos hidrogenotróficos. Adicionalmente, o gênero metanogênico *Methanosaeta* (1.8%) é uma arqueia metanogênica e acetoclástica importante que utiliza apenas acetato (Smith e Ingram-Smith, 2007).

Em uma análise inicial, foi contabilizado no lodo granular aproximadamente 9.6% de sequências afiliadas a bactérias redutoras de sulfato (BRS), em grande parte devido à presença

de *Syntrophobacter* (filo *Desulfobacterota*), que sozinho representava 8.5% da comunidade. Contudo, uma análise mais aprofundada revelou que este gênero é comumente associado a interações sintróficas com arqueias metanogênicas, agindo primariamente como um oxidante de compostos orgânicos e não como um redutor de sulfato ativo (Li, D. *et al.*, 2023; Rincón-Tomás *et al.*, 2024). Consequentemente, dado seu papel ecológico, possui menor eficiência na redução de sulfato comparado a *Desulfovibrio spp.*, por uma provável adaptação evolutiva a ambientes com sulfato ou sulfito limitados (Imachi *et al.*, 2006; Muyzer e Stams, 2008; Plugge *et al.*, 2011). Portanto, optou-se por não incluir *Syntrophobacter* na contagem efetiva de BRS. Embora possa possuir genes para redução de sulfato, estes são provavelmente inativos no inóculo anaeróbio utilizado.

No reator R_{GGC}, a abundância relativa de BRS aumentou para 13.9%, destacando-se os gêneros *Desulfovibrio* (7.2%) e *Dethiosulfovibrio* (3.5%) como os mais abundantes. De forma similar ao inóculo inicial, uma variedade de microrganismos fermentativos também estava presente em alta abundância relativa. Entre eles, *Macellibacteroides* (12.3%) capaz de fermentar diversos açúcares, como glicose, lactose e galactose, produzindo ácidos graxos voláteis (Rout *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2023). Em sequência o gênero *DMER64* (7.9%), bactéria sintrófica que auxilia metanogênicos na oxidação de AGVs, podendo utilizar butirato para gerar acetato e H_2 (Lee *et al.*, 2019; Meng *et al.*, 2022). O gênero *Aminomonas* (7.5%) foi identificado, responsável pela fermentação de aminoácidos, variando seus produtos finais entre acetato e propionato (Baena *et al.*, 1999).

De maneira inesperada, a abundância de BRS no reator $R_{co\text{-}sub}$ foi inferior (6.8%) à do R_{GGC}, com *Desulfomicrobium* (2.1%) e *Desulfovibrio* (1.9%) sendo as BRS dominantes. Microrganismos fermentativos foram os principais genes encontrados no reator, sendo *Clostridium sensu stricto 1* (10.2%) o gênero mais abundante. Este demonstra grande versatilidade, englobando microrganismos que variam de psicrofílicos a termofílicos e que podem metabolizar diversos tipos de substratos, incluindo açúcares e proteínas. Possuem também capacidade hidrolítica, metabolizando moléculas complexas como celulose e amido (Li et al., 2023; Popoff, 2015). Outros gêneros fermentativos foram *DMER64* (5.9%) e *Christensenellaceae R-7* (5.8%). Este último atua na degradação de carboidratos, aminoácidos e ácidos carboxílicos, além de poder consumir alguns AGVs, produzindo principalmente acetato e butirato (Chen *et al.*, 2020; Morotomi, Nagai e Watanabe, 2011).

A presença de bactérias fermentativas é, em geral, vista como benéfica em biorreatores sulfetogênicos, pois elas podem estabelecer relações sintróficas com as BRS, fornecendo substratos essenciais como os AGVs (Costa *et al.*, 2021). Além disso, como discutido no

capítulo I, a diversidade microbiana pode auxiliar na mitigação do impacto dos metais pesados nos reatores. Por outro lado, o acúmulo de produtos de fermentação pode ser inibitório para as BRS. Como demonstrado na seção 4.3.1, o GGC continha açúcares residuais disponíveis, o que provavelmente impulsionou a fermentação inicial.

Sato et al (2022) realizaram uma comparação entre a aclimatação em modo contínuo e a aclimatação regular (batelada) em biorreatores sulfetogênicos alimentados com casca e farelo de arroz. Seus resultados indicaram que a aclimatação em modo contínuo resultava em uma comunidade microbiana com maior abundância de BRS. É possível que a aclimatação regular selecione um consórcio menos resistente, dificultando sua sobrevivência sob condições estressantes. Assim, após a sequência de mudanças nos reatores, como flutuações de Eredox e pH, e a adição de metais, a comunidade microbiana previamente enriquecida na fase inicial pode ter sofrido *washout*, sido inibida ou entrado em estado de dormência.

Por fim, o gênero *Methanosaeta*, também presente no inóculo, foi enriquecido no reator $R_{co\text{-}sub}$, aumentando sua abundância para 6.7%. Esse fato sugere que o *design* do sistema e as condições operacionais podem não ter sido otimizados para o crescimento das BRS. Tipicamente, BRS e metanogênicos competem pelos mesmos substratos, e com uma relação DQO/SO_4^{2-} otimizada, as BRS podem superar as AM. Provavelmente houve um desbalanço nessa relação no reator $R_{co\text{-}sub}$. O'Reilly e Colleran. (2006) demonstraram que BRS não conseguiram superar MA na competição por acetato, mesmo com uma relação DQO/SO_4^{2-} de 2.0. Dado que o acetato foi o principal produto formado nos testes em batelada, isso possivelmente explica a presença das arqueias metanogênicas no reator.

4.5 Análise por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada para duas finalidades: verificar a presença de microrganismos aderidos no material suporte e analisar a composição dos precipitados localizados na parte inferior dos reatores. As imagens obtidas revelaram microrganismos fixados ao material de suporte Figura 22. Adicionalmente, a análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) identificou os elementos presentes em uma partícula com aspecto de cristal (precipitado metálico), encontrada próxima da comunidade microbiana aderida.

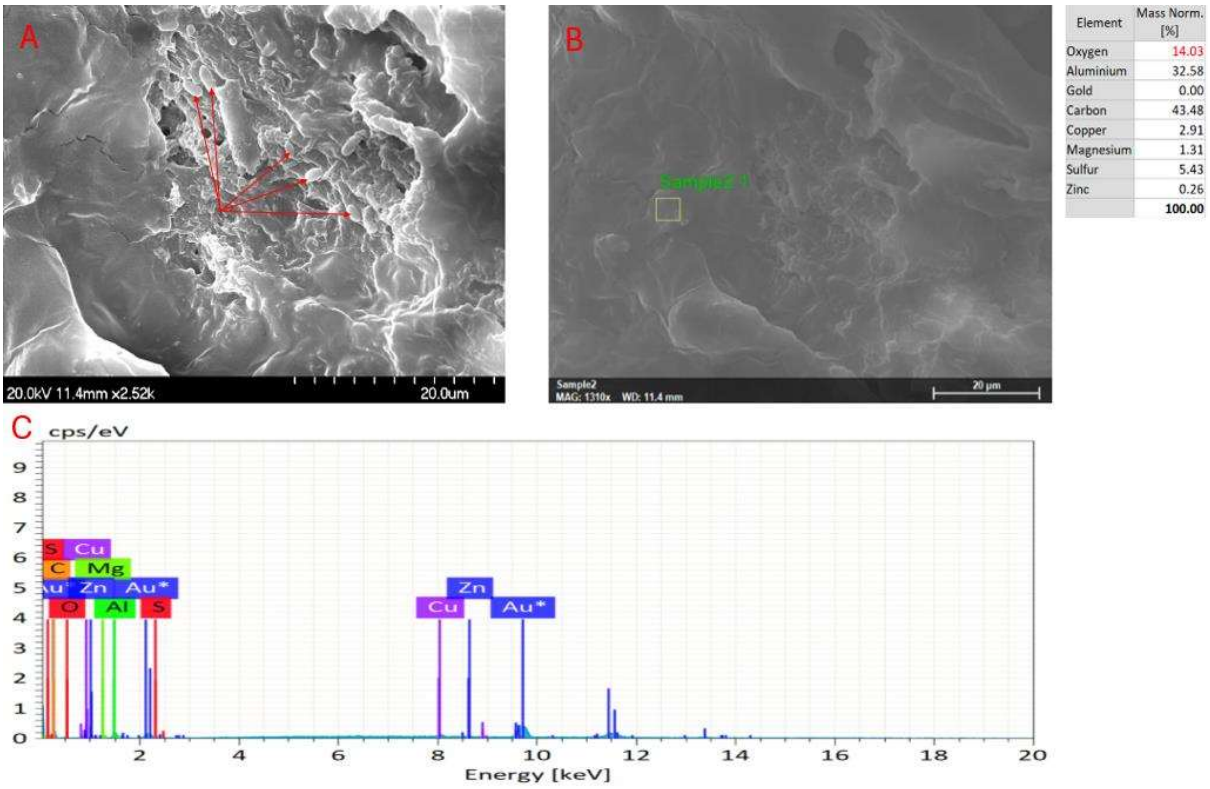


Figura 22. Imagens de MEV e análise EDX do material de suporte do reator Rco-sub ao final da operação. A, Comunidade microbiana no material de suporte (GGC), com as setas indicando algumas das bactérias aderidas. B, Partícula com aspecto cristalino próxima à comunidade microbiana aderida. C, EDX da partícula encontrada

Fonte: próprio autor

Curiosamente, o metal mais abundante identificado na partícula cristalina foi o alumínio. Além disso, outras análises EDX realizadas revelaram a presença de titânio (Apêndice A – Figura A3). Embora esses resultados não devam ser interpretados de forma quantitativa, eles são valiosos por demonstrarem a variedade e a heterogeneidade do sistema. Também foi possível constatar a presença de cobre e zinco (metais adicionados ao sistema) e enxofre (associado ao sulfeto).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o uso do lactato como co-substrato pode bioestimular o crescimento da comunidade microbiana nas fases iniciais dos reatores sulfetogênicos. Entretanto, a escolha do substrato e a concentração a ser usada devem ser otimizados para evitar que sejam favorecidas rotas metabólicas que competem com a sulfetogênese. Os metais adicionados (cobre e zinco) levaram a inibição dos microrganismos sulfato redutores, demostrando que o consórcio sulfetogênico selecionado não estava apto ao tratamento de DAM. Os materiais ligenocelulósicos se mostram como substratos promissores e sustentáveis para a

redução biológica de sulfato, porém sua composição e biodegradabilidade deve ser avaliada para cada aplicação.

As análises da comunidade microbiana por rRNA 16S resultaram em respostas importantes para entender as interações metabólicas que ocorrem nos reatores: embora alguns trabalhos evidenciem a importância das bactérias fermentativas nos reatores sulfetogênicos, é importante que essa relação seja balanceada para que não ocorra a inibição das BRS por conta do excesso de produtos da fermentação. Os resultados sugerem que um desbalanço favorecendo rotas fermentativas tem um efeito limitante na sulfato redução. Isso reforça a necessidade de se controlar a disponibilidade dos substratos e as condições operacionais que suportem o crescimento principalmente das BRS quando material lignocelulósico são usados como doadores de elétrons de lenta liberação em reatores sulfetogênicos.

REFERÊNCIAS

AKBARI, A.; SADANI, M.; AMIN, M. M.; TEIMOURI, F.; KHAJEH, M.; MAHDAVI, M.; HADI, M. Managing sulfate ions produced by sulfate radical-advanced oxidation process using sulfate-reducing bacteria for the subsequent biological treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 5, p. 5929–5937, 2018.

ALSHAMMARI, B. M.; FALLAH, N.; IRANSHAHI, D. Evaluation of pilot scale moving bed biofilm reactor and stripping process for sulfate reduction from real high-sulfate waste activated sludge: Effect of HRT and return sludge. **Journal of Water Process Engineering**, v. 66, 2024.

BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B.; LABAT, M.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C. *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, n. 3, p. 975-982, 1999.

CAO, J.; ZHANG, G.; MAO, Z. S.; LI, Y.; FANG, Z.; YANG, C. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. **International Journal of Mineral Processing**, v. 106–109, p. 58–64, 20, 2012.

CHEN, R.; LI, Z.; FENG, J.; ZHAO, L.; YU, J. Effects of digestate recirculation ratios on biogas production and methane yield of continuous dry anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 316, p. 123963, 2020.

COSTA, R. B.; BEVILAQUA, D.; LENS, P. N. L. Pre-treatment and temperature effects on the use of slow-release electron donor for biological sulfate reduction. **Journal of Environmental Management**, v. 275, p. 111216, 2020.

COSTA, R. B.; GODOI, L. A. G.; BRAGA, A. F. M.; DELFORNO, T. P.; BEVILAQUA, D. Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors: Influence of electron donors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123622, 2021.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FAN, Q.; FAN, X.; FU, P.; SUN, Y.; LI, Y.; LONG, S.; GUO, T.; ZHENG, L.; YANG, K.; HUA, D. Microbial community evolution, interaction, and functional genes prediction during anaerobic digestion in the presence of refractory organics. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, 2022.

GHOSE, T. K.; WIKEN, T. Inhibition of Bacterial Sulphate-Reduction in Presence of Short Chaiu Fatty Acids. **Physiologia Plantarum**, v. 8, n. 1, 1955.

GÖBBELS, L; POEHLEIN, A; DUMNITCH, A; EGELKAMP, R; KRÖGER, C; HAERDTER, J; SCHOELMERICH, M. C. Cysteine: an overlooked energy and carbon source. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

HARMAN, L. S.; MOTTLEY, C.; MASON, R. P. Free radical metabolites of L-cysteine oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5606–5611, 1984.

IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; LOY, A.; QIU, Y. L.; HUGENHOLTZ, P.; KIMURA, N.; WAGNER, M.; OHASHI, A.; HARADA, H. Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with Desulfotomaculum cluster I are widely distributed in methanogenic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2080–2091, 2006.

KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; BROWN, D. R.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; WARD, N. L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. Springer, 2010. v. 4

KUMAR, M.; SINHAROY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Process integration for biological sulfate reduction in a carbon monoxide fed packed bed reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 219, p. 294–303, 2018.

LEE, J.; KOO, T.; YULISA, A.; HWANG, S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition. **Journal of Environmental Management**, v. 241, p. 418–426, 2019.

LENS, P. N. L.; VISSER, A.; JANSSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41-88, 1998.

LI, C. J.; ZHANG, Z.; ZHAN, P. C.; LV, A. P.; LI, P. P.; LIU, L.; LI, W. J.; YANG, L. L.; ZHI, X. Y. Comparative genomic analysis and proposal of *Clostridium yunnanense sp*. nov., *Clostridium rhizosphaerae sp*. nov., and *Clostridium paridis* sp. nov., three novel Clostridium sensu stricto endophytes with diverse capabilities of acetic acid and ethanol production. **Anaerobe**, v. 79, p. 102686, 2023.

LI, D.; MENG, X.; SUN, Y.; LI, X.; LIU, X.; XIE, Z.; CAO, Q. The microbial and functional reconstruction of instable syntrophic propionate-oxidizing methanogenesis by system recovering and injection modes changing. **Chemical Engineering Journal**, v. 455, p. 140736 2023.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction**.** **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452-463, 2007.

MENG, X.; CAO, Q.; SUN, Y.; HUANG, S.; LIU, X.; LI, D. 16S rRNA genes- and metagenome-based confirmation of syntrophic butyrate-oxidizing methanogenesis enriched in high butyrate loading. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126483, 2022.

MILLS, S.; TREGO, A. C.; WARD, J.; CASTILLA-ARCHILLA, J.; HERTEL, J.; THIELE, I.; LENS, P. N. L.; IJAZ, U. Z.; COLLINS, G. Methanogenic granule growth and development is a continual process characterized by distinct morphological features. **Journal of Environmental Management**, v. 286, p. 112229, 2021.

MIRANDA, E. M.; SEVERSON, C.; REEP, J. K.; HOOD, D.; HANSEN, S.; SANTISTEBAN, L.; HAMDAN, N.; DELGADO, A. G. Continuous-mode acclimation and operation of lignocellulosic sulfate-reducing bioreactors for enhanced metal immobilization from acidic mining-influenced water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 425, p. 128054, 2022.

MIZUNO, L. Y. Y. O.; NOIKE, T. Effects of sulfate concentration and sludge retention time on the interaction between methane production and sulfate reduction for butyrate. **Water Science and Technology**, v. 30, p. 45–54, 1994.

MOLOANTOA, K.; KHETSHA, Z.; MOCHANE, M.; UNUOFIN, J.; ATANGANA, A.; CASON, E.; HEERDEN, E. VAN; CASTILLO, J. Evaluating the effects of pH and temperature on sulphate-reducing bacteria and modelling of their effects in stirred bioreactors. **Environmental Pollutants and Bioavailability**, v. 35, n. 1, 2023.

MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; WATANABE, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 144–149, 2011.

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

NAGPAL, S.; CHUICHULCHERM, S.; LIVINGSTON, A.; PEEVA, L. Ethanol Utilization by Sulfate-Reducing Bacteria: An Experimental and Modeling Study**. Biotechnol Bioeng**, v. 70, n. 5, p. 533-543, 2000.

NECULITA, C. M.; ZAGURY, G. J. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, n. 2–3, p. 358–366, 2008.

NEVATALO, L. M.; MÄKINEN, A. E.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Biological hydrogen sulfide production in an ethanol-lactate fed fluidized-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 276–284, 2010.

O'FLAHERTY, V.; MAHONY, T.; RONAN O'KENNEDY, COLLERAN, E. Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 555-569, 1998.

O'REILLY, C.; COLLERAN, E. Effect of influent COD/SO_4^{2-} ratios on mesophilic anaerobic reactor biomass populations: Physico-chemical and microbiological properties. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 1, p. 141–153, 2006.

PARVAGE, M. M.; HERBERT, R. Sequential removal of nitrate and sulfate in woodchip and hematite - coated biochar bioreactor. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 9, n. 2, p. 489–499, 2023.

PIÑA-SALAZAR, E. Z.; CERVANTES, F. J.; MERAZ, M.; CELIS, L. B. Biofilm development during the start-up of a sulfate-reducing down-flow fluidized bed reactor at different COD/SO_4^{2-} ratios and HRT. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 4, p. 910–916, 2011.

PLUGGE, C. M.; ZHANG, W.; SCHOLTEN, J. C. M.; STAMS, A. J. M. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 81, 2011.

POPOFF, M. From saprophytic to toxigenic clostridia, a complex evolution based on multiple diverse genetic transfers and/or rearrangements. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 4, p. 221–224, 2015.

REYES-ALVARADO, L. C.; CAMARILLO-GAMBOA, Á.; RUSTRIAN, E.; RENE, E. R.; ESPOSITO, G.; LENS, P. N. L.; HOUBRON, E. Lignocellulosic biowastes as carrier material and slow-release electron donor for sulphidogenesis of wastewater in an inverse fluidized bed bioreactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5115–5128, 2018.

RINCÓN-TOMÁS, B; LANZÉN, A; SÁNCHEZ, P; ESTUPIÑÁN, M; SANZ-SÁEZ, I; BILBAO, M. E; ALONSO-SÁEZ, L. Revisiting the mercury cycle in marine sediments: A potential multifaceted role for *Desulfobacterota*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 465, 2024.

ROUT, S. P.; SALAH, Z. B.; CHARLES, C. J.; HUMPHREYS, P. N. Whole-genome sequence of the anaerobic isosaccharinic acid degrading isolate, *Macellibacteroides fermentans* Strain HH-ZS. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 8, p. 2140–2144, 2017.

SATO, Y.; HAMAI, T.; HORI, T.; AOYAGI, T.; INABA, T.; HAYASHI, K.; KOBAYASHI, M.; SAKATA, T.; HABE, H. Optimal start-up conditions for the efficient treatment of acid mine drainage using sulfate-reducing bioreactors based on physicochemical and microbiome analyses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, p. 127089, 2022.

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

TETTAMANTI BOSHIER, F. A.; SRINIVASAN, S.; LOPEZ, A.; HOFFMAN, N. G.; PROLL, S.; FREDRICKS, D. N.; SCHIFFER, J. T. Complementing 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing with Total Bacterial Load To Infer Absolute Species Concentrations in the Vaginal Microbiome. **mSystems**, v. 5, n. 2, 2020.

VILLA-GOMEZ, D. K.; PAPIRIO, S.; HULLEBUSCH, E. D. VAN; FARGES, F.; NIKITENKO, S.; KRAMER, H.; LENS, P. N. L. Influence of sulfide concentration and macronutrients on the characteristics of metal precipitates relevant to metal recovery in bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 26–34, 2012.

VOS, P. DE; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Springer, 2009. v. 3

WANG, D. H.; LIAN, S. J.; WANG, R. N.; ZOU, H.; GUO, R. B.; FU, S. F. Enhanced anaerobic digestion of food waste by metal cations and mechanisms analysis. **Renewable Energy**, v. 218, p. 119386, 2023.

WANG, J. J.; XU, L. Z. J.; HUANG, B. C.; LI, J.; JIN, R. C. Multiple electron acceptor-mediated sulfur autotrophic denitrification: Nitrogen source competition, long-term performance and microbial community evolution. **Bioresource Technology**, v. 329, p. 124918, 2021.

WAYBRANT, K. R.; PTACEK, C. J.; BLOWES, D. W. Treatment of mine drainage using permeable reactive barriers: Column experiments. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1349–1356, 2002.

YORK, S. W.; INGRAIN, L. O. Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* ko11 using crude yeast autolysate as a nutrient supplement. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 6, p. 683-688, 1996.

ZAREI, O.; DASTMALCHI, S.; HAMZEH-MIVEHROUD, M. A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from Saccharomyces cerevisiae Suitable for Preparing Bacterial Culture Media**. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR,** v. 15, n. 4, p. 907, 2016.

ZHANG, ZHAO; ZHANG, C.; YANG, Y.; ZHANG, ZHUOWEI; TANG, Y.; SU, P.; LIN, Z. A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment**. Journal of Cleaner Production,** v. 376, p. 134109, 2022.

ZHAO, C.; CHEN, N.; LIU, T.; FENG, C. Effects of adding different carbon sources on the microbial behavior of sulfate-reducing bacteria in sulfate-containing wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 392, p. 136332, 2023.

ZHAO, Z.; LI, Y.; QUAN, X.; ZHANG, Y. Towards engineering application: Potential mechanism for enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with different types of conductive materials. **Water Research**, v. 115, p. 266–277, 2017.

APÊNDICE A

Tabela A1 – Matrix Plackett-Burman usada para o BCA com o resultado da produção máxima de sulfeto

Matriz PB	Ferro	Cobre	Zinco	Niquel	Cobalto	Produção Máxima de Sulfeto
1	0	20	0	0	0	692,13
2	100	0	20	0	0	422,93
3	100	20	0	20	0	163,35
4	0	20	20	0	20	162,54
5	100	0	20	20	0	121,79
6	100	20	0	20	20	331,22
7	100	20	20	0	20	121,79
8	0	20	20	20	0	185,14
9	0	0	20	20	20	423,84
10	0	0	0	20	20	496,55
11	100	0	0	0	20	348,19
12	0	0	0	0	0	703,14
PC1	50	10	10	10	10	502,49
PC2	50	10	10	10	10	476,19
PC3	50	10	10	10	10	191,19

Fonte: próprio autor



Figura A1. Bagaço de cana de açúcar após moagem no moinho de lâminas.
Fonte: próprio autor

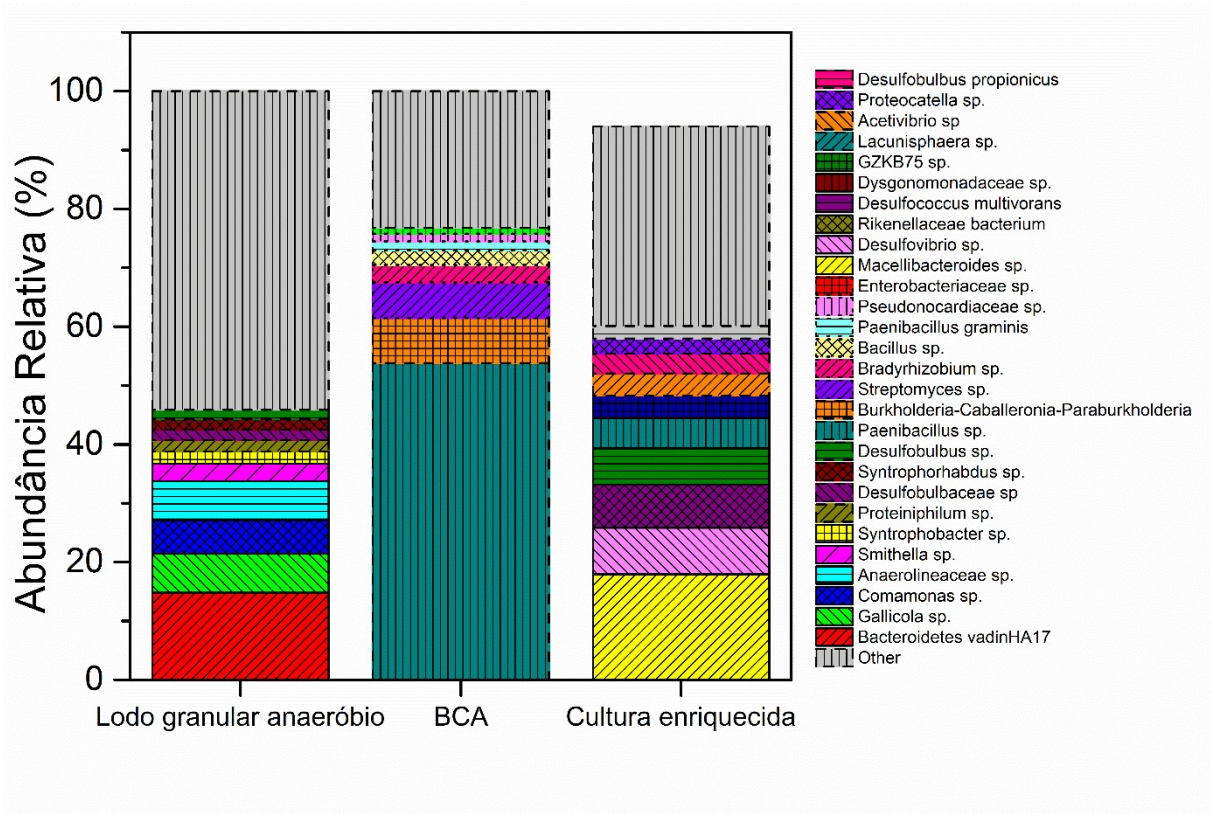


Figura A2. Análise genômica do lodo granular usado como inóculo, do BCA e da cultura enriquecida em 2021.
Fonte: próprio autor



Element	Mass Norm. [%]
Carbon	35.45
Gold	0.00
Calcium	20.06
Oxygen	28.13
Aluminium	0.00
Copper	6.80
Zinc	1.88
Titanium	3.88
Iron	2.30
Sulfur	1.49
	100.00

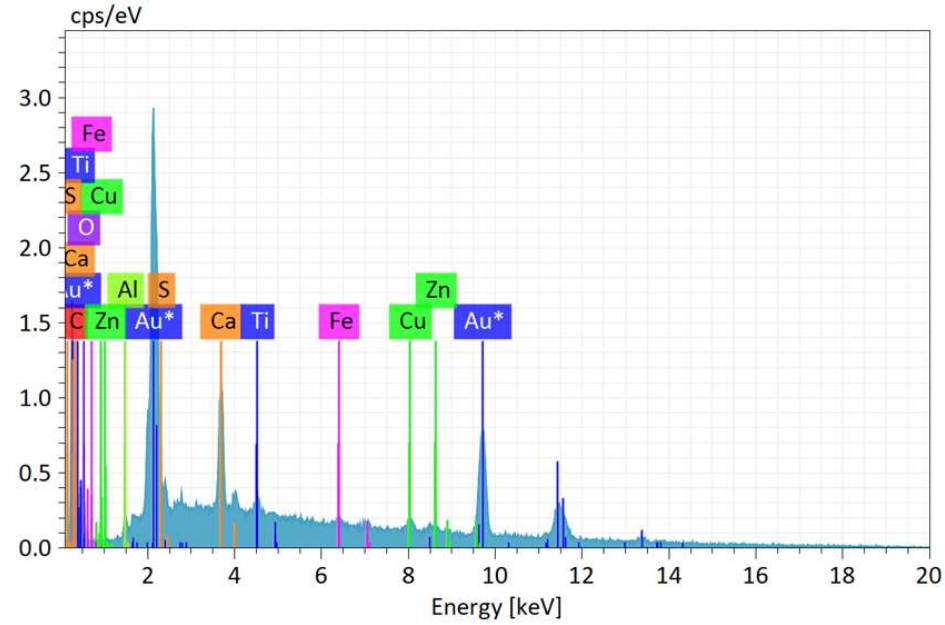


Figura A3. EDX de uma partícula com aspecto cristalino encontrada no material suporte do $R_{co\text{-}sub}$ evidenciando a presença de titânio e ferro na amostra.
Fonte: próprio autor.