

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

RAUL NATALE JÚNIOR

**Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por
materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos**

ARARAQUARA
2022

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
Instituto de Química
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica

RAUL NATALE JÚNIOR

Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^{fa}. Assoc^a. Denise Bevilaqua

Araraquara
2022

N271a

Natale Júnior, Raul

Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos / Raul Natale Júnior. -- Araraquara, 2022

62 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Denise Bevilaqua

1. Bactérias anaeróbicas. 2. Sulfetos. 3. Digestão de águas residuais. 4. Desenvolvimento sustentável. 5. Minas e recursos minerais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos"

AUTOR: RAUL NATALE JUNIOR

ORIENTADORA: DENISE BEVILAQUA

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



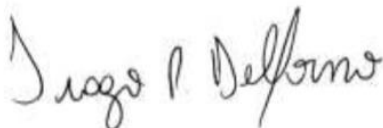
Prof^a. Dr^a. DENISE BEVILAQUA (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Dr. LEANDRO AUGUSTO GOUVÊA DE GODOI (Participação Virtual)

Departamento de Tratamento Biológico de Águas Residuárias / Escola de Engenharia de São Carlos - USP - São Carlos



Dr. TIAGO PALLADINO DELFORNO (Participação Virtual)

Instituto SENAI de Inovação em Biotecnologia - SENAI - São Paulo

Araraquara, 29 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES

Raul Natale Júnior

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 14/11/1987

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Jaú – SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

2011-2019 Bacharelado em Química.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP,
Instituto de Química, Campus de Araraquara.

Trabalho de Conclusão de Curso: Biotecnologia Industrial e Ambiental -
Avaliação do processo de biolixiviação da calcopirita em meio anaeróbio.

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a. Denise Bevilaqua.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

LUZ, ANGÉLICA RAMOS DA; FILHO, ELIAS DE SOUZA MONTERIRO; **JUNIOR, RAUL NATALE**; RUIZ, MIGUEL; FARIA, JOÃO BOSCO; MÜNCHEN, SINARA; ADAIME, MARTHA B.; PERAZOLLI, LEINIG ANTONIO. Cachaça: Um produto Histórica e Quimicamente Brasileiro. **Latin American Journal of Development**, Curitiba, v. 3, p. 14-24, 2021. DOI: 10.46814/lajdv3n1-002.

LUZ, ANGÉLICA RAMOS DA; FILHO, ELIAS DE SOUZA MONTERIRO; **JUNIOR, RAUL NATALE**; RUIZ, MIGUEL; FARIA, JOÃO BOSCO; MÜNCHEN, SINARA; ADAIME, MARTHA B.; PERAZOLLI, LEINIG ANTONIO. Paraty a Estrada Real: A Química do Envelhecimento da Cachaça. **Latin American Journal of Development**, Curitiba, v. 3, p. 25-36, 2021. DOI: 10.46814/lajdv3n1-003.

LIVROS E CAPÍTULO DE LIVROS

JÚNIOR, RAUL NATALE; LUZ, ANGÉLICA RAMOS DA; FILHO, ELIAS DE SOUZA MONTEIRO; BEGO, AMADEU MOURA; FARIA, JOÃO BOSCO; MÜNCHEN, SINARA; ADAIME, MARTHA BOHRER; PERAZOLLI, LEINIG ANTONIO. **A História e a Química da Cachaça**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2021. v. 1. 49 p. DOI: 10.22533/at.ed.905211504.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

NATALE JUNIOR, R.; PRINCE, N. C. L.; ZAGHETE, M. A.; PERAZOLLI, L. Structural changes caused by storage of cachaça in oak barrels. 2012.

NATALE JUNIOR, R.; PERAZOLLI, L.A.; MÜNCHEN, S.; ADAIME, M.B. Paraty e a Estrada Real: A Química do Envelhecimento da Cachaça. 2014.**PARTICIPAÇÃO EM**

EVENTOS

1. **41ª Semana da Química (UNESP – Instituto de Química, Araraquara – SP), 2011.**
2. **IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – SP), 2012.**
3. **XI Encontro da Cadeia Produtiva da Cachaça (UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – SP), 2016.**
4. **V Congresso Farmacêutico da UNESP (UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – SP) , 2015.**
5. **XII EVEQ (UNESP – Instituto de Química, Araraquara – SP), 2014. Paraty e a Estrada Real: A Química do Envelhecimento da Cachaça.**

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

1. **XI Encontro da Cadeia Produtiva da Cachaça (UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – SP), 2012.**
2. **III Circuito de Degustação da Cachaça (UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – SP), 2012.**

ATIVIDADES COMPLEMENTARES

1. **Treinamento Técnico no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Qualidade da Cachaça. Supervisão: Prof. João Bosco Faria, 2014.**

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a minha família, em especial a minha esposa Melany Isabel Garcia Natale, por todo o amor e apoio que recebo diariamente.

Também agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa do laboratório de Biohidrometalurgia, em especial a minha orientadora, professora Assoc^a. Denise Bevilaqua e a professora Dr^a Rachel Biancalana Costa pelo suporte, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por todos os conselhos, a paciência e ajuda em meu amadurecimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos professores Leandro Augusto Gouvêa de Godoi e Tiago Palladino Delforno pela colaboração na banca como avaliadores deste trabalho, ao último em especial por todo o auxílio no tratamento dos dados de biologia molecular para identificação do consórcio de microrganismos.

A todos os meus professores do Instituto de Química da UNESP por tudo que me ensinaram, em especial a Prof^a. Dr^a Kelly Johanna Dussán Medina pelas medidas de CLAE realizadas. Também agradeço ao Prof. Dr. Michel Brienzo, do Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Rio Claro) pela caracterização do material lignocelulósico.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte de minha formação pessoal e profissional.

Por último, agradeço ao Instituto de Química – UNESP – Araraquara pela infraestrutura oferecida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Mas, se não praticarmos esses hábitos rigorosos de pensar, não podemos ter a esperança de solucionar os problemas verdadeiramente sérios com que nos defrontamos – e nos arriscamos a nos tornar uma nação de patetas, um mundo de patetas, prontos para sermos passados para trás pelo primeiro charlatão que cruzar o nosso caminho.”

- Carl Sagan

Resumo

NATALE JR, RAUL. “**Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos**” 2022. 56 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2022.

Drenagens ácidas de minas representam um sério problema ambiental. Uma estratégia promissora em seu tratamento é a associação da redução biológica de sulfato com a precipitação química de sulfetos metálicos. Esse processo depende das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), que exigem um doador de elétrons para converter SO_4^{2-} a S^{2-} em seu processo respiratório. O S^{2-} precipita os íons metálicos, que são removidos da solução por sedimentação. O uso de doadores de elétrons de lenta liberação (DELL), permite melhor sedimentação de partículas de sulfetos metálicos. No entanto, aspectos fundamentais deste processo não estão esclarecidos. Este trabalho utilizou resíduos de grão de cevada (RGC) como DELL para investigar os mecanismos desse processo. Foi feito enriquecimento de consórcio em reatores em batelada utilizando lodo de avícola como inóculo inicial. O consórcio enriquecido apresentou abundância relativa de 46,96% de unidades taxonômicas operacionais (UTO) afiliadas a bactérias fermentativas, como 25,68% de *Macellibacteroides sp.* e 21,28% de *Enterococcus sp.* As BRS representaram 32,76% da abundância relativa no consórcio enriquecido, destacando-se as UTOs pertencentes aos gêneros *Desulfomicrobium sp.* (9,09%) e *Desulfohabdus sp.* (7,64%). O ensaio de identificação dos doadores de elétrons comparou reatores sulfetogênicos com condição controle na ausência de SO_4^{2-} . Nessa última, verificou-se variedade de ácidos orgânicos, como propiônico e butírico, além de etanol. O ensaio de potencial do doador de elétrons acompanhou a redução de SO_4^{2-} até o exaurimento do DELL em reatores com massas iniciais de 1g, 2g e 5g de RGC. A maior proporção de RGC em relação ao SO_4^{2-} levou a um maior direcionamento do fluxo de elétrons para fermentação, levando a acidificação dos reatores. Esta, por sua vez, deslocou a concentração de H_2S para a fase gasosa. O ensaio de toxicidade comparou reatores concentrações iniciais crescentes de sulfeto (0, 250, 500 e 700 mg $\text{S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$) A alta concentração inicial não inibiu a atividade dos reatores, mas aumentou o período de fase lag em até 10 dias.

Palavras-chave: Bactérias Anaeróbicas. Sulfetos. Digestão de águas residuais. Desenvolvimento sustentável. Minas e recursos minerais.

Abstract

NATALE JR, RAUL. “**Avaliação dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons por materiais lignocelulósicos no processo de biorredução de sulfatos**” 2022. 56 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2022.

Acid mine drainage represents a serious environmental problem. A promising strategy in the treatment of this type of waste is the association of biological sulfate reduction with the chemical precipitation of metallic sulfides. This process relies on Sulfate Reducing Bacteria (SRB), which perform sulfidogenesis from sulfate and an electron donor. The use of Slow Release Electron Donors (SRED) allows better precipitation of metal sulfide particles. However, fundamental aspects of this process are not yet clarified. This work used barley grain residues (BSG) as an electron donor to investigate the mechanisms of this process. For this, the consortium enrichment was carried out in batch reactors using poultry sludge as initial inoculum. Fermentative bacteria corresponded to the highest observed relative abundance (46.96%), and the most abundant operational taxonomic units (OTUs) were affiliated with the genera *Macellibacteroides* sp. (25.68%) and *Enterococcus* sp. (21.28%). SRB corresponded to 32.76% of relative abundance, among which *Desulfomicrobium* sp. (9.09%) and *Desulfohabdus* sp. (7.64%) stand out. The electron donor identification assay compared substances produced in sulfidogenic reactors with a SO_4^{2-} -free control. In the latter, a higher variety of volatile fatty acids, such as propionic and butyric acid, and ethanol were observed. The electron donor potential assay followed the reduction of SO_4^{2-} until the DELL depletion in reactors with 1g, 2g and 5g of BSG. In the higher proportion of BSG in relation to SO_4^{2-} , electron flux was directed towards fermentation, leading to lower sulfate reduction and further acidification. As a result, the H_2S concentration shifted mainly to the gas phase. The toxicity test compared reactors with increasing initial S^{2-} concentrations (0, 250, 500 and 750 $\text{mg S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$). The highest initial concentration did not inhibit the activity of the reactors but increased the lag phase period by up to 10 days.

Keywords: Anaerobic bacteria. Sulphides. Sewage sludge digestion. Sustainable development. Mines and mineral resources.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Imagem do Rio Tinto (Espanha), tradicionalmente conhecido pela coloração avermelhada devido ao processo natural de contaminação das águas por DAM	5
Figura 2: Diagrama de fases das espécies de sulfeto em fase líquida em função do pH do meio (Lewis, 2010)	7
Figura 3: Estrutura do monômero que compõe as cadeias de celulose e hemicelulose	8
Figura 4: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de enriquecimento	12
Figura 5: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de identificação do doador de elétrons	14
Figura 6: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de potencial do doador de elétrons	15
Figura 7: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de toxicidade do acúmulo de sulfeto	16
Figura 8: Gráficos da concentração de sulfato e sulfeto no ensaio de enriquecimento do consórcio	20
Figura 9: Gráfico das principais espécies encontradas no lodo, BSG e no consórcio enriquecido	21
Figura 10: Gráfico dos principais ácidos voláteis encontrados no decorrer do ensaio de identificação do doador de elétrons	23
Figura 11: Gráfico da concentração de sulfato e sulfeto no decorrer do ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons	26
Figura 12: Gráfico dos principais ácidos voláteis encontrados no decorrer do ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons	27
Figura 13: Gráfico dos principais ácidos voláteis encontrados no decorrer do segundo ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons	29
Figura 14: Gráfico da concentração de sulfato e sulfeto no decorrer do segundo ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons	29
Figura 15: Gráfico dos principais gases encontrados no headspace de cada condição dos reatores	31

Figura 16: Gráficos dos monitoramentos de S^{2-} , SO_4^{2-} do ensaio de proporção do SO_4^{2-}	33
Figura 17: Gráfico das concentrações de sulfato e sulfeto dos reatores em cada uma das condições.....	34
Figura 18: Gráfico das concentrações de AGV dos reatores em cada uma das condições.....	37
Figura 19: Gráfico de pH do ensaio de identificador de elétrons.....	19
Figura 20: Gráfico de pH do primeiro ensaio de potencial do doador de elétrons.....	20
Figura 21: Gráfico de pH do segundo ensaio de potencial do doador de elétrons....	21
Figura 22: Gráfico de pH do ensaio de proporção do doador de elétrons	22
Figura 23: Gráfico de pH do ensaio de toxicidade do acúmulo de sulfeto	23

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do meio basal anaeróbio (STAMS et al., 1993)	12
Tabela 2: Comparativo dos principais parâmetros de redução de sulfato e produção de sulfeto entre a primeira e a sétima gerações	19
Tabela 3: Comparativo do consumo dos RGC no ensaio de identificação do doador de elétrons	24
Tabela 4: Comparativo dos principais parâmetros de redução de sulfato e produção de sulfeto entre as três diferentes condições de reatores	28
Tabela 5: Análise das variações de sulfato e sulfeto durante o ensaio de influência da toxicidade do sulfeto.....	34

Lista de Abreviaturas e Siglas

DAM	Drenagens Ácidas de Minas
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
DELL	Doador de Elétrons de Lenta Liberação
RGC	Resíduos de Grãos de Cevada
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxirribonucleico
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
pH	Potencial Hidrogeniônico
CG	Cromatografia Gasosa
UTO	Unidades Taxonômicas Operacionais

Sumário

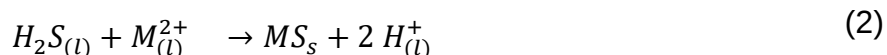
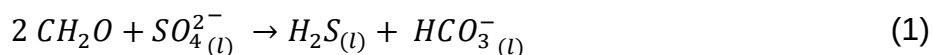
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Drenagens ácidas de minas (DAM)	4
2.2 Redução Biológica de Sulfato	5
2.3 Precipitação de Sulfetos Metálicos	6
2.4 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Doadores de elétrons	7
2.5 Materiais lignocelulósicos e doadores de elétrons de lenta liberação (DELL)	8
3. Objetivos	10
4. Materiais e Métodos	11
4.1 Coleta dos resíduos de grãos de cevada e lodo anaeróbio	11
4.2 Enriquecimento do consórcio	11
4.3 Identificação do doador de elétrons	14
4.4 Potencial de liberação do doador de elétrons	15
4.5 Avaliação de toxicidade do sulfeto	16
4.6 Métodos analíticos	16
5. Resultados e Discussão.....	19
5.1 Enriquecimento do consórcio	19
5.2 Identificação do doador de elétrons	23
5.3 Potencial de liberação do doador de elétrons	26
5.5 Ensaio de influência da proporção entre sulfato e resíduos de grãos de cevada.....	32
5.6 Avaliação de toxicidade do acúmulo de sulfeto	33
6. Conclusão.....	38

Referências Bibliográficas.....	38
Apêndice	19

1. Introdução

As Drenagens Ácidas de Minas (DAM) são lixiviados formados a partir da oxidação de minerais sulfetados em contato com a água. A concentração dos compostos presentes em uma DAM pode variar, mas estas sempre são caracterizadas pela presença de ácido sulfúrico e íons metálicos, como cádmio, cobre, níquel, ferro, chumbo e zinco (GODOI, 2018, COSTA, 2020). As DAM podem contaminar o solo, rios e lençóis subterrâneos, o que leva a sérios prejuízos ambientais (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

Uma estratégia bastante promissora no tratamento de DAM e com custo relativamente baixo é a associação da redução biológica de sulfato com a precipitação química de sulfetos metálicos. A redução de sulfato leva à produção de sulfetos (Eq. 1) que, por sua vez, podem ser precipitados como sulfetos metálicos (MS na Eq. 2)(GODOI, 2018).



A redução de sulfato é realizada pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), cujo metabolismo exige uma fonte doadora de elétrons, que pode ser hidrogênio ou um composto orgânico, representado na Eq. 1 como CH_2O (GODOI, 2018; KAKSONEN; PUHAKKA, 2007). No caso de ser utilizado um composto orgânico, a redução biológica de sulfato leva a uma produção de alcalinidade na forma de bicarbonato (Eq. 1), o que contribui para neutralização da DAM. O sulfeto gerado, por sua vez, precipita com os íons metálicos dissolvidos (Eq.2). Assim, essa estratégia de tratamento permite a mitigação dos principais impactos ambientais relativos a este despejo de efluentes ácidos. Quando comparada aos resultados obtidos através de técnicas tradicionais de precipitação de hidróxidos, a precipitação de sulfetos metálicos apresenta um melhor rendimento na remoção de metais e resíduos de

tratamento mais simples, além da possibilidade da recuperação de metais com alto valor comercial (COSTA et al., 2021).

Diversos doadores de elétrons já foram testados para redução biológica de sulfato, tais como o lactato, etanol, glicerol, entre outros (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). No entanto, o uso de compostos puros elevam significativamente o custo da operação, o que tem levado à busca por doadores de elétrons de baixo custo. Nesse contexto, o uso de resíduos orgânicos líquidos como vinhaça de cana de açúcar, ou sólidos advindos da indústria agrícola tem sido propostos como doadores de elétrons de baixo custo (REYES-ALVARADO et al., 2018; WAYBRANT; BLOWES; PTACEK, 1998), uma vez que além da diminuição de custos com doador de elétrons, existem evidências de que o uso destes compostos mais complexos promove comunidade microbiana mais robusta (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; WAYBRANT; BLOWES; PTACEK, 1998).

Além da questão relacionada a neutralização e remoção do sulfato, o sistema de tratamento de DAMs também se ocupa da precipitação química dos sulfetos metálicos, de forma a otimizar sua recuperação. Nesse sentido, a velocidade de formação de sulfetos metálicos tem sido apontada como um aspecto importante. A qualidade do precipitado obtido depende muito da forma pela qual o processo é realizado. Uma adição rápida ou muito concentrada de sulfeto ao sistema pode levar a um excesso de nucleação (LEWIS; VAN HILLE, 2006). Isso implica a formação de muitos cristais com baixo crescimento, o que dificulta o processo de sedimentação e recuperação destes metais, já que uma parte significativa dos mesmos permanecem suspensos em solução (VILLA-GOMEZ et al., 2011). Portanto é de grande interesse que o sulfeto seja gerado em baixas concentrações, para que o processo de crescimento dos cristais seja favorecido (VILLA-GOMEZ et al., 2011).

Um dos fatores mais significativos que afeta tanto a velocidade quanto a a concentração de sulfeto gerado no sistema é a biodisponibilidade do doador de elétrons fornecido para o consórcio de BRS. O uso de doadores de elétrons prontamente disponíveis leva a uma rápida produção de sulfeto, enquanto um doador de elétrons com liberação mais lenta tende a uma produção controlada, característica que é desejada para a obtenção de grânulos mais adequados para a recuperação de metais (REYES-ALVARADO et al., 2018).

O uso de materiais lignocelulósicos atende aos critérios de lenta liberação de doadores de elétrons para as BRS, levando a produção mais controlada de sulfeto e a formação de partículas sedimentáveis de sulfetos metálicos (REYES-ALVARADO et al., 2018; COSTA et al., 2020). Materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, além de menores quantidades de resinas, terpenos, taninos e pigmentos. Acresce que materiais lignocelulósicos estão frequentemente disponíveis como resíduo em setores industriais e com custos inferiores aos de compostos orgânicos puros (MUSSATTO et al., 2013).

Dentre uma gama de materiais lignocelulósicos aplicados como doadores de elétrons no processo de redução de sulfato, o uso dos resíduos de cevada maltada proveniente da indústria cervejeira se mostrou viável (COSTA; BEVILAQUA; LENS, 2020). Porém, esses estudos avaliaram parâmetros de processo, como as taxas de redução de sulfato, e a comparação de materiais lignocelulósicos de composição distinta. Aspectos fundamentais do processo, como subprodutos da hidrólise, e toxicidade do sulfeto ou de íons metálicos à hidrólise não foram abordados, embora esses aspectos sejam importantes para viabilizar futura aplicação.

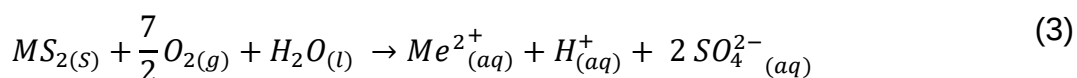
Diante disto, este trabalho teve como objetivo investigar aspectos fundamentais dos mecanismos de lenta geração de doadores de elétrons no processo de produção de sulfeto biogênico, como quais substâncias atuam como doadores de elétrons e o papel dos principais microrganismos do consórcio dentro deste processo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Drenagens ácidas de minas (DAM)

Um dos problemas ambientais mais característicos gerados pelas minas subterrâneas ou abertas, seja de ocorrência natural ou devido a atividade humana, é a formação das chamadas drenagens ácidas de minas (DAM). Esse resíduo é formado através do contato da água e oxigênio com minerais sulfetados, como a pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2), Galena (PbS), entre outros.

Ao entrar em contato com o oxigênio e a água, os sulfetos sofrem um processo de oxidação, o que leva a solubilização de íons metálicos e a produção de ácido sulfúrico (H_2SO_4), conforme a seguinte equação:



A presença de microrganismos acidófilos, como a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* ou *Acidithiobacillus thiooxidans* em condições adequadas de temperatura ($\cong 30^\circ\text{C}$) e pH ácido pode estimular e acelerar o processo de oxidação dos minerais e formação das DAMs, através da oxidação dos íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}) e do enxofre elementar (S_0) a íons sulfato (SO_4^{2-}) (GARCIA JR; BEVILAQUA, 2008).

Devido a essa combinação entre um pH ácido e o acúmulo de diversos metais pesados solubilizados, as DAMs possuem um grande potencial para causar impactos adversos no meio ambiente, seja através da contaminação de solos ou de águas fluviais e subterrâneas. Uma vez que estes microrganismos podem continuar a se multiplicar e estimular processos oxidativos, estes problemas ambientais podem prosseguir indefinidamente e alcançar locais distantes de sua origem, mesmo após o encerramento da atividade mineradora no local.



Figura 1: Imagem do Rio Tinto (Espanha), tradicionalmente conhecido pela coloração avermelhada devido ao processo natural de contaminação das águas por DAM

2.2 Redução Biológica de Sulfato

Ao se pensar em possibilidades de tratamento para um resíduo ácido como as DAMs, a primeira possibilidade a ser cogitada é um dos métodos mais utilizados para tal é a neutralização química através de agentes alcalinizantes, tais como o hidróxido de sódio (NaOH). Além de solucionar o problema relativo à acidez do poluente, este processo também remove os íons de metais pesados através da precipitação de hidróxidos metálicos.

Apesar de parecer uma alternativa bastante interessante, é preciso levar em conta que a referida técnica traz consigo uma série de problemas que limitam o seu emprego. O emprego de hidróxidos como reagentes alcalinizantes em larga escala eleva significativamente o custo de operação, além de gerar como resíduo o precipitado gelatinoso de hidróxidos metálicos, um resíduo caracterizado por ser volumoso e de difícil manuseio e tratamento (KAKSONEN; PUHAKKA, 2007).

Uma técnica bastante promissora que pode atuar na solução desses problemas é o emprego de microrganismos capazes de realizar a redução biológica de sulfato em conjunto com a precipitação de sulfetos metálicos, as chamadas bactérias redutoras de sulfato (BRS) (COSTA et al., 2021; COSTA; BEVILAQUA; LENS, 2020). Ao entrar em contato com o SO_4^{2-} presente em abundância nas DAMs, estas bactérias utilizam o hidrogênio e ou matéria orgânica como fonte de energia em processos oxidativos que utilizam o referido ânion como aceptor final de elétrons, o que dá origem ao bicarbonato (HCO_3^-) capaz de neutralizar o resíduo e ao sulfeto de hidrogênio (H_2S), capaz de remover os íons metálicos contaminantes através do processo de precipitação (GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2017) .

2.3 Precipitação de Sulfetos Metálicos

Ao realizar o processo de redução do sulfato, um dos principais produtos gerados pelas BRS é o sulfeto de hidrogênio (H_2S), caracterizado por ser um gás corrosivo e tóxico em maiores concentrações e pelo peculiar odor desagradável de ovos em decomposição. Ao se dissociar em meio aquoso, dá origem ao ácido sulfídrico de mesma fórmula molecular. O equilíbrio das formas de sulfeto que permanecerão na fase líquida possui uma relação direta com o pH do meio no qual estas se encontram (Figura 2) (LEWIS, 2010).

Ao reagir com os cátions metálicos presentes na DAM, o produto obtido é um precipitado de sulfetos metálicos com características mais interessantes do que os hidróxidos metálicos obtidos através do tratamento de alcalinização química. Entre essas principais características estão uma maior remoção dos contaminantes devido ao fato dos sulfetos metálicos geralmente serem menos solúveis do que os hidróxidos, um menor volume de lodo produzido e a obtenção de cristais com melhores características de sedimentação e recuperação (KIRAN; PAKSHIRAJAN; DAS, 2017).

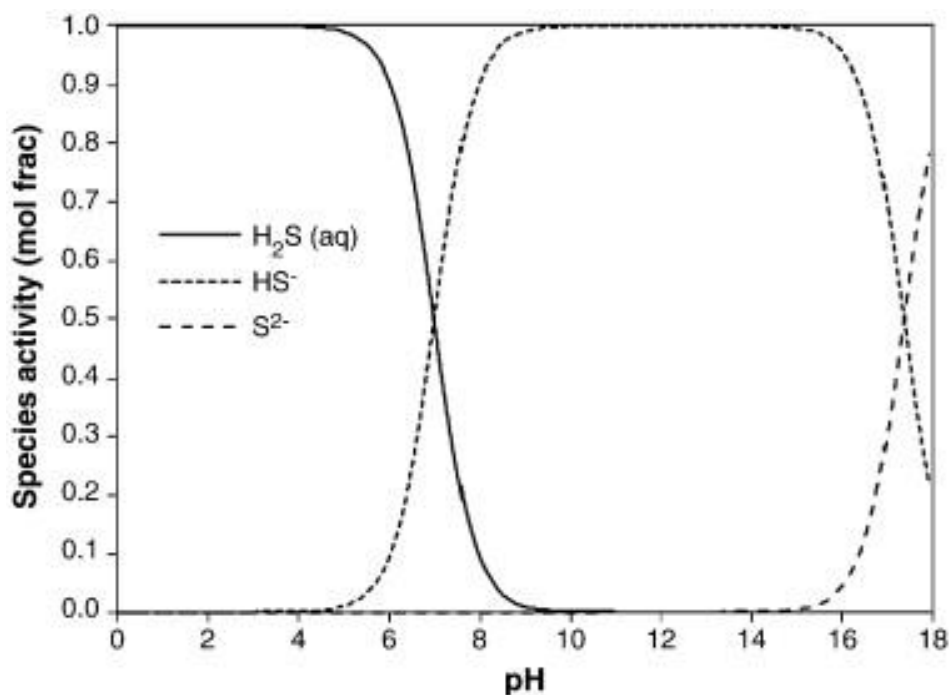


Figura 2: Diagrama de fases das espécies de sulfeto em fase líquida em função do pH do meio (Lewis, 2010)

2.4 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Doadores de elétrons

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo heterogêneo de bactérias capazes de utilizar o ânion sulfato (SO_4^{2-}) ou outros compostos de enxofre (S_0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, entre outros) (FINSTER, 2008) como um agente oxidante em suas atividades metabólicas, causando sua redução a sulfeto de hidrogênio (H_2S) neste processo. Como exemplos de BRS, é possível citar microrganismos do gênero *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter* e *Desulfobulbus* (RABUS et al., 2015).

Para que a redução do sulfato possa ocorrer, é necessário que as BRS tenham acesso a substâncias que atuem como doadores de elétrons nesse processo, tais como o H_2 ou compostos orgânicos como o propionato, lactato, butirato e etanol (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Uma vez que a composição das DAMs costuma possuir uma ausência quase completa destes compostos, o uso de BRS no tratamento de drenagens acaba por requerer a adição destas substâncias, o que acarreta a elevação do custo operacional.

Uma forma de tentar resolver essa questão de uma maneira economicamente mais interessante é o emprego de resíduos orgânicos como doadores de elétrons (REYES-ALVARADO et al., 2017). Além de reduzir os custos operacionais, o emprego

deste tipo de material agrega princípios de sustentabilidade ambiental e economia circular (COSTA et al., 2021) e pode trazer como benefício a disponibilização de carbono em formas mais diversificadas, o que potencializa uma maior velocidade no processo de redução de sulfato quando comparado ao uso de uma única forma de doador (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007).

2.5 Materiais lignocelulósicos e doadores de elétrons de lenta liberação (DELL)

Além de resíduos líquidos, como a vinhaça de cana-de açúcar, também é possível utilizar resíduos de materiais lignocelulósicos e similares, tais como o bagaço de cana-de açúcar, resíduos de cevada provenientes da produção cervejeira (RGC) (COSTA; BEVILAQUA; LENS, 2020), e resíduos de celulose da indústria de papel (REYES-ALVARADO et al., 2017).

O material lignocelulósico possui estrutura complexa composta, em grande parte, por lignina, celulose e hemicelulose que formam as paredes celulares vegetais. Enquanto a celulose é caracterizada por ser um polímero de grande peso molecular e longas cadeias lineares de β -D-glucose (Figura 3), a hemicelulose possui cadeias mais curtas e ramificadas do mesmo material. Já a lignina é caracterizada por sua estrutura amorfa, composta principalmente por unidades de fenil-propano (JAWAID; TAHIR; SABA, 2017).

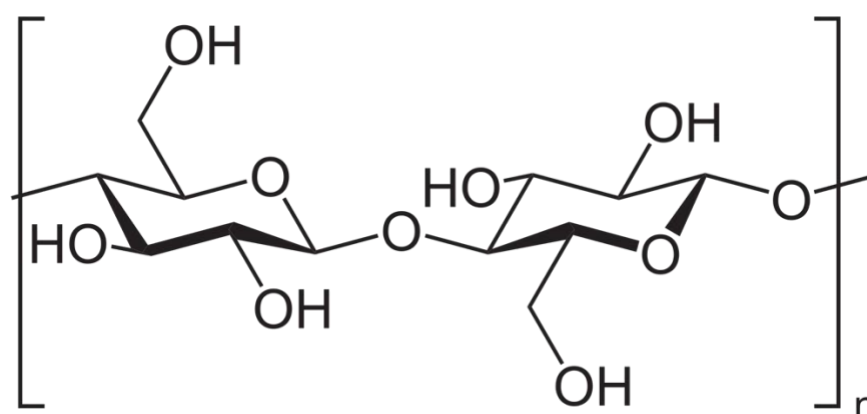


Figura 3: Estrutura do monômero que compõe as cadeias de celulose e hemicelulose

Devido a essa estrutura complexa, os materiais lignocelulósicos podem ser classificados como doadores de elétrons de lenta liberação (DELL). Neste tipo de material, as cadeias de celulose e hemicelulose são submetidas a um processo

hidrolítico de decomposição em seus monômeros, que por sua vez podem atuar diretamente como doadores de elétrons para as BRS ou servirem de substrato para microrganismos que produziram esses doadores através de processos fermentativos.

Além de oferecer um menor custo em relação a doadores de elétrons adquiridos comercialmente, como o metanol, etanol e lactato, dos DELL trazem como principal vantagem um processo mais lento e gradual de formação do sulfeto, o que pode ajudar na formação de partículas de sulfetos metálicos maiores e de melhor sedimentação em relação ao uso de doadores de elétrons prontamente disponíveis (VILLA-GOMEZ et al., 2012). Esta é uma característica muito interessante para facilitar o tratamento das DAM, uma vez que a sedimentação adequada evita a necessidade da filtração para remoção de partículas muito finas que permanecem em suspensão e também aumenta a quantidade de metais recuperados neste processo (REYES-ALVARADO et al., 2017).

3. Objetivos

Os objetivos deste trabalho de pesquisa são:

- 1) Selecionar um consórcio de bactérias sulfetogênicas e hidrolíticas através do enriquecimento da cultura presente no lodo inicial;
- 2) Identificar quais substâncias presentes no material lignocelulósico são responsáveis pela doação de elétrons no processo de redução do sulfato;
- 3) Quantificar a relação entre a quantidade de sulfato reduzido e a perda de massa dos grãos de cevada;
- 4) Avaliar a influência da proporção de SO_4^{2-} e de material lignocelulósico no comportamento dos reatores observados e dos metabólitos produzido;
- 5) Avaliar a influência do acúmulo de sulfeto nos processos metabólicos das BRS e bactérias hidrolíticas presentes no consórcio.

4. Materiais e Métodos

4.1 Coleta dos resíduos de grãos de cevada e lodo anaeróbio

Os resíduos de grãos de cevada (RGC) foram obtidos a partir de uma produção de cerveja stout da cervejaria “Kirchen” localizada em São Carlos - SP. O lodo anaeróbio foi obtido de um reator UASB de um matadouro de aves em Pereiras - SP.

4.2 Enriquecimento do consórcio

Este experimento foi realizado com o objetivo de selecionar, a partir do lodo anaeróbio inicial, uma comunidade microbiana de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que pode utilizar o RGC como doador de elétrons de lenta liberação (DELL). Foram realizados ensaios em batelada, nos quais foram monitoradas a atividade de redução do sulfato, a produção de sulfeto e a variação do pH. As análises de monitoramento foram realizadas duas vezes por semana. A cada vez que se constatou o esgotamento do sulfato e a estabilidade da concentração de sulfeto, uma nova geração foi iniciada, utilizando 10% (v / v) da geração anterior como inóculo.

Frascos de borosilicato (250 mL) foram utilizados como reatores em batelada, preenchidos com 150 mL de meio anaeróbio basal estéril (STAMS et al., 1993), cuja composição é descrita na Tabela 1, 2,0 g de RGC e uma concentração inicial de 1500 mg L⁻¹ de SO₄²⁻, fornecida como sulfato de sódio. O meio foi esterilizado antes da inoculação. Uma massa de 1,25 g de lodo anaeróbio foi usada como inóculo no lote inicial. O lodo foi lavado com solução tampão fosfato e submetido a centrifugação de 6000 rpm por dez minutos, tendo sido o sobrenadante descartado. Esse protocolo foi repetido três vezes, para remoção de matéria orgânica solúvel que poderia atuar como doador de elétrons (COSTA; BEVILAQUA; LENS, 2020). Nas gerações seguintes, 15 mL do meio de cultura do reator anterior foi utilizado como inóculo. Cloridrato de cisteína foi adicionado como agente redutor para garantir condições anaeróbias, e o frasco foi submetido ao fluxo de argônio por 5 minutos para remoção do oxigênio. Todas as gerações foram realizadas em triplicata e mantidas em temperatura de 30°C,

agitadas a 150 rpm em agitador orbital (New Brunswick Scientific, modelo C25KC Incubator Shaker).

Composição do meio anaeróbio basal (por litro)			
KH ₂ PO ₄	408 mg	HCl	1,80 mg
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	534 mg	H ₃ BO ₃	0,06 mg
NH ₄ Cl	300 mg	MnCl ₂	0,06 mg
NaCl	300 mg	FeCl ₂	0,94 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	100 mg	CoCl ₂	0,06 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	110 mg	NiCl ₂	0,01 mg
NaHCO ₃	4 g	ZnCl ₂	0,07mg
Cisteína	0,5 g	CuCl ₂	0,01 mg
Resazurina	0,5 mg	NaOH	0,40 mg
Biotina	0,02 mg	Na ₂ SeO ₃	0,02 mg
Nicotinamida	0,20 mg	Na ₂ WO ₄	0,03 mg
Ácido p-aminobenzóico	0,10 mg	Na ₂ MoO ₄	0,02 mg
Tiamina (Vit. B1)	0,20 mg	Cianocobalamina (Vit. B12)	0,10 mg
Ácido Pantotenico	0,10 mg	Riboflavina	0,10 mg
Piridoxamina	0,50 mg	pH	7,0

Tabela 1: Composição do meio basal anaeróbio (STAMS et al., 1993)

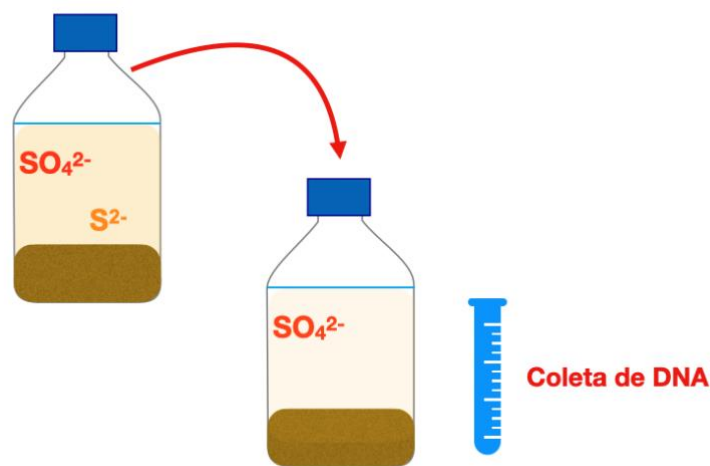


Figura 4: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de enriquecimento

A caracterização da comunidade microbiana foi feita através das seguintes etapas:

Sequenciamento do gene 16S ribossomal.

A região hipervariável V5/V6 do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os primers 799F (5' AACMGGATTAGATACCCCKG-3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1185mR (5'-GAYTTGACGTCATCCM-3') (HODKINSON; LUTZONI, 2009), com modificações inseridas nas bases para reduzir a amplificação de DNA plastidial e mitocondrial. Após a purificação do produto de PCR com o kit *AMPure XP Beads* (Beckman Coulter, Life Sciences) foi realizada a ligação dos adaptadores Illumina em uma reação de PCR (index Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) e Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)). Posteriormente, o produto dessa reação foi purificado e quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop* para normalização equimolar da concentração. Um pool é montado e quantificado por qPCR para validação e determinação da concentração final (nM) utilizando o *KAPA Library Quantification kit for Illumina* (Roche).

O sequenciamento em larga escala dos amplicons foi realizado no equipamento Illumina MiSeq (2 x 250 pb), em corridas 2x250 pb.

Análises de bioinformática

A qualidade das sequências brutas foi checada utilizando o programa FASTQC versão 0.11.5 (ANDREWS, 2010). As sequências oriundas dos *primers* foram removidas pela ferramenta Cutadapt (MARTIN, 2011). As análises do microbioma foram realizadas utilizando a ferramenta DADA2 versão 1.20.0 (CALLAHAN et al., 2016), compreendendo: remoção de *reads* de baixa qualidade (phread <20) e ruídos (*denoising*), junção das sequências R1 (forward) e R2 (reverse), remoção de quimeras (usando o método de consenso) e agrupamento das sequências representativas baseado em variantes de sequência de amplicons (ASVs). Posteriormente a classificação taxonômica foi atribuída usando o banco de dados *SILVA ribosomal RNA gene database* versão 138.(QUAST et al., 2012).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no R *statistical environment* (v. 3.6.1) (R CORE TEAM, 2014). A tabela taxonômica contendo a contagem foi importada

juntamente com o arquivo do “metadata” para análise no pacote *Phyloseq* (McMurdie and Holmes, 2013) do R. As análises de componentes principais (PCoA) baseada na matriz de distância de *Bray-Curtis* (BRAY; CURTIS, 1957) e *Jaccard* foram realizadas para avaliar a divergência entre as réplicas e amostras. A cobertura do sequenciamento foi avaliada pela análise de rarefação. Os índices de Alpha diversidade baseada no estimador de riqueza *Chao1* (CHAO, 1984), espécies observadas e índice de *Shannon-Wiener* H' foram calculados pelo pacote *Phyloseq* do R. A composição microbiana foi expressa em abundância relativa para todos os níveis taxonômicos.

4.3 Identificação do doador de elétrons

Este experimento teve como objetivo identificar se as BRS consomem diretamente os produtos da hidrólise do RGC ou se estas consomem os subprodutos da fermentação deste material, produzidos pelas bactérias fermentativas presentes no consórcio. Este ensaio utilizou reatores em batelada com as mesmas características do ensaio de enriquecimento do consórcio, além de uma condição sem a adição de uma fonte de sulfato. Além dos perfis de sulfato e sulfeto e variação do pH, os carboidratos totais e os ácidos graxos voláteis (AGV) também foram monitorados.

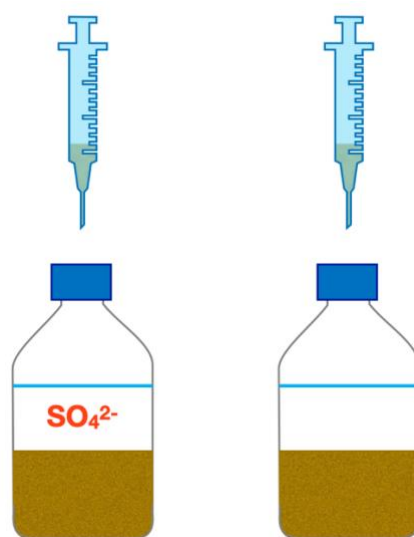


Figura 5: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de identificação do doador de elétrons

4.4 Potencial de liberação do doador de elétrons

Para quantificar a relação entre a quantidade de RGC utilizada nos reatores e o sulfato reduzido até a exaustão do substrato, foram operados reatores em batelada com as mesmas características do ensaio de enriquecimento de consórcio, mas com diferentes massas de RGC (1 g, 2 g e 5 g de RGC). A concentração de sulfato foi monitorada em intervalos de 4 dias e reabastecida com Na_2SO_4 até que não houvesse mais diminuição na concentração. Para evitar que a concentração acumulada de S^{2-} pudesse interferir de alguma forma na redução de SO_4^{2-} , em todas as ocasiões nas quais o esgotamento do sulfato foi observado, o S^{2-} foi removido dos reatores via injeção de argônio através de uma pedra porosa de mineral inerte por cerca de 10 minutos. Após este processo, novas medidas da concentração das duas substâncias foram realizadas. Para este ensaio, os parâmetros monitorados foram as concentrações de sulfeto, variação do pH, carboidratos totais e concentrações de AGV.

Com a finalidade de complementar os dados relacionados aos efeitos da proporção entre SO_4^{2-} e RGC, também foi realizado um ensaio no qual foi variada a concentração de sulfato ao invés da massa de RGC utilizada. Neste ensaio, os reatores em batelada utilizaram 2 g de RGC e concentrações iniciais de 750 mg L^{-1} , 1000 mg L^{-1} e 3000 mg L^{-1} de SO_4^{2-} . Os parâmetros monitorados foram as concentrações de sulfeto, sulfato e a variação de pH.

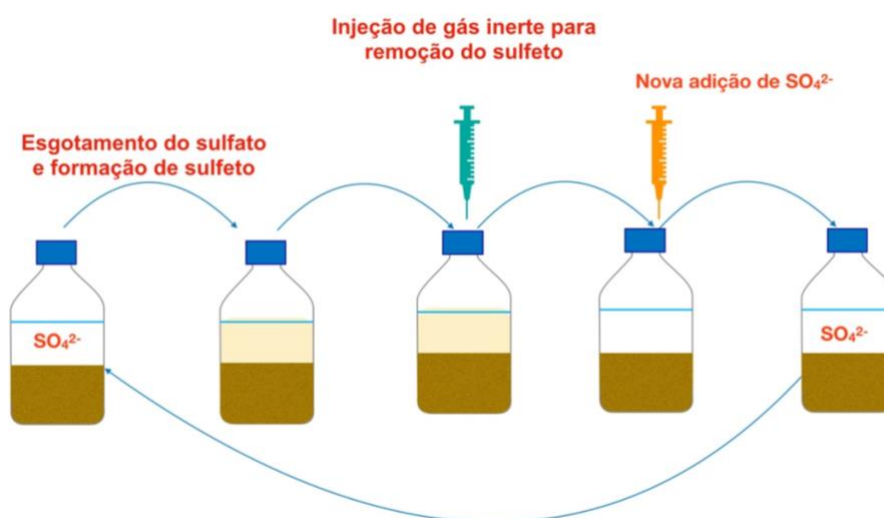


Figura 6: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de potencial do doador de elétrons

4.5 Avaliação de toxicidade do sulfeto

Foram utilizados reatores em batelada com as mesmas características do ensaio de enriquecimento de consórcio, porém com a adição das concentrações iniciais de 250 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹ e 700 mg L⁻¹ de sulfeto. Para produzir essa concentração inicial de sulfeto, foi usada uma solução concentrada de Na₂S com ajuste prévio de pH para $\approx 7,0$. Para avaliar a influência da presença de sulfeto no metabolismo das BRS, foram avaliadas as variações nas substâncias produzidas pelas BRS através da análise de AGV das amostras via CLAE.

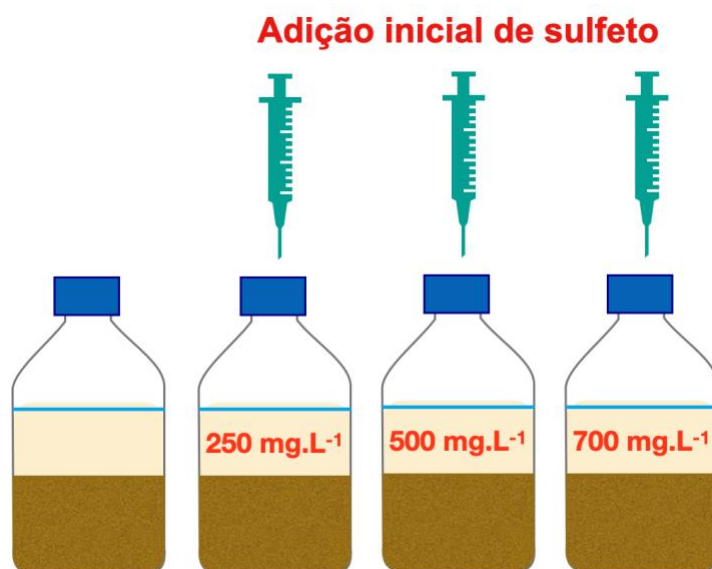


Figura 7: Esquema ilustrativo com as principais características do ensaio de toxicidade do acúmulo de sulfeto

4.6 Métodos analíticos

O sulfeto dissolvido foi medido através do kit Hach (kit ref. #2244500, Hach Company, CO, USA), baseado no método do azul de metileno (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).

Os AGV foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta performance (CLAE), com as amostras previamente filtradas em filtro Sep Pak C18,

injetadas com um volume de 20 µL num sistema de cromatografia líquida Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração RID-10A. A coluna utilizada foi a BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm), com fase móvel H₂SO₄ 0,01 N, mantida numa temperatura de 60°C com fluxo de 0,6 mL/min.

Os carboidratos totais foram medidos pelo método do ácido sulfúrico-fenol (DUBOIS et al., 1956). Para tal, 500 µL da amostra foi adicionada a um tubo de DQO padrão HACH®, junto de 500 µL de uma solução de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após tampar o tubo, este foi deixado em repouso por 10 minutos e resfriado até atingir temperatura ambiente. A absorbância da amostra foi então lida no espectrofotômetro calibrado com a curva padrão, com comprimento de onda de 490 nm.

A análise de ácido láctico foi feita por método espectrofotométrico (TAYLOR, 1996). Em resumo, 500 µL de amostra previamente filtrada em membrana de 0,45 µm é adicionada em tubo de DQO padrão HACH®, ao qual adiciona-se também 3,0 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura é homogeneizada e digerida a 100°C por dez minutos. Após esfriarem, adicionam-se 50 µL de uma solução de 4% CuSO₄.5H₂O (m/v) e de 100 µL da solução de 1,5% p-fenilfenol em etanol 96% (m/v). A leitura é realizada após 30 minutos de reação em absorbância de 570 nm.

A composição e quantificação dos gases contidos no *headspace* dos reatores foi medida via cromatografia gasosa (CG), através do cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 equipado com coluna capilar Carboxen 1010 plot (30 m x 0,53 mm x 0,30 µm), utilizando argônio como gás de arraste e operando nas condições de temperatura inicial do injetor igual a 220°C; temperatura inicial do detector de 230°C e com vazão do gás de make up (Ar) de 12 mL.min⁻¹. (PERNA et al., 2013)

As medidas de pressão foram realizadas através de um manômetro Keller, modelo LEO1 FS type, com alcance entre -1 e 3 bar e precisão de 0,2%.

Um resumo de quais técnicas foram empregadas em cada um dos ensaios realizados pode ser visto no Quadro 1.

Ensaio	Enriquecimento do consórcio	Identificação dos doadores de elétrons	Potencial de liberação dos doadores de elétrons	Toxicidade do acúmulo de sulfeto
Objetivo	Selecionar as bactérias sulfetogênicas presentes no lodo inicial e identificar as bactérias presentes no consórcio obtido.	Identificar quais substâncias presentes no material lignocelulósico são responsáveis pela doação de elétrons no processo de redução do sulfato.	Determinação da quantidade de SO_4^{2-} reduzido até o esgotamento da capacidade do RGC de fornecer doadores de elétrons	Avaliar a interferência do sulfeto na atividade metabólica do consórcio microbiano.
Delineamento experimental	Sucessivas repicagens dos microrganismos em um novo meio de cultura, sequenciamento de DNA e análise dos dados obtidos	Operação de reatores em batelada com e sem sulfato, análise dos resíduos dos grãos de cevada ao final do processo e comparação com a composição inicial do material.	Adições sequenciais de sulfato em batelada, até não se observar decréscimo na concentração de SO_4^{2-}	Comparativo da redução de SO_4^{2-} e produção de S^{2-} em meio com aumentos progressivos da concentração de S^{2-}
Monitoramento	Quantificação de S^{2-} e SO_4^{2-} pH	Quantificação de S^{2-} e SO_4^{2-} pH Ácidos Graxos Voláteis Carboidratos Totais Lactato Pressão	Quantificação de S^{2-} e SO_4^{2-} pH Ácidos Graxos Voláteis Carboidratos Totais Caracterização do <i>headspace</i> Pressão	Quantificação de S^{2-} e SO_4^{2-} pH Ácidos Graxos Voláteis Carboidratos Totais

Quadro 1: Resumo dos ensaios realizados e metodologias utilizadas

5. Resultados e Discussão

5.1 Enriquecimento do consórcio

Neste ensaio, foi realizado o enriquecimento do consórcio a partir do lodo inicial, em condições que favorecem o crescimento das BRS e microrganismos capazes de interagir com o RGC.

Na primeira geração, o esgotamento do sulfato levou 35 dias, e a taxa máxima de consumo de sulfato foi de $33,97 \pm 4,59 \text{ mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Tabela 2). Esta geração iniciou sem a presença de sulfeto e terminou com uma concentração final de $282,20 \pm 11,14 \text{ mg L}^{-1}$ e velocidade de produção de $10,52 \pm 1,15 \text{ mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Para a sétima geração, após 21 dias e o esgotamento do sulfato presente nos reatores, a produção máxima de sulfeto foi de $400,32 \pm 11,10 \text{ mg L}^{-1}$. Nesse ensaio, a velocidade máxima de produção de sulfeto foi de $8,66 \pm 2,95 \text{ mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ enquanto a de consumo de sulfato ficou em $50,63 \pm 2,24 \text{ mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Condição	Total de sulfato reduzido (mg)	Sulfato reduzido por grama de resíduo de cevada (mg)	Total de sulfeto produzido (mg)	Velocidade máxima de SO_4^{2-} consumido ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}$)
1ª geração	$191,5 \pm 88,5$	$95,8 \pm 44,2$	$43,1 \pm 2,8$	$34,0 \pm 4,6$
7ª geração	$229,5 \pm 7,2$	$114,7 \pm 3,6$	$53,2 \pm 1,1$	$50,6 \pm 2,2$

Tabela 2: Comparativo dos principais parâmetros de redução de sulfato e produção de sulfeto entre a primeira e a sétima gerações

Em condições semelhantes, utilizando também resíduos de grãos de cevada como doadores de elétrons, (COSTA; BEVILAQUA; LENS, 2020) obtiveram $324,7 \pm 37,7 \text{ mg L}^{-1}$ de produção de sulfeto e $69,0 \pm 11,6 \text{ mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de consumo de sulfato.

Estes resultados mostram a efetividade do processo de enriquecimento em condições mesofílicas na melhoria das características desejadas no consórcio. Vale ressaltar que o impacto mais significativo foi observado na quantidade de sulfeto produzido, enquanto a velocidade máxima de produção manteve um valor semelhante. Este comportamento observado pode ser um indicativo de que o fator limitante na produção de S^{2-} não seja a etapa de redução do SO_4^{2-} , mas sim a obtenção de substratos para a realização deste processo.

O monitoramento da 4ª geração não foi realizado devido ao período de recesso das atividades acadêmicas. É possível notar que a 5ª geração demonstrou melhores resultados referentes ao tempo de redução de SO_4^{2-} e a concentração de S^{2-} produzido, porém a manutenção da cultura em geladeira durante o período 21 dias pode ter influenciado na perda deste desempenho no repique para a 6ª geração. A 7ª geração, utilizada nos ensaios seguintes demonstrou uma retomada do desempenho próximo ao da 5ª geração nos parâmetros monitorados

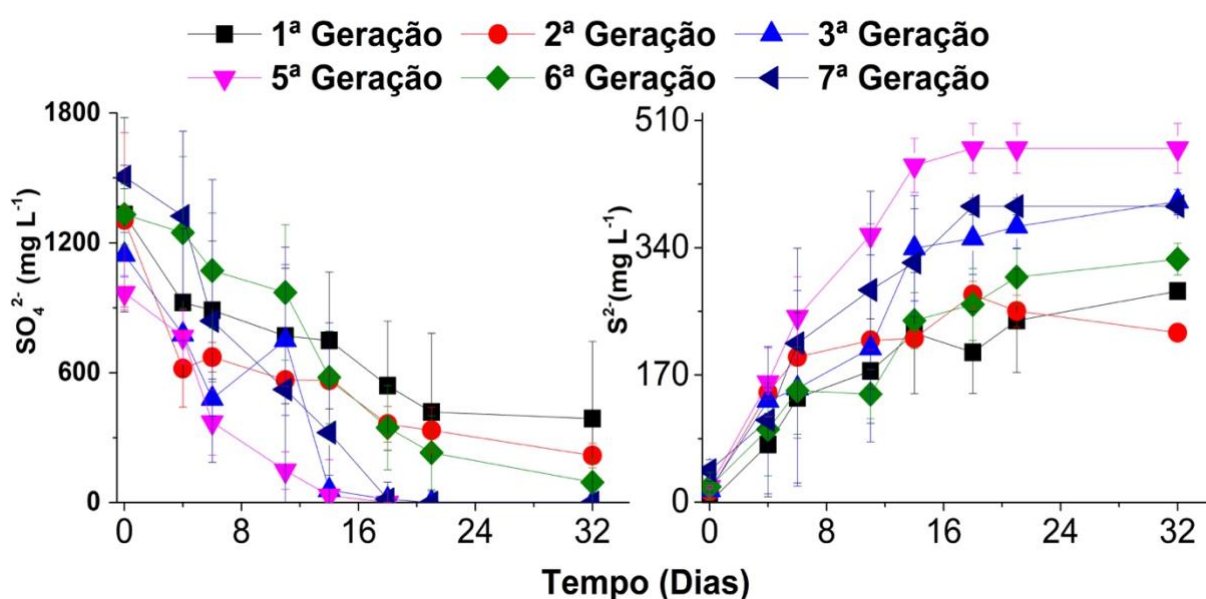


Figura 8: Gráficos da concentração de sulfato e sulfeto no ensaio de enriquecimento do consórcio

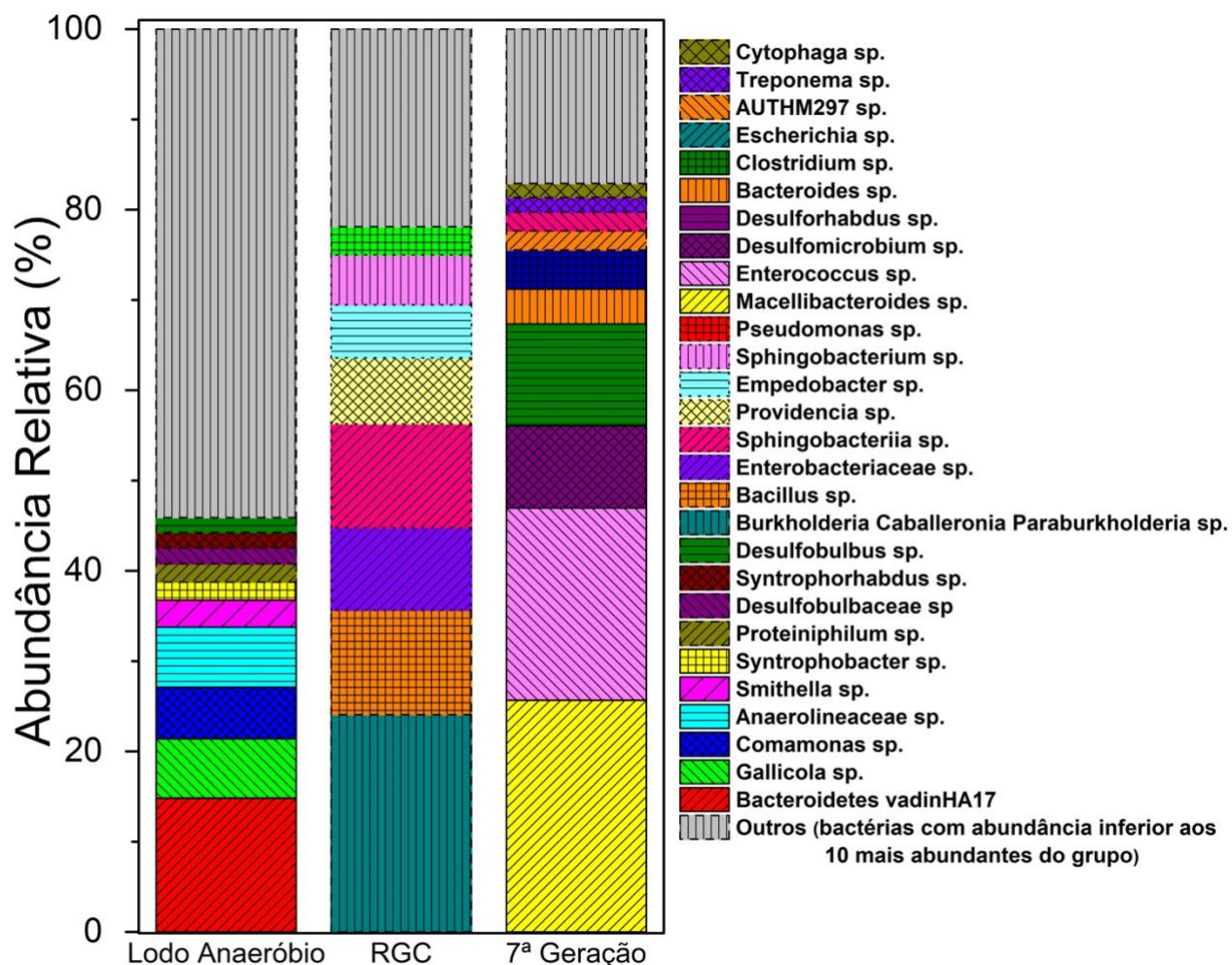


Figura 9: Gráfico das principais espécies encontradas no lodo, BSG e no consórcio enriquecido

O aumento na quantidade de sulfeto produzido (Figura 8) pode ser atribuído a uma mudança no perfil da comunidade microbiana (Figura 9), que inicialmente não contava com um número significativo de BRS em relação a outros tipos de microrganismos ali presentes. Como a primeira geração foi inoculada com lodo anaeróbico, foi observada alta abundância de degradadores orgânicos anaeróbios e bactérias desnitrificantes (Figura 9). Essas bactérias são geralmente encontradas em lodo de tratamento de águas residuais (SCHLEGEL; JANNASCH, 2006), e incluem microrganismos afiliados aos gêneros *Gallicola* e *Comamonas* (BRENNER et al., 2005).

As bactérias encontradas no RGC parecem ter pouca influência na composição do consórcio final, uma vez que as espécies encontradas em quantidades mais expressivas possuem atividade metabólica ligada à degradação de vegetais em ambientes aeróbios. Após a transferência para os reatores anaeróbios, nenhuma das espécies com quantidades significativas que se iniciaram no RGC se mantiveram no consórcio enriquecido

Após os procedimentos de enriquecimento, as unidades taxonômicas operacionais (UTOs) afiliadas aos gêneros *Macellibacteroides* e *Enterococcus* atingem as maiores abundâncias relativas (25,68% e 21,28%, respectivamente), embora a abundância relativa desses grupos no inóculo tenha sido desprezível (<0,1%). Ambas são bactérias fermentativas anaeróbias que utilizam principalmente açúcares como glicose, lactose, manose, maltose e produzem hidrogênio e acetato (JABARI et al., 2012), sendo o hidrogênio um doador de elétrons típicos para as BRS (NISHIYAMA et al., 2009). O processo de enriquecimento resultou em uma variedade de BRS que não eram vistas de forma expressiva na composição do lodo inicial nem do RGC. Contadas todas as espécies mais relevantes, as BRS representam 32,76% da cultura enriquecida (Figura 9).

Como ponto comum, todos são organismos mesófilos, estritamente anaeróbios, que podem usar sulfato comoceptor de elétrons e tem uma faixa de pH ideal próxima a um valor neutro (BRENNER et al., 2005; NISHIYAMA et al., 2009; ROSENBERG, 2013). Embora a *Bacteroides graminisolvens*, use glicose como doador de elétrons, a maioria das espécies encontradas, como *Desulforhabdus.sp* e *Desulfomicrobium.sp* usam o hidrogênio, lactato, propionato, etanol e outros compostos orgânicos como doadores de elétrons para a redução de sulfato (RABUS et al., 2015),

Grande parte das BRS são oxidadoras incompletas de matéria orgânica e geram acetato como subproduto de seu metabolismo (MUYZER; STAMS, 2008), uma substância que foi encontrada nas análises de AGV realizadas nos experimentos (Seção 5.2). Esses resultados são muito consistentes com a análise AGV discutida no ensaio de identificação do doador de elétrons (Figura 10) e a análise da composição do *headspace* dos reatores do ensaio de potencial do doador de elétrons (Figura 11).

5.2 Identificação do doador de elétrons

Este ensaio buscou identificar os doadores de elétrons envolvidos na redução biológica de sulfato. Para tanto, foram operados, em triplicata, reatores em batelada contendo sulfato, nas mesmas condições descritas para o enriquecimento. Uma condição controle, sem adição de sulfato, também foi operada em triplicata.

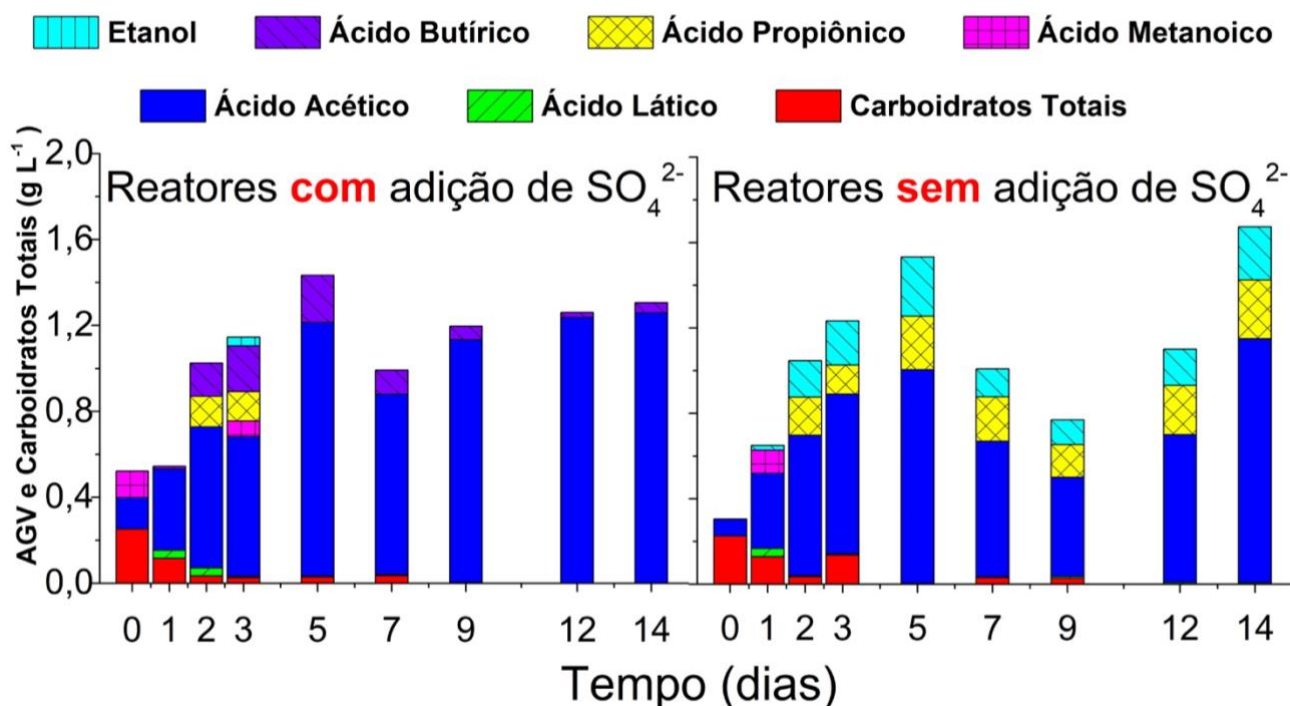


Figura 10: Gráfico dos principais ácidos voláteis encontrados no decorrer do ensaio de identificação do doador de elétrons

A análise de AGV mostrou que o ácido acético foi o principal produto final predominante nos reatores onde ocorreu a redução de sulfato (Figura 10). O perfil de AGV nos controles livres de sulfato se mostrou diferente dos reatores com sulfato, com a permanência dos ácidos butírico ($0,21 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$) e propiônico ($0,15 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$) até o final do ensaio, provavelmente produtos do metabolismo de *Clostridium butyricum* (ROSENBERG, 2013) e um possível acúmulo de hidrogênio no sistema (FLORENTINO et al., 2020).

A observação dos dados dos reatores livres de sulfato sugere que *Macellibacteroides* e *Enterococcus* fermentaram os produtos liberados pela RGC, produzindo ácidos orgânicos e, possivelmente, H_2 . Na ausência de sulfato, as BRS não consumiram o H_2 nem os outros produtos da fermentação que atuam como

doadores de elétrons levando a sua acumulação e a uma mudança no produto da atividade das bactérias fermentativas. Essa hipótese explica a diminuição na concentração de ácido acético e o aumento da concentração de ácido propiônico e butírico acumulados nos reatores controle (ie., para os quais não foi fornecido sulfato), e que são característicos de reatores acidogênicos. Além do perfil de ácidos, esta hipótese é reforçada pela observação dos valores inferiores de pH a partir do terceiro dia. Ao utilizar reatores de leito fixo, COSTA et al. (2021) observou um comportamento semelhante quando reatores que utilizavam sacarose como doador de elétrons tiveram a atividade das BRS inibida pelo acúmulo de metais e queda nos valores de pH.

Apesar dessa diferença, ambos os reatores tinham ácido acético como principal produto. Este comportamento pode ser explicado pela presença de *Macellibacteroides* e *Enterococcus*, que fermentam açúcares em acetato, hidrogênio e outros produtos (JABARI et al., 2012) e algumas espécies como *Bacteroides graminisolvens*, espécies *Desulforhabdus* e espécies *Desulfomicrobium* que podem usar hidrogênio e diversos compostos orgânicos como parte de seu metabolismo (NISHIYAMA et al., 2009). O lactato é o doador de elétrons prioritário para a maioria dos grupos de BRS (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007), mas alguns ambientes alcalinos também podem fazer com que a *Enterococcus sp.* promova a produção de acetato e etanol ao invés de lactato

Além da identificação do consórcio de microrganismos e seus principais produtos, também foi avaliada a composição inicial e final do RGC utilizado nos reatores (Tabela 3).

Condição	Extrativos	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Somatório (%)
RGC	41,2	1,6	14,2	30,6	7,6	95,2
Inicial	± 0,5	± 0,5	± 0,7	±0,9	±0,0	
RGC	22,3	5,5	31,8	16,9	16,1	92,6
Final	± 0,4	± 0,2	± 0,8	±0,4	±0,6	

Tabela 3: Comparativo do consumo dos RGC no ensaio de identificação do doador de elétrons

De acordo com a análise comparativa, a celulose foi o substrato mais consumido pelo conjunto de bactérias fermentativas. A princípio este resultado se mostrou diferente do esperado, uma vez que na maior parte dos materiais lignocelulósicos a hemicelulose é o produto mais biodisponível devido a suas ramificações e cadeias mais curtas, porém é possível que os tratamentos mecânicos e térmicos para liberação dos açúcares do malte e o contato do bagaço com diversas substâncias durante o processo de fermentação do mosto cervejeiro facilitem o acesso do consórcio microbiano a celulose presente no material.

5.3 Potencial de liberação do doador de elétrons

O ensaio em questão foi elaborado com o intuito de verificar a relação da quantidade de sulfeto produzido e sulfato reduzido por grama de RGC antes do esgotamento dos doadores de elétrons provenientes do material, além da influência que a massa de RGC utilizada pode exercer no processo de lenta liberação dos doadores de elétrons.

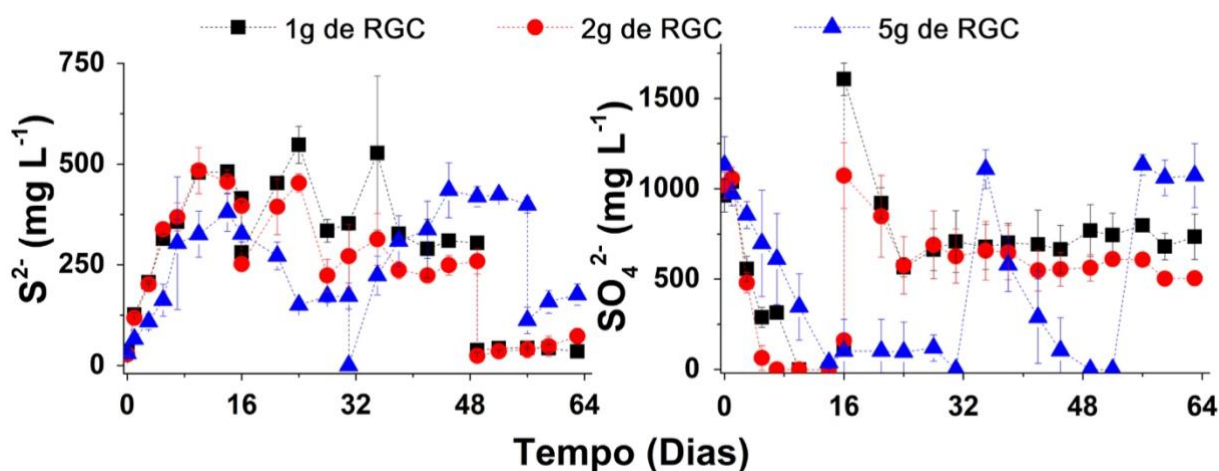


Figura 11: Gráfico da concentração de sulfato e sulfeto no decorrer do ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons

Esperava-se que fossem observados resultados semelhantes em todos os reatores, com uma duração da redução do sulfato diretamente proporcional à quantidade de RGC utilizada em cada um. No entanto, enquanto os reatores com 1g e 2g de RGC mostraram resultados semelhantes na redução de sulfato e produção de sulfeto, os reatores 5g mostraram um comportamento diferenciado (Figura 11) (Tabela 4). Enquanto os reatores de 1g e 2g consumiram todo o sulfato no 10º dia do ensaio, os reatores de 5g levaram 14 dias para consumir a mesma quantidade de sulfato. Os reatores de 5g também tiveram uma velocidade de produção de sulfeto cerca de 50% inferior em comparação com os reatores contendo 1g e 2g de RGC.

Durante os primeiros 5 dias, observou-se uma pressão acima de 1,2 bar na condição 5g, comportamento que também foi observado com menor propensão no reator de 2g. Todas essas observações sugerem que uma quantidade maior de RGC favoreceu processos fermentativos, o que pode ter estimulado a produção de

hidrogênio por *Macellibacteroides sp.* e *Enterococcus sp.*, ambos capazes de converter açúcares em hidrogênio e outros produtos (JABARI et al., 2012). Em reatores de 2g, um equilíbrio entre as BRS e a produção de hidrogênio pode ser a causa da elevação da pressão sem comprometer a redução biológica do sulfato.

A análise de AGV (Figura 12) mostrou que os reatores de 1g e 2g se comportaram de forma semelhante aos reatores com redução de sulfato no ensaio de identificação do doador de elétrons, com os reatores de 1g produzindo metade das quantidades de AGV dos reatores de 2g. Em contrapartida, os reatores de 5g mostraram um comportamento semelhante à condição sem sulfato do mesmo ensaio (Figura 10). A produção de ácido butírico é consistente com a presença de *Macellibacteroides sp.* (JABARI et al., 2012) e o ácido fórmico é um produto característico do metabolismo da *Enterococcus sp.* (BRENNER et al., 2005). É possível que o excesso de ácidos orgânicos e queda no pH do meio interfiram negativamente de alguma forma no metabolismo das BRS, o que ocasionou o consumo de sulfato mais lento observado em relação aos demais reatores (COSTA et al., 2021)

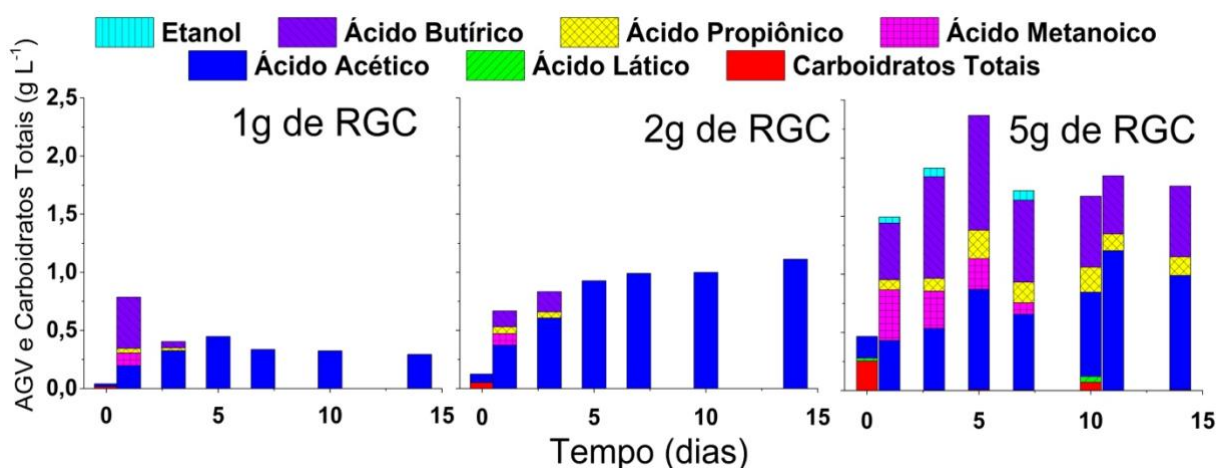


Figura 12: Gráfico dos principais ácidos voláteis encontrados no decorrer do ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons

Condição	Total de sulfato reduzido(g)	Sulfato reduzido por grama de cevada (g)	Velocidade máxima de redução de sulfato ($\text{mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	Velocidade máxima de produção de sulfeto ($\text{mg L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
1g de cevada	282,9 $\pm 39,6$	0,3 $\pm 0,0$	57,0 $\pm 14,2$	85,5 $\pm 0,4$
2g de cevada	247,9 $\pm 27,8$	0,1 $\pm 0,0$	68,2 $\pm 9,0$	85,5 $\pm 0,2$
5g de cevada	346,1 $\pm 41,0$	0,1 $\pm 0,0$	37,5 $\pm 19,0$	33,7 $\pm 1,6$

Tabela 4: Comparativo dos principais parâmetros de redução de sulfato e produção de sulfeto entre as três diferentes condições de reatores

Um segundo ensaio nas mesmas condições foi feito, mas utilizando o consórcio enriquecido 9ª geração ao invés do 7º e apenas 14 dias, para coletar a fase gasosa para análise por CG e verificar se o mesmo comportamento em relação a pressão e produção de gases seria observado. Enquanto a análise de AGV mostrou um perfil semelhante ao do primeiro ensaio (Figuras 8 e 9), o consumo de sulfato e a geração de sulfeto se comportaram de uma forma parcialmente diferente aos primeiros dados observados (Figuras 7 e 10). Enquanto os reatores de 2g continuaram sendo a melhor condição para ambos os ensaios, os reatores de 1g tiveram um comportamento inferior ao anterior neste segundo ensaio(Figuras 7 e 10).

Essa diferença dos reatores de 1g pode ser explicada pela diferença do pH inicial do meio. Enquanto no primeiro ensaio os reatores de 1g iniciaram com um pH de $\approx 9,0$, devido a um possível problema no tamponamento do meio, enquanto os segundos reatores iniciaram com um pH de $\approx 7,5$. Essa variação pode ter influenciado o crescimento do consórcio, favorecendo bactérias fermentativas que podem fornecer mais doadores de elétrons disponíveis para as BRS em um caso do que em outro.

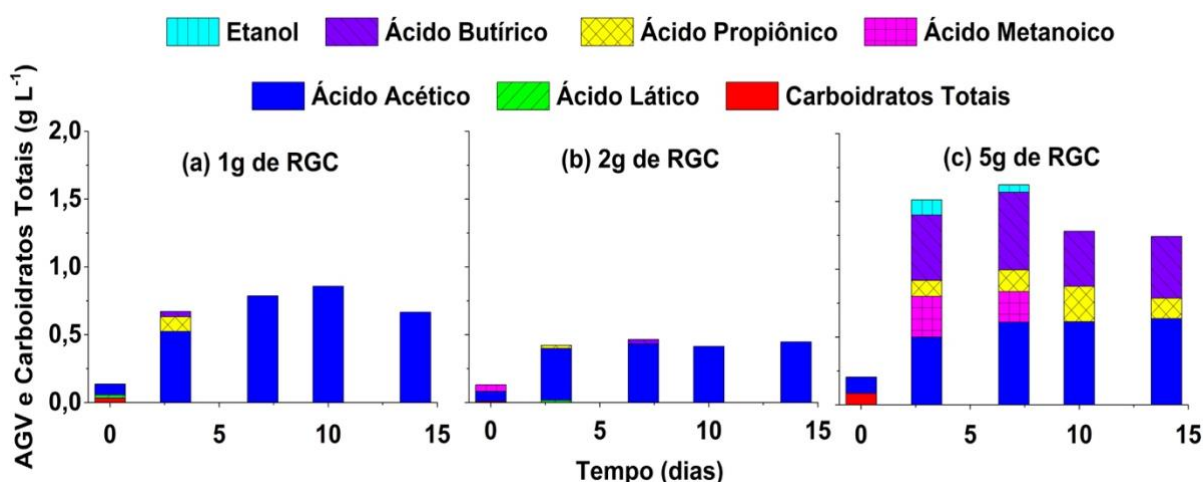


Figura 13: Gráfico dos principais ácidos voláteis encontrados no decorrer do segundo ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons

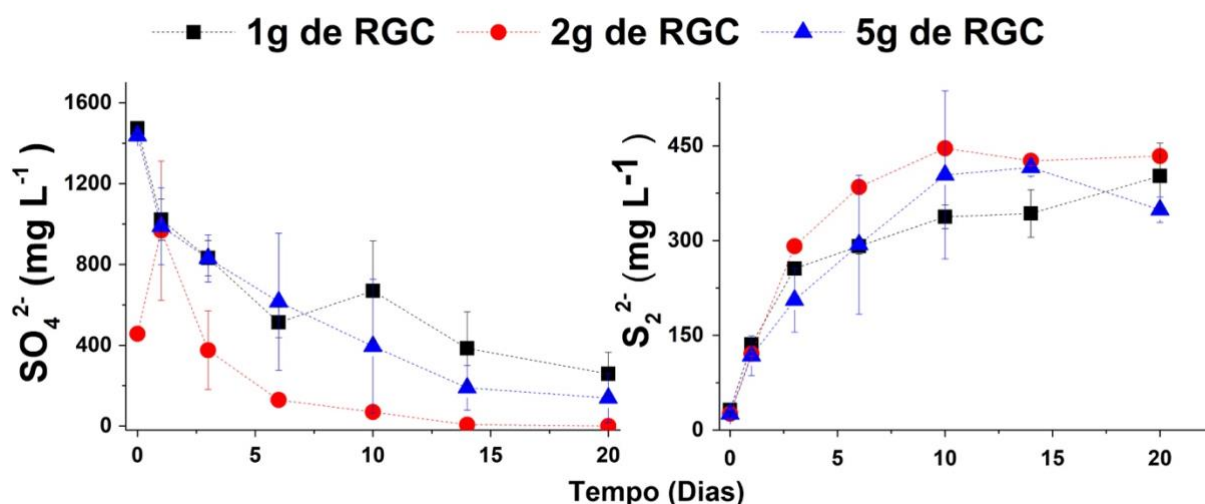


Figura 14: Gráfico da concentração de sulfato e sulfeto no decorrer do segundo ensaio de potencial de liberação do doador de elétrons

Para tentar elucidar a questão do aumento significativo da pressão observada nos reatores de 5g, foi feita a coleta de amostras dos gases contidos no *headspace* de todos os reatores deste segundo ensaio de potencial do doador de elétrons e a variação da composição destes gases durante o transcorrer do ensaio foi avaliada.

O primeiro dado que se destaca no gráfico (Figura 15) é a diferença na produção de H_2 em cada condição. Enquanto os reatores de 1g têm apenas uma produção menor de H_2 no primeiro dia, os reatores de 2g tiveram uma produção mais

significativa no primeiro dia e um pico entre o 4º e 8º dias (cerca de 20% da composição do *headspace*). Os reatores de 5g tiveram seu pico de produção de H₂ no 2º dia (próximo de 25% da composição do *headspace*) e um lento decréscimo durante a primeira semana, encerrando sua produção no 10º dia.

Ao comparar esses dados com os de AGV (Figura 13), é possível observar que os principais produtos das bactérias fermentativas, como acetato, propionato e butirato foram produzidos, mas não consumidos pelas BRS, o que pode ter contribuído para diminuir o pH dos reatores de 5g para $\approx 5,7$.

Essa queda de pH altera o equilíbrio químico entre as espécies de sulfeto presentes no meio reacional (Figura 2) e desloca uma parte mais significativa para a forma de do H₂S, que se desprende para a fase gasosa (HOLMER; HASLER-SHEETAL, 2014), além de levar o reator para condições ácidas de trabalho. Tal fator pode ser observado na composição do *headspace* nos reatores de 5g (Figura 15), com uma concentração de H₂S significativamente mais acentuada do que nas outras configurações de reatores monitorados.

A queda de pH observada também leva os reatores para uma condição ácida de trabalho. Esta condição pode causar uma inibição da atividade nos reatores, mas neste caso ainda é possível observar uma redução mais lenta do sulfato e produção de sulfeto, mesmo fora das condições ideais de pH= 7,0 (AZABOU et al., 2007).

Já é fato conhecido que a *Desulfomicrobium sp.* pode utilizar H₂ como doador de elétrons (JABARI et al., 2012) e também que quando esta espécie utiliza o lactato como doador de elétrons, sua oxidação é incompleta, produzindo acetato e CO₂ (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2010).

A diminuição da concentração de H₂ e a produção tanto de acetato quanto de CO₂ foi observada nas análises de CG e AGV (Figuras 9 e 11), o que reforça a hipótese de que a *Desulfomicrobium sp.* ainda estava parcialmente ativa nesses reatores de 5g e realizando o consumo de sulfato e produção de sulfeto, mesmo que numa velocidade mais lenta.

Tanto o CO₂ quanto o acetato são resultado do processo oxidativo realizado pelas BRS. Enquanto determinados grupos de BRS são capazes de realizar a oxidação completa do SO₄²⁻, outros realizam o processo de oxidação incompleta. Na oxidação completa, os doadores de elétrons consumidos do material lignocelulósico

são convertidos a CO_2 , enquanto na oxidação incompleta esses compostos orgânicos são convertidos a acetato (VILELA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2014).

A maior produção de CO_2 observada nos reatores de 5g pode indicar a prevalência de BRS capazes de realizar a oxidação completa dos compostos orgânicos fornecidos, enquanto nos outros reatores pode haver uma prevalência de oxidadores incompletos.

Também é importante notar que não houve produção significativa de metano, o que mostra que o processo de enriquecimento do consórcio eliminou arqueas metanogênicas e outros microrganismos que poderiam causar um possível deslocamento de elétrons para outras rotas metabólicas que não são de interesse no processo sulfetogênico. (COSTA; BEVILAQUA; LENS, 2020).

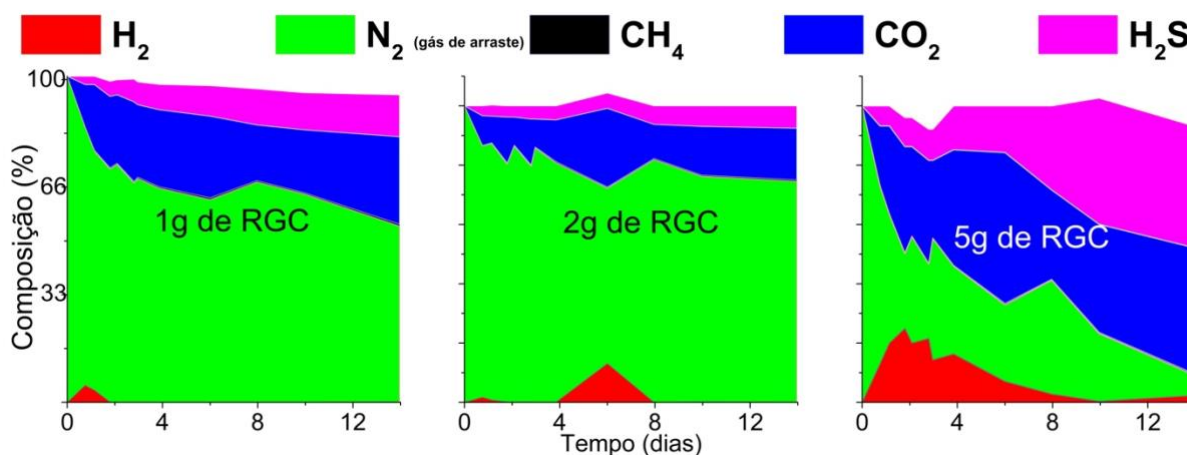


Figura 15: Gráfico dos principais gases encontrados no headspace de cada condição dos reatores

5.5 Ensaio de influência da proporção entre sulfato e resíduos de grãos de cevada

Diante dos resultados diferenciados referentes aos reatores de 5 g (item 5.3), foi necessário elaborar um ensaio para verificar se o comportamento observado decorreu em função da quantidade de RGC utilizado ou de uma possível falta de SO_4^{2-} disponível para o conjunto de microrganismos. Assim, fixou-se a massa de RGC e variou-se a concentração inicial de sulfato em 750, 1000 e 3000 $\text{mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$.

A hipótese que levou a elaboração deste ensaio foi a de que a falta de SO_4^{2-} poderia ser o fator responsável pela diferença no comportamento dos reatores de 5 g do ensaio de potencial dos doadores de elétrons (item 5.3). Para que esta hipótese fosse comprovada, os reatores com a menor relação entre a quantidade de sulfato e de RGC (750 mg L^{-1} , 0,38 g L^{-1} de SO_4^{2-} por grama de RGC) deveriam se comportar de modo semelhante aos reatores com 5 g de RGC (item 5.3) (0,30 g L^{-1} de SO_4^{2-} por grama de RGC), com um menor consumo de SO_4^{2-} e uma menor produção de S^{2-} em relação as outras condições, uma vez que a proporção entre a concentração de SO_4^{2-} e a massa de RGC é semelhante.

Ao observar os dados obtidos (Figura 16), o primeiro ponto que se destaca é a velocidade muito semelhante no consumo de SO_4^{2-} entre os reatores com 750 mg L^{-1} ($V_{\text{max}} 13,65 \pm 5,45 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e 1000 mg L^{-1} ($V_{\text{max}} 13,46 \pm 0,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), enquanto os reatores com 3000 mg L^{-1} tiveram uma velocidade inicial maior ($79,68 \pm \text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e uma velocidade de $27,86 \pm \text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no mesmo período em que os outros reatores atingiram sua velocidade máxima. O mesmo comportamento não foi observado em relação a produção de sulfeto, que manteve um comportamento semelhante em todas as configurações de reatores.

No ensaio de identificação dos doadores de elétrons (item 5.3), a condição com a menor velocidade de consumo do SO_4^{2-} foi a de 5 g, mesmo utilizando uma proporção de SO_4^{2-} por grama de RGC semelhante a dos reatores com 750 mg L^{-1} deste ensaio. Uma vez que em nenhum dos casos se observou diferenças de comportamento nestes parâmetros durante o decorrer do ensaio, é possível conjecturar que a acidificação e acúmulo de butirato, propionato e outros compostos observados no ensaio de potencial do doador de elétrons (Figura 12) está relacionado a quantidade de RGC utilizado nos reatores.

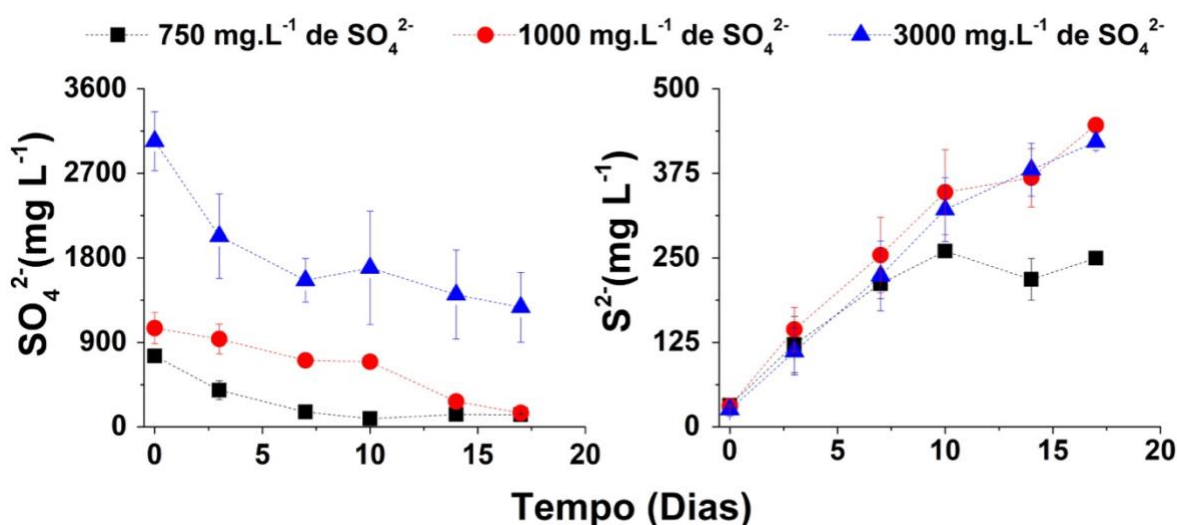


Figura 16: Gráficos dos monitoramentos de S^{2-} , SO_4^{2-} do ensaio de proporção do SO_4^{2-}

5.6 Avaliação de toxicidade do acúmulo de sulfeto

Neste ensaio, reatores em batelada foram operados com concentrações iniciais crescentes de sulfeto. Foi utilizada uma condição controle (sem adição de sulfeto), e 250, 500 e 750 mg L^{-1} iniciais de sulfeto. Após o acompanhamento por 23 dias, os resultados referentes à produção de sulfeto e consumo de sulfato podem ser vistos na Tabela 5.

Condição	Total de sulfato reduzido (mg L ⁻¹)	Total de sulfeto produzido (mg L ⁻¹)	Velocidade máxima de redução de sulfato (mg L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Velocidade máxima de produção de sulfeto (mg L ⁻¹ .dia ⁻¹)
Controle	293,6	499,7	44,1	65,9
	± 12,8	± 21,1	± 13,9	± 5,1
250 mg L ⁻¹	187,2	876,7	38,6	35,4
	± 36,7	± 31,3	± 6,6	± 9,7
500 mg L ⁻¹	239,7	376,8	41,3	52,9
	± 26,0	± 72,6	± 8,2	± 11,7
700 mg L ⁻¹	139,6	205,8	43,0	35,3
	± 31,8	± 29,4	± 6,0	± 11,9

Tabela 5: Análise das variações de sulfato e sulfeto durante o ensaio de influência da toxicidade do sulfeto

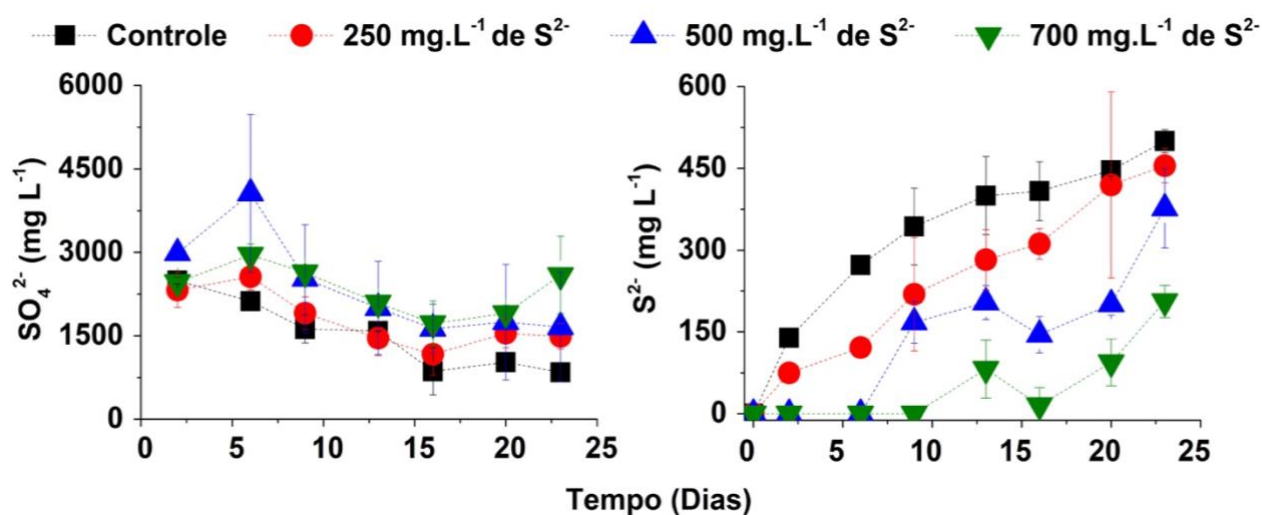


Figura 17: Gráfico das concentrações de sulfato e sulfeto dos reatores em cada uma das condições

Os valores da massa de sulfeto produzido foram calculados com base na diferença entre as massas finais e iniciais de sulfeto em cada reator e a taxa de produção foi calculada com base na média da equação linearizada gerada com os pontos de amostragem coletados de cada reator durante o ensaio.

Conforme é possível notar, o aumento na concentração inicial de sulfeto parece ter um impacto significativo na quantidade de sulfeto produzido em cada um dos reatores. Enquanto os reatores com concentrações mais baixas de sulfeto mostraram um aumento constante na produção de sulfeto, os reatores com concentrações maiores mostraram uma maior demora no início da produção de sulfeto, permanecendo com uma concentração constante nos primeiros seis primeiros dias nos reatores com 500 mg L^{-1} e nove dias no caso dos reatores com a adição inicial de 700 mg L^{-1} .

O consumo de sulfato também parece ter sido afetado pela quantidade adicional de sulfeto nos reatores, uma vez que todos os reatores tiveram uma velocidade de consumo menor que o do controle, mas neste caso a influência se mostrou menos expressiva do que em relação ao impacto ocorrido na produção de sulfeto.

Conforme é possível notar na Figura 17, há uma correlação entre o acúmulo de sulfetos e a queda em sua taxa de produção (Tabela 5). Após 23 dias, o controle de condição padrão produziu $499,65 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfeto, enquanto as outras condições produziram cerca de $26,74 \text{ mg L}^{-1}$, $122,85 \text{ mg L}^{-1}$ e $293,80 \text{ mg L}^{-1}$ a menos de sulfeto, respectivamente. A principal razão para isso é o efeito tóxico do sulfeto na atividade metabólica do consórcio (HAO et al., 1996), então fica claro que em um sistema construído com maior foco na produção de sulfeto do que na remoção de sulfato, passa a ser importante a remoção contínua do sulfeto acumulado para evitar esta diminuição na velocidade de produção .

Já o consumo total e a velocidade de consumo do sulfato não foram fortemente afetados pelo acúmulo de sulfeto, pois os reatores de 500 mg L^{-1} consumiram mais sulfato do que os reatores de 250 mg L^{-1} , atingindo valores semelhantes aos reatores de controle (Tabela 5). Dito isso, apesar das velocidades de consumo de sulfato é possível notar que os reatores de 700 mg L^{-1} tiveram a menor taxa de consumo e

redução em comparação com as demais condições deste experimento, portanto a influência do efeito tóxico do acúmulo de sulfeto não pode ser completamente ignorada.

Outra questão importante observada é que enquanto os reatores de 500 mg L⁻¹ e 700 mg L⁻¹ tiveram produção máxima de sulfeto e taxas de consumo de sulfato semelhantes ao Controle e os reatores de 250 mg L⁻¹, estes reatores só demonstraram alguma atividade vários dias após início do o ensaio (6 e 9 dias, respectivamente) (Figura 17). Assim, é possível dizer que a concentração inicial de sulfetos pode causar um efeito retardador no início das atividades das BRS, prolongando a fase lag de desenvolvimento da produção de sulfeto proporcionalmente ao acúmulo da concentração do mesmo no sistema. Por mais que se tenha observado algum nível de interferência do sulfeto acumulado em todos os parâmetros monitorados, este foi o único parâmetro no qual se observou uma relação direta com a quantidade acumulada de sulfeto.

Após a análise dos dados de AGV (Figura 18) em conjunto com os outros dados do ensaio, foi possível perceber a existência de uma relação entre a quantidade de sulfeto produzido, sulfato reduzido e a diferença na quantidade de substratos fornecidos pelas bactérias fermentativas do consórcio avaliado. Enquanto no Controle se observou uma produção de diversos substratos, como o lactato, propionato, butirato e formiato, os reatores com concentrações iniciais de S²⁻ mais elevadas tiveram uma menor variedade e quantidade de substratos produzidos. Uma vez que não se observou uma diferença relevante na velocidade do consumo de sulfato e produção de sulfeto, mas sim nas quantidades consumidas e produzidas, é possível dizer que o prejuízo na produção desses metabólitos foi o fator limitante dentro do processo monitorado.

Portanto, diante do conjunto de dados observados, é possível afirmar que o acúmulo do S^{2-} no sistema não chega a afetar negativamente o conjunto de BRS, mas sim o conjunto de bactérias fermentativas que fornecem substrato para as atividades metabólicas destas BRS.

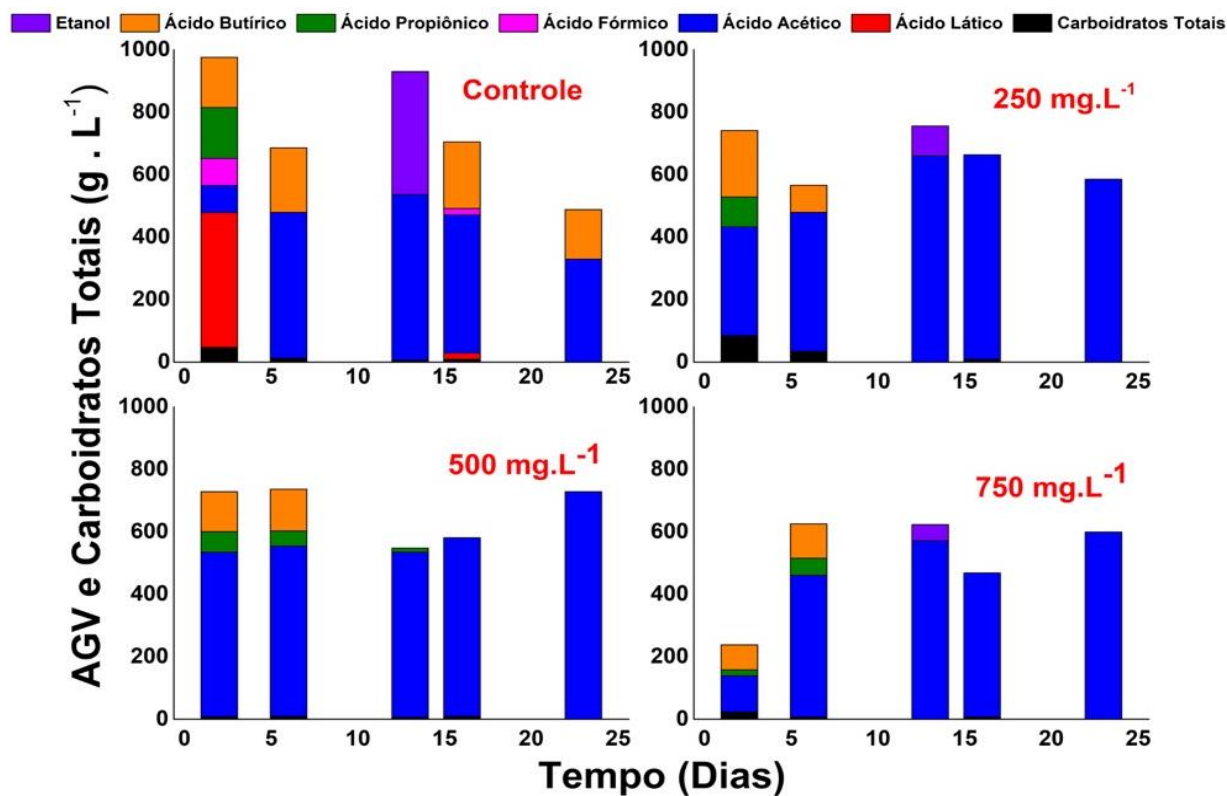


Figura 18: Gráfico das concentrações de AGV dos reatores em cada uma das condições

6. Conclusão

Diante dos dados observados, é possível concluir que o ensaio de enriquecimento demonstrou uma boa capacidade de seleção do consórcio de microrganismos para a finalidade desejada de se obter a redução de sulfato e produção de sulfeto, uma vez que as quantidades de material consumido e produzido para esses fins foram melhoradas e não se observou desvio do fluxo de elétrons para rotas metabólicas paralelas, como a produção de metano e outros produtos que não são de interesse no sistema proposto.

O ensaio de identificador dos doadores de elétrons demonstrou que o consórcio atua de forma cooperativa entre bactérias fermentativas que realizam a hidrólise do material lignocelulósico e produzem substratos como o hidrogênio, butirato, acetato e lactato, que por sua vez são consumidos pelas BRS para a manutenção de suas rotas metabólicas.

No ensaio de potencial dos doadores de elétrons, foi possível observar que a proporção incorreta de grãos de cevada, em especial o excesso, pode levar a uma diminuição considerável da capacidade de atuação do consórcio de microrganismos, seja pelo excesso de compostos produzidos pelas bactérias fermentativas ou pela variação que estes compostos causam no pH do meio nos reatores.

O ensaio de avaliação da toxicidade do sulfeto demonstrou que seu acúmulo no sistema leva a uma diminuição da velocidade de atuação do consórcio de microrganismos, em especial na produção de sulfeto.

Referências Bibliográficas

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st ed.; APHA:Washington, DC, USA, 2005. **American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation**, 2005.

AZABOU, S. et al. Isolation and characterization of a mesophilic heavy-metals-tolerant sulfate-

reducing bacterium *Desulfomicrobium* sp. from an enrichment culture using phosphogypsum as a sulfate source. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, n. 1–2, p. 264–270, 2007.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, out. 1957.

BRENNER, D. J. et al. **Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. [s.l: s.n.].

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 2: The Proteobacteria Part B -The Gammaproteobacteria*. **Springer-Verlag New York Inc.**, 2010.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 jul. 2016.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 3, p. 252–263, 23 abr. 2001.

CLINE, J. D. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters. **Limnology and Oceanography**, v. 14, n. 3, p. 454–458, 1969.

COSTA, R. B. et al. Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors: Influence of electron donors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. May 2020, p. 123622, 2021.

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, n. July, p. 111216, 2020.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FLORENTINO, A. P. et al. Long Chain Fatty Acid Degradation Coupled to Biological Sulfidogenesis: A Prospect for Enhanced Metal Recovery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. October, p. 1–14, 2020.

GARCIA JR, O.; BEVILAQUA, D. Microrganismos, Minerais e Metais. In: MELO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. DE (Eds.). . **Microbiologia Ambiental**. 2 rev. amp ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 647.

GODOI, L. A. G. DE. **Potencial do reator anaeróbico de leito fixo-estruturado e fluxo descendente para o tratamento de drenagem ácida de minas em**. [s.l: s.n.].

GODOI, L. A. G. DE; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. **Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery**. [s.l: s.n.].

HAO, O. J. et al. Sulfate-reducing bacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 155–187, 1996.

HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis**, v. 49, n. 3, p. 163–180, 7 dez. 2009.

JABARI, L. et al. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 2522–2527, 2012.

JAWAID, M.; TAHIR, P. M.; SABA, N. **Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 59

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.

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, 15 fev. 2017.

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

LEWIS, A.; VAN HILLE, R. An exploration into the sulphide precipitation method and its effect on metal sulphide removal. **Hydrometallurgy**, v. 81, n. 3–4, p. 197–204, 2006.

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

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011.

MUSSATTO, S. I. et al. Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 302–310, 2013.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 7 jun. 2008.

NISHIYAMA, T. et al. *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 1901–1907, 2009.

PERNA, V. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 54–62, jan. 2013.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em:

<<https://www.gbif.org/pt/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

RABUS, R. et al. A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 66, p. 55–321, 2015.

REYES-ALVARADO, L. C. et al. Carbohydrate based polymeric materials as slow release electron donors for sulphate removal from wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 407–415, 2017.

REYES-ALVARADO, L. C. et al. 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, 1 fev. 2018.

ROSENBERG, E. **The Prokaryotes**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

SCHLEGEL, H. G.; JANNASCH, H. W. Prokaryotes and Their Habitats BT - The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). . New York, NY: Springer New York, 2006. p. 137–184.

STAMS, A. J. M. et al. 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.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49–58, 1996.

VILELA, R. S.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 8, p. 1669–1675, 2014.

VILLA-GOMEZ, D. et al. Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inversed fluidized bed reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 1, p. 200–207, 2011.

VILLA-GOMEZ, D. K. et al. 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.

WAYBRANT, K. R.; BLOWES, D. W.; PTACEK, C. J. Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 13, p. 1972–1979, 1998.

Apêndice

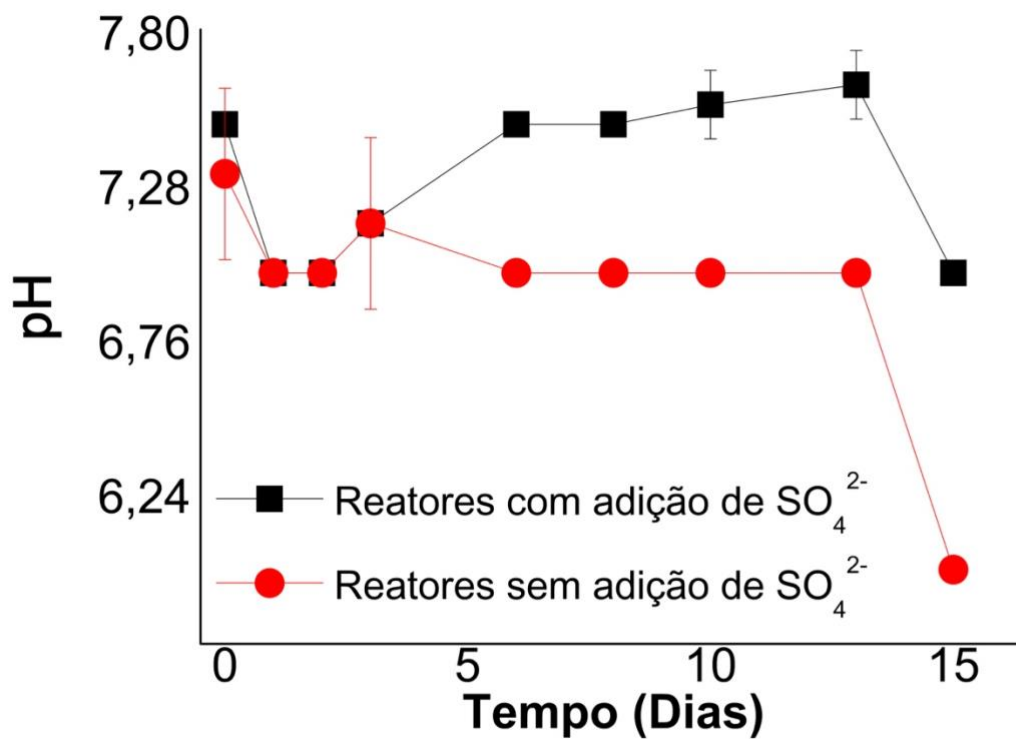


Figura 19: Gráfico de pH do ensaio de identificador de elétrons

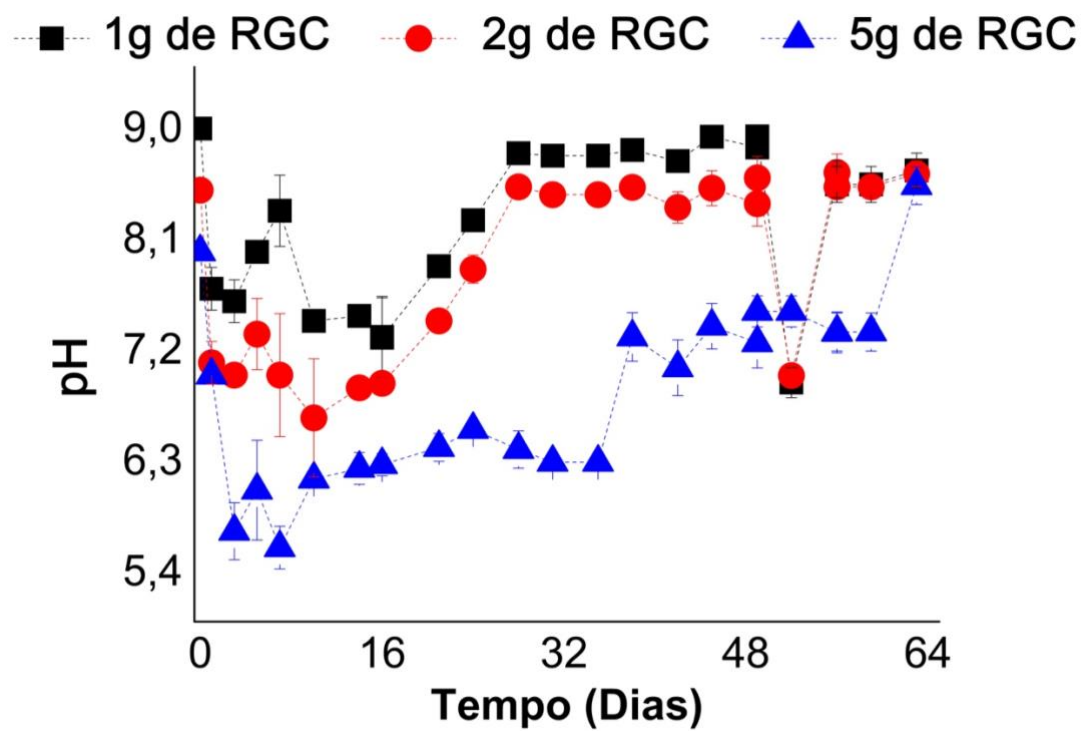


Figura 20: Gráfico de pH do primeiro ensaio de potencial do doador de elétrons

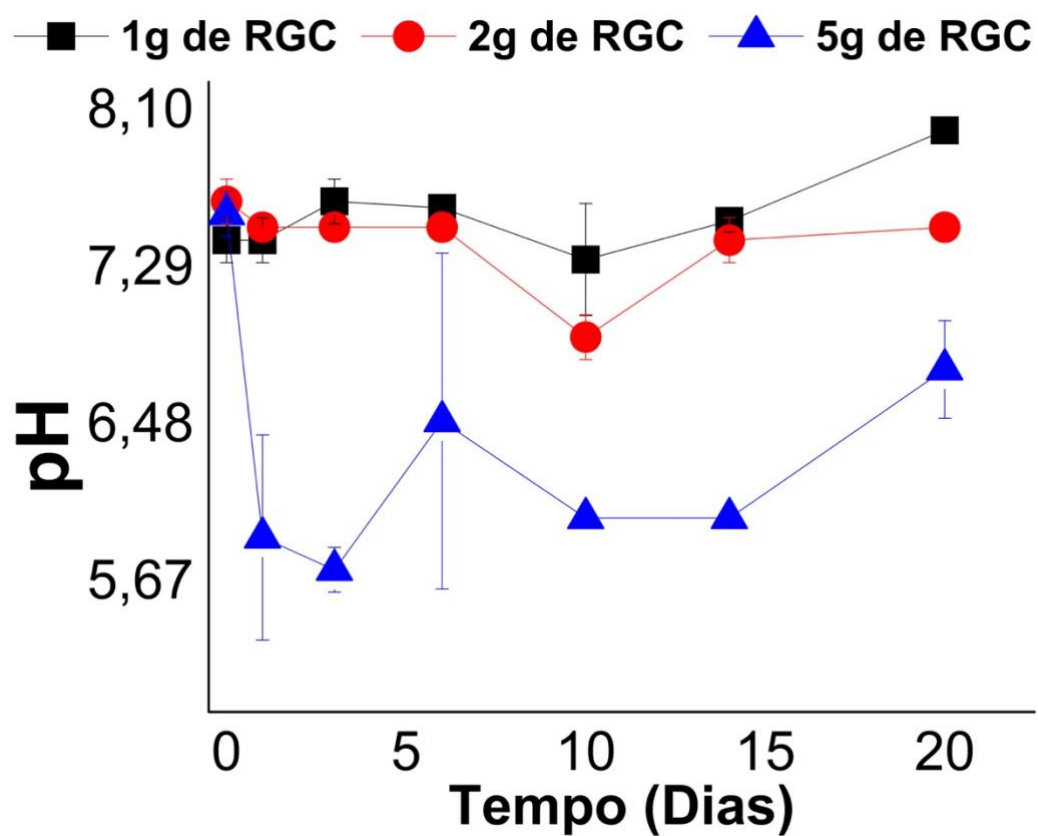


Figura 21: Gráfico de pH do segundo ensaio de potencial do doador de elétrons

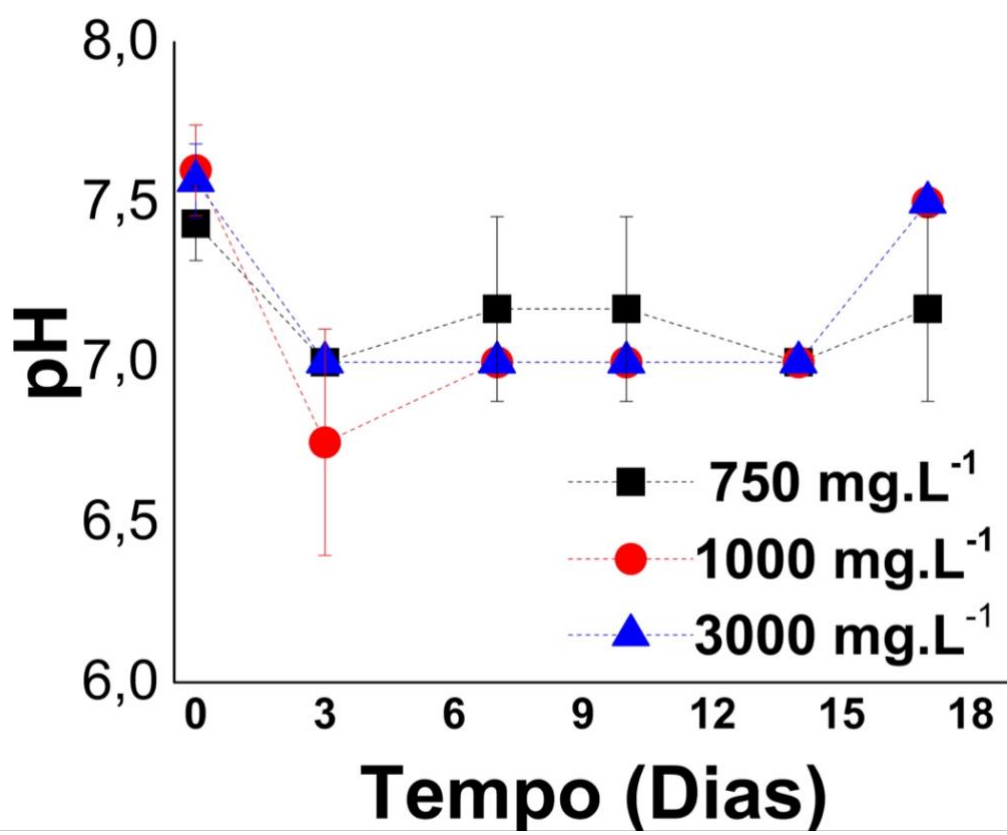


Figura 22: Gráfico de pH do ensaio de proporção do doador de elétrons

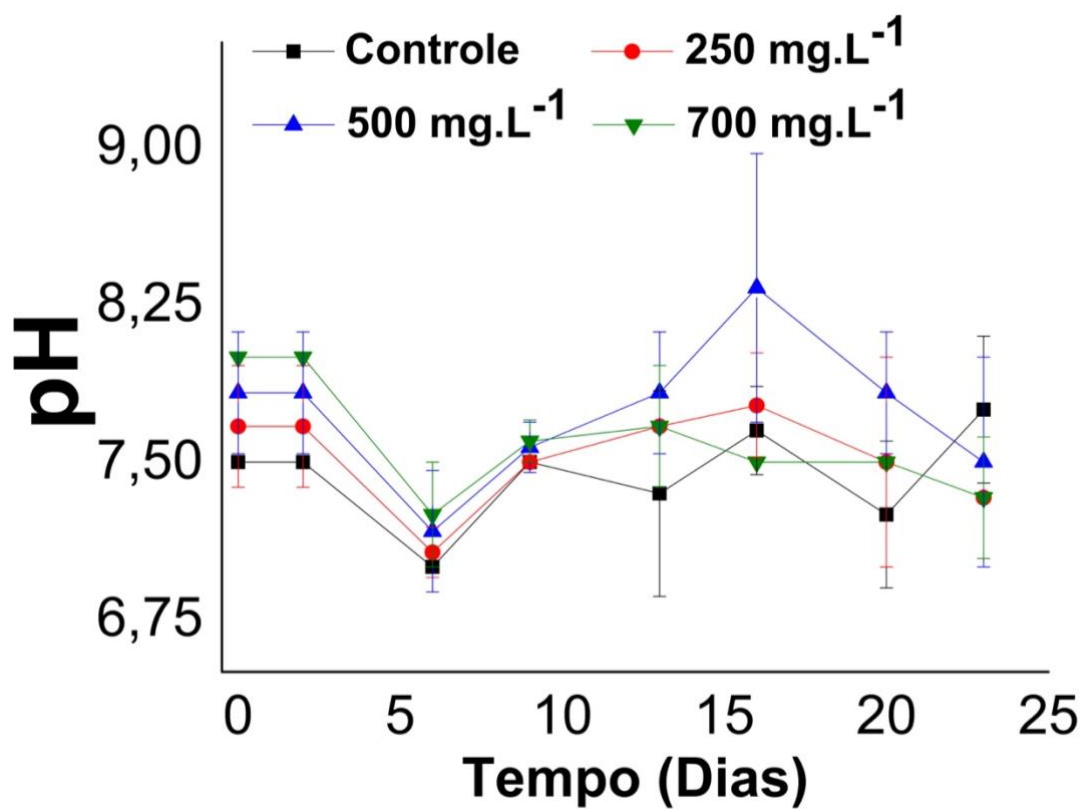


Figura 23: Gráfico de pH do ensaio de toxicidade do acúmulo de sulfeto