



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

“Remoção de sulfato e arsênio por ação de bactérias
redutoras de sulfato em meio ácido.”

Autora: Letícia Paiva de Matos

Orientadora: Prof. (a) Dr. (a) Mônica Cristina Teixeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel

Fevereiro – 2016

Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós Graduação em Engenharia
Ambiental

Letícia Paiva de Matos

“Remoção de sulfato e arsênio por ação de bactérias
redutoras de sulfato em meio ácido.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade
Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título: “Mestre em
Engenharia Ambiental” – Área de Concentração:
Tecnologias Ambientais.

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Mônica Cristina Teixeira

Co-Orientador: Prof.Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel

Ouro Preto, MG

Fevereiro – 2016

M433r Matos, Letícia Paiva de.
Remoção de sulfato e arsênio por ação de bactérias redutoras de sulfato em meio ácido [manuscrito] / Letícia Paiva de Matos. - 2016.
80f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina Teixeira.
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas. Engenharia Ambiental. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental.
Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Biorremediação. 2. Arsênio. 3. Bactérias. 4. Sulfatos. I. Teixeira, Mônica Cristina. II. Gurgel, Leandro Vinícius Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 628.35



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



Remoção de sulfato e arsênio por ação de bactérias redutoras de sulfato em meio ácido

Autora: Letícia Paiva de Matos

Dissertação defendida e aprovada, em 25 de fevereiro de 2016, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Professora Dr^a. Mônica Cristina Teixeira - Orientadora
Universidade Federal de Ouro Preto

Professor Dr. Leandro Vinicius Alves Gurgel - Co-orientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Professor Dr. Juraci Alves de Oliveira
Universidade Federal de Viçosa

Leonardo de Paiva Barbosa
Instituto Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho a minha mãe, Elainy.

Agradecimentos

Foram momentos de luta e muito trabalho. E finalmente chegou o momento de agradecer.

Em primeiro lugar a Deus, por ter me guiado e amparado.

À minha orientadora Mônica Teixeira. Obrigada, por ser acima de orientadora uma amiga, com quem eu pude contar em todos os momentos e também aprender tudo que sei sobre pesquisa.

À minha família, que mesmo às vezes sem entender perdoaram minha ausência. Mãe, Pai, Luis Paulo, Nicolly, Tia Eliete, Vó Lora e Vô Luís vocês são os pilares que me sustentam e fonte de todo amor que recebo a distância. Amo vocês, incondicionalmente. À minha família goiana, Maria Divina, Edilson e Camila, obrigada por todo suporte e carinho ao longo dessa caminhada. Ao meu companheiro, Pedro, por todo amor e paciência. Obrigada também pela elaboração dos diagramas que engrandeceram o trabalho.

Às amigas do Laboratório de Biotecnologia Ambiental, o meu muito obrigada por me ensinarem tanto. Keicilane Guedes, Mariana Moreira, Isadora Sampaio, Marina Dayrell e Alcyane Caldeira. Em especial, à Patrícia Costa, pela amizade e inúmeros conselhos mesmo estando distante e à Paula Gomes, minha amiga, pela dedicação e por ter sido fundamental na execução de todos os experimentos.

Às amigas da Farmácia, Bruna Piacesi, Carol Barcelos e Marianne Rocha, obrigada pelas boas energias enviadas. Às amigas que o Proamb me deu, Brittany Meighan e Marina Bahia. E a irmã que a vida me deu, Liliane Coelho, você foi um presente.

Aos mestres Dr. Leandro Gurgel, Dr^a. Sueli Bertolino e ao Dr. Leonardo de Paiva Barbosa, obrigada pelos ensinamentos e por sempre terem uma palavra amiga.

Ao Dr. Versiane Albis Leão e ao Laboratório de Bio&Hidrometalurgia da UFOP pela paciência com minhas amostras sempre complicadas.

Ao Ney Sampaio e Laboratório NanoLab, pela prontidão em atender nosso pedido e realizar as imagens que enriqueceram este trabalho.

As minhas casas, Rosa Xiclete e Notre Dame, sou feliz por ter vocês em minha vida. Em especial ao Diego Diniz pela ajuda com os gráficos.

Ao programa de Pós graduação em Engenharia Ambiental(PROAMB) por todo ensinamento, a CAPES pela bolsa de estudos concedida e a Escola de Farmácia/UFOP por ter me tornado uma farmacêutica apaixonada pela vida acadêmica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Geral.....	13
2.2. Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Arsênio.....	16
3.2. Métodos para remoção de Arsênio	20
3.3. Bactérias redutoras de sulfato	22
3.4. Imobilização por alginato de cálcio	29
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1. Amostra Microbiana	33
5.2. Enriquecimento das amostras e dosagem do teor de sulfato	33
5.3. Reagentes	35
5.4. Estudos para Remoção de Sulfato e Arsênio trivalente – Testes em Batelada	36
5.5. Imobilização de biomassa e células microbianas.....	37
5.6. Testes de adsorção – Estudo cinético	38
5.7. Montagem e operação dos biorreatores	38
5.8. Análises químicas	41
5.9. Preparação de material para Microscopia eletrônica de Varredura MEV/EDS.....	42
6. RESULTADOS	43
6.1. Enriquecimento das amostras e determinação dos teores de sulfato do meio	43
6.2. Remoção de Sulfato e Arsênio em diferentes condições – Testes em batelada ..	43
6.3. Eficiência do processo de imobilização de biomassa microbiana e biomassa residual.	53
6.4. Testes de adsorção.....	56
6.5. Cultivo semi-contínuo para remoção de Arsênio e Sulfato.....	56
7. CONCLUSÕES.....	69
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	71
8. PRODUÇÕES	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Diagrama Eh–pH do arsênio a 25 °C e 101.3 kPa.	18
Figura 3.2: Ciclo biogeoquímico do enxofre.....	23
Figura 3.3: Tratamento de efluentes por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).....	25
Figura 3.4: Esquema do processo de redução de sulfato e imobilização de zinco em sistema THIOPAQ® (Paques).....	27
Figura 3.5: Estrutura química do alginato de sódio: G-ácido gulurônico, M-ácido manurônico.	29
Figura 5.1: Fases de seleção do consórcio microbiano a diferentes condições.....	35
Figura 5.2: Reatores de bancada de leito fixo, construídos e mantidos em operação no Laboratório de Biotecnologia Ambiental.	39
Figura 6.1: Crescimento bacteriano evidenciado pelo escurecimento devido à formação de precipitado negro de FeS.	43
Figura 6.2: Remoção de sulfato e arsênio em meio ácido sob diferentes condições experimentais:(A) Meio Postgate B + Lac; (B) Meio Postgate B + Lac + BP; (C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L ⁻¹ ; (D) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L ⁻¹ + BP; (E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L ⁻¹ ; (F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L ⁻¹ + BP; (G) Meio Postgate B + Gli; (H) Meio Postgate B + Gli + BP; (I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L ⁻¹ ; (J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L ⁻¹ + BP; (K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L ⁻¹ ; (L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L ⁻¹ + BP; pH 5,5.	47
Figura 6.3: Alterações de pH observadas durante crescimento microbiano sob diferentes condições experimentais: (A) Meio Postgate B + Lac; (B) Meio Postgate B + Lac + BP; (C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L ⁻¹ ; (D) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L ⁻¹ + BP; (E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L ⁻¹ ; (F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L ⁻¹ + BP; (G) Meio Postgate B + Gli; (H) Meio Postgate B + Gli + BP; (I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L ⁻¹ ; (J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L ⁻¹ + BP; (K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L ⁻¹ ; (L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L ⁻¹ + BP; pH 5,5. (1) fonte de carbono: lactato; (2) fonte de carbono: glicerol.	51
Figura 6.4: Alterações de Eh observadas durante crescimento microbiano sob diferentes condições experimentais: (A) Meio Postgate B + Lac; (B) Meio Postgate B + Lac + BP; (C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L ⁻¹ ; (D) Meio Postgate B + Lac + As(III),	

4mg.L⁻¹+ BP; (E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹; (F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹+ BP; (G) Meio Postgate B + Gli; (H) Meio Postgate B + Gli + BP; (I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹; (J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹+ BP; (K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹; (L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹+ BP; pH 5,5. (1) fonte de carbono: lactato; (2) fonte de carbono: glicerol..... 53

Figura 6.5: Pérolas produzidas pela reação de uma suspensão de BP 2% (p/v) ou inóculo microbiano 2% (p/v) e alginato de sódio a 1% (p/v) com solução de cloreto de cálcio (0,2M). (A) pérolas contendo exclusivamente BP (B) pérolas contendo exclusivamente micro-organismos. 55

Figura 6.6: Variação de massa das esferas de alginato de cálcio contendo BRS e BP em diferentes condições experimentais: (1) pH 4,0; (2) pH 5,0; (3) pH 6,0; (4) pH 7,0; (5) As(III), 4mg.L⁻¹, pH 7,0 (6) As(III), 8 mg.L⁻¹, pH 7,0, T=30°C..... 55

Figura 6.7: Concentração de sulfato residual em reatores de fluxo ascendente em cultivo semi-contínuo. Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C..... 57

Figura 6.8: Concentração de arsênio residual. Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada ; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 59

Figura 6.9: Avaliação da variação do pH. Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada ; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 60

Figura 6.10: Avaliação da variação do potencial redox (Eh). Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 62

Figura 6.11: Análise de MEV/EDS de uma preparação laminar de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 1 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira). Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C..... 64

- Figura 6.12:** Análise de MEV/EDS de uma preparação laminar de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 2 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água destilada). Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 65
- Figura 6.13:** Análise de MEV/EDS de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 1 secas em estufa de secagem (35°C). Condições: fontes de sulfato, BP imobilizada, água de torneira, As(III), 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 66
- Figura 6.14:** Análise de MEV/EDS de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 2 secas em estufa de secagem (35°C). Condições: fontes de sulfato, BP imobilizada, água destilada, As(III), 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 66
- Figura 6.15:** Análise de MEV/EDS do resíduo formado no Reator 1 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira). Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C. 68
- Figura 6.16:** Análise de MEV/EDS do resíduo formado no Reator 2 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água destilada). Concentração de As inicial de 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C.68

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Composição do meio Postgate B.....	34
Tabela 5.2: Meios de cultura adicionados aos reatores em operação no Laboratório de Biotecnologia Ambiental.....	40
Tabela 6.1: Condições experimentais empregadas nos testes em batelada.	44
Tabela 6.2. Remoção de sulfato e arsênio (III) por BRS cultivadas em meio Postgate B com lactato como fonte de carbono, com e sem adição de biomassa proteica.....	48
Tabela 6.3. Remoção de sulfato e arsênio (III) por BRS cultivadas em meio Postgate B com glicerol como fonte de carbono, com e sem adição de biomassa proteica.	48

Resumo

A remoção de Arsênio (As) em efluentes industriais pode ser realizada por processos físico-químicos ou biológicos, os quais vem sendo bastantes estudados como alternativas eficientes e de menor custo. Este trabalho visa estudar a remoção de sulfato e As(III) por bactérias redutoras de sulfato (BRS) associadas a uma biomassa proteica (BP), resíduo comumente encontrado na indústria avícola. Neste trabalho a biomassa proteica foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio para diminuir possíveis perdas. Inicialmente, experimentos em batelada compararam a eficiência da remoção de SO_4^{2-} e As(III) com fontes de carbono distintas (lactato de sódio, glicerol e BP), em pH ácido (5,0), em duas concentrações de As(III) (4 e 8 mg.L^{-1}), com e sem a presença de BP. As condições de cultivo escolhidas foram utilizadas com o intuito de se diminuir os gastos com adequação do efluente e com a manutenção dos micro-organismos, visto que tanto o glicerol quanto a BP são subprodutos do agroindústria com pouco valor agregado. A remoção de SO_4^{2-} e As(III) também foi testada em escala semi-contínua em reatores de fluxo ascendente, por aproximadamente 150 dias, utilizando-se, em algumas situações, BP imobilizada e água de torneira para o preparo do meio. As esferas de BP da porção superior e os precipitados gerados na porção inferior dos reatores foram analisados por MEV/EDS, para caracterização dos produtos. Nos testes em batelada, as concentrações iniciais de sulfato decaíram ao final dos experimentos, independentemente da condição experimental empregada, atingindo-se uma remoção final de SO_4^{2-} entre 33-51%, ou 41-52%. empregando-se o lactato ou o glicerol como fonte de carbono, respectivamente. Na condição semi-contínua, obteve-se remoção de sulfato e As(III) de aproximadamente 74,8% e 80,0%, respectivamente. A maior remoção de As(III) alcançada foi de 6,89 mg.L^{-1} no reator com BP imobilizada, fonte de carbono glicerol e água destilada. A caracterização dos produtos sólidos por MEV/EDS comprovou que a biomassa imobilizada nas esferas de alginato adsorve o As. Simultaneamente, comprovou-se a participação das BRS no processo. A análise dos precipitados sólidos gerados nos reatores apontou a presença de compostos de As e enxofre, possivelmente sulfetos arsenicais, gerados a partir das reações do As(III) presente no efluente com o sulfeto biogênico gerado no processo biológico de redução de sulfato nas porções inferiores do reator. Dessa maneira, fica comprovada a eficiência do sistema aqui proposto. A cultura escolhida foi capaz de crescer em meio ácido, removendo sulfato, utilizando glicerol, BP e água de torneira como fontes de carbono e micronutrientes. A cultura de BRS foi capaz de remover sulfato e As(III) sem

necessidade de oxidação prévia do As(III) a As(V) tanto por precipitação na forma de sulfeto arsenical quanto por adsorção na biomassa imobilizada em alginato de cálcio.

Abstract

The removal of arsenic in industrial effluents can be achieved by physicochemical and biological processes which have been largely studied as an effective and economically feasible alternative. The purpose of this dissertation is to study the simultaneous removal of sulfate and As(III) ions by sulfate-reducing bacteria (SRB) growing in the presence of a protein biomass (BP) commonly produced by the poultry industry as a solid residue. In this study, both the microbial biomass and BP were immobilized into alginate calcium beads in order to reduce mass losses. Firstly, batch experiments were performed to compare the effectiveness of SO_4^{2-} and As(III) removal using different carbon sources (sodium lactate, glycerol and BP) at acid pH value (5,0). Two different arsenic concentrations were tested, 4 and 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of As(III) in the presence or absence of BP. These conditions were tested in order to reduce operational costs such as those necessary for conditioning the effluent pH and arsenic contents or the costs of adding carbon sources since glycerol and BP are low prices byproducts from the agroindustry. The removal of SO_4^{2-} and As(III) were also tested in 3 semi-continuous scaled upflow reactors for more than a hundred days. Some of the experimental conditions tested involved the use of calcium alginate immobilized BP/biomass and tap water to prepare the liquid media. Some BP/biomass beads and solid precipitates were collected from the reactors and analyzed by SEM-EDX to characterize the generated solid products. During the batch experiments, the sulfate concentration decreased despite the experimental conditions at final sulfate removal ranges of 33 to 51% or 41 to 52% when using lactate or glycerol as carbon sources, respectively. The semi-continuous condition reached a sulfate removal of about 74.8% and a As(III) removal of 80,0% . The major As(III) removal was ($6,89 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in the following experimental conditions: BP, glycerol as carbon source and distilled water. The solid products characterization by SEM/EDX give evidence that the protein biomass even immobilized in the alginate beads adsorbs arsenic ions and, the role of SRB participation in this process was also confirmed. The analysis of the solid precipitates indicated the presence of arsenic/sulfur compounds, possibly arsenic sulfides, generated by the reaction of As(III) with the biogenic sulfate which was biologically produced after the sulfate reducing at the reactor's bottom. The system effectiveness was testified. The chosen bacterial culture was able to grow in acid media, removing sulfate by using glycerol, BP and tap water as carbon and micronutrients sources. The BRS culture was capable to remove sulfate and As(III) without the prior

oxidation of As(III) to As(V) by two different mechanism: precipitation as arsenic sulfide or adsorption onto BP/biomass calcium alginate beads.

1. INTRODUÇÃO

As atividades mineradora e metalúrgica são consideradas principais focos de contaminação ambiental de águas por metais pesados e metaloides. Os efluentes gerados em etapas do processo de extração de minerais, por apresentarem baixo valor de pH, fazem com que os metais e metaloides presentes estejam mais solúveis tornando essa água imprópria para lançamento nos corpos hídricos. É de extrema importância que esses resíduos sejam tratados antes de serem descartados no meio ambiente já que grande parte deles são prejudiciais ao mesmo e também ao ser humano. Sendo assim, o estudo de metodologias eficazes, rápidas e de baixo custo para o tratamento destes efluentes vem ganhando um destaque nas pesquisas.

A presença de arsênio no meio ambiente é uma questão alarmante pois uma longa exposição a seus compostos através da água de consumo, pode conduzir a diversas patologias tais como: conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (BARRA et al., 2000).

Os tratamentos químicos, por serem de custo elevado e produzirem uma grande volume de sedimentos, estão sendo substituídos por tratamentos biológicos que vem se mostrando uma alternativa viável para esse tipo de remoção. O tratamento microbiológico pode ser realizado utilizando bactérias redutoras de sulfato (BRS). Estes organismos são capazes de reduzir o sulfato solúvel a sulfeto. O sulfeto, por sua vez, consegue se ligar a íons de alguns metais pesados, como ferro (Fe), cobre (Cu), manganês (Mn), cádmio (Cd) e até mesmo o metalóide arsênio (As), formando sulfetos insolúveis que se precipitam no meio.

Os doadores de elétrons que são oxidados pelas BRS são, usualmente, compostos orgânicos, como o lactato e etanol, no entanto este trabalho apresenta a utilização do glicerol, um subproduto da fabricação do biodiesel, pouco utilizado e com pequeno valor agregado. Também será testada a eficiência de uma biomassa proteica (BP), subproduto de indústrias avícolas, como doadora de carbonos, sendo que este material ainda apresenta a vantagem de, aliado ao seu conteúdo em carbono, ser eficiente como biossorvente específico para o arsênio trivalente, As (III). Em estudo já realizado com este material, foi identificada a existência de uma fração solúvel de carbono no BP, sugerindo a sua possível

utilização para o crescimento das BRS (COSTA et al., 2013). Foi, também, demonstrado que, como biossorvente, o pó de penas de galinha (um dos componentes da BP) é um material eficaz e seletivo na remoção de As(III), sendo que a adsorção ocorre quase imediatamente sem alteração significativa no pH (TEIXEIRA, 2004).

A escolha da BP foi motivada pela sua capacidade adsorvente de As(III) e, também, pelo fato de tratar-se de um material de baixo custo produzido em abundância pela indústria avícola. Na verdade trata-se de um dos principais resíduos sólidos resultantes desta atividade.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a remoção de sulfato e arsênio trivalente por consórcio microbiano de BRS em pH ácido.

2.2. Específicos

- Adaptar culturas de BRS ao cultivo em meio ácido e utilizando fontes de carbono alternativas;
- Verificar a remoção concomitante de sulfato e arsênio trivalente em pH ácido, em sistema batelada;
- Avaliar a utilização de material residual sólido rico em proteínas fibrosas (BP) como fonte de carbono pelas culturas de BRS, comprovando também suas propriedades adsorventes;
- Minimizar a perda de biomassa microbiana e biomassa adsorvente (biomassa proteica) no sistema por meio de sua imobilização;
- Definir as melhores condições operacionais visando à otimização do processo (pH, fonte de carbono e células imobilizadas) em sistema semí-contínuo;
- Comparar a eficiência da remoção de sulfato e arsênio pelas BRS utilizando como fontes de carbono Lactato e Glicerol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As águas residuais advindas das indústrias de mineração e metalurgia são consideradas como as principais fontes de contaminação ambiental por metais e metaloides como o arsênio – também encontrado em águas de minas auríferas. Além destas, níveis de arsênio relativamente altos são encontrados, ocasionalmente, em fontes de água de abastecimento municipais superficiais e subterrâneas, possivelmente devido à lixiviação de compostos associados aos depósitos minerais (BORBA et al., 2004).

A legislação Brasileira define padrões para se evitar a poluição dos recursos hídricos para que, assim, a qualidade dos corpos receptores seja garantida. Sabe-se que esta preocupação é relativamente recente e que, somente em 1934, com o primeiro decreto (Decreto 24.643, Código das Águas) as autoridades tentaram implantar algumas normas de proteção ambiental. Em 1960, com o primeiro decreto brasileiro (Decreto 49.974-A, Código Nacional de Saúde) a poluição passa a ser tratada de forma mais específica, estabelecendo-se algumas restrições e obrigações por parte das indústrias no sentido de um controle do lançamento de resíduos líquidos (SPERLING, 1998).

A legislação vigente é a resolução nº 430/2011 que complementa a resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2011) que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Para o As, especificamente, o limite permitido para descarte é de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e, para sulfato (SO_4^{2-}), o limite é de 250 mg.L^{-1} . Ainda, segundo as mesmas resoluções, o pH do efluente deve variar entre 5 e 9. Para águas doces, destinadas ao consumo humano ou outros fins, entretanto, o limite máximo de As permitido é de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

A legislação para o lançamento de efluentes líquidos, de modo a garantir a qualidade das águas de corpos receptores, é um instrumento essencial que direciona as estratégias de controle da poluição, a nível do poluidor e dos órgãos ambientais. No entanto, sabe-se que a implementação dessas leis é muito intrincada, pois de um lado existem as tendências mundiais para restrição dos padrões e, de outro lado, as pressões locais para um relaxamento na sua implementação (SPERLING, 1998).

Os estudos sobre contaminação ambiental por arsênio foram realizados, até o momento, em três áreas no Brasil: (i) na região chamada de Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, onde uma grande quantidade de arsênio foi liberada pelas drenagens, solos e atmosfera como resultado da mineração do ouro; (ii) o Vale do Ribeira, localizado entre os estados do Paraná e São Paulo, onde a liberação de arsênio para o ambiente ocorreu,

também, devido a atividade de mineração e refino de metais, e também, a partir do intemperismo de rochas e formação de solos ricos em As, e (iii) Santana, Amapá, onde o arsênio esteve associado ao minério de manganês que foi lavrado por mais de 50 anos na Serra do Navio. Outras fontes pontuais de poluição de foram identificadas em no Rio Itapicuru (BA), Crixás (GO) e Paracatu (MG), onde foram ou são lavrados minérios auríferos entretanto, as atividades de mineração nestas regiões não são tão antigas como em Minas Gerais (FIGUEIREDO et al., 2006).

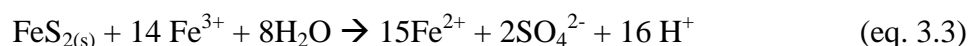
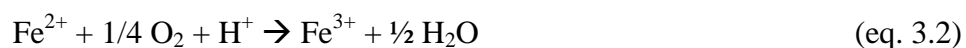
No Estado de Minas Gerais, mais especificamente na região denominada de Quadrilátero Ferrífero, está localizada a província aurífera mais importante do Brasil. Esta região responde por uma produção de ouro de cerca de 600 t nos últimos 300 anos. O minério de ouro pode conter arsênio em minerais como arsenopirita e lollingita ou como impureza na pirita (FIGUEIREDO et al., 2006). A extração de ouro que ocorre há séculos nesta região, é baseada no beneficiamento de vários minerais de ouro (incluindo a arsenopirita) por pirometalurgia, assim são gerados efluentes com pH baixo e contendo metaloide (arsênio) e metais pesados (cobre, zinco, cádmio, chumbo, níquel, cobalto, ferro, manganês), e sulfato, por vezes, em concentrações bem maiores do que as admitidas pela legislação vigente. A contribuição das atividades de mineração e metalurgia aos processos de liberação de As para o ambiente vem sendo estudada por vários pesquisadores (DESCHAMPS et al., 2002; BORBA et al., 2004).

DESCHAMPS et al., 2002, encontraram em solos de regiões em torno de sítios de mineração de ouro no Quadrilátero Ferrífero, valor médio de As de 100 mgkg^{-1} mesmo em áreas densamente povoadas. Estes valores provavelmente estão ligados com as estruturas geológicas, com depósitos de minério de hidrotermal e com a sua exploração ao longo dos anos (DESCHAMPS et al., 2002).

A arsenopirita é o mineral de arsênio de maior abundância e pode ocorrer associado a minerais de estanho, tungstênio, prata, cobre e ouro. O As também pode estar associado a sulfetos de chumbo, zinco e ferro: galena-PbS, esfalerita-ZnS e pirita-FeS₂, respectivamente. No solo, as concentrações de As podem estar na faixa de 0,1 até mais de 1000 ppm (TEIXEIRA, 2004).

O arsênio presente no solo pode ser solubilizado quando acontece a formação da drenagem ácida de minas (DAM), que é a solução aquosa ácida gerada quando minerais sulfetados presentes em resíduos de mineração são oxidados na presença de água,

formando um percolado que é rico em sulfato e metais pesados. A formação da DAM pode ser explicada pelas equações seguintes (COSTA, 2012; VON SPERLING, 2005):



Estes efluentes contêm altas concentrações de sulfato, e metais pesados e metaloides como o arsênio tratando-se de um dos mais graves problemas ambientais associados à atividade de mineração (TRINDADE & SOARES, 2004; MARTINS et al., 2009).

A solubilização do As a partir de solos naturalmente ricos neste elemento pode, também, ocorrer, sem a necessidade de ocorrência da DAM.

3.1. Arsênio

As propriedades físicas, químicas e biológicas de um elemento estão sempre associados com a forma química do mesmo presente no meio que esta sendo analisado. Desse modo, a determinação da concentração total de um elemento é uma informação dependente do seu comportamento no meio ambiente (BARRA et al., 2000). No caso do arsênio, o grau de contaminação depende da sua concentração, biodisponibilidade, pH do meio entre outros parâmetros.

O interesse da comunidade científica e da opinião pública sobre contaminação humana por arsênio vem crescendo após a divulgação das tragédias de Bengala Ocidental, Bangladesh, México e outros países do mundo (FIGUEIREDO et al., 2006). No Brasil, apesar de alguns estudos já publicados sobre contaminação em algumas províncias, a área ainda é carente de pesquisas.

O arsênio é um elemento natural de baixa concentração média na Crosta (1,8 ppm). Ocorre numa variedade de tipos de depósitos minerais, como na forma de arsenopirita (FeAsS) e piritas arseníferas. Essas fases minerais podem alterar-se a arsenatos e sulfoarsenatos em superfície, sendo o arsênio parcialmente liberado para as águas ou ainda imobilizado via adsorção em óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganês ou em minerais de argila. Seja qual for a sua origem, natural ou industrial, ele é muitas vezes o

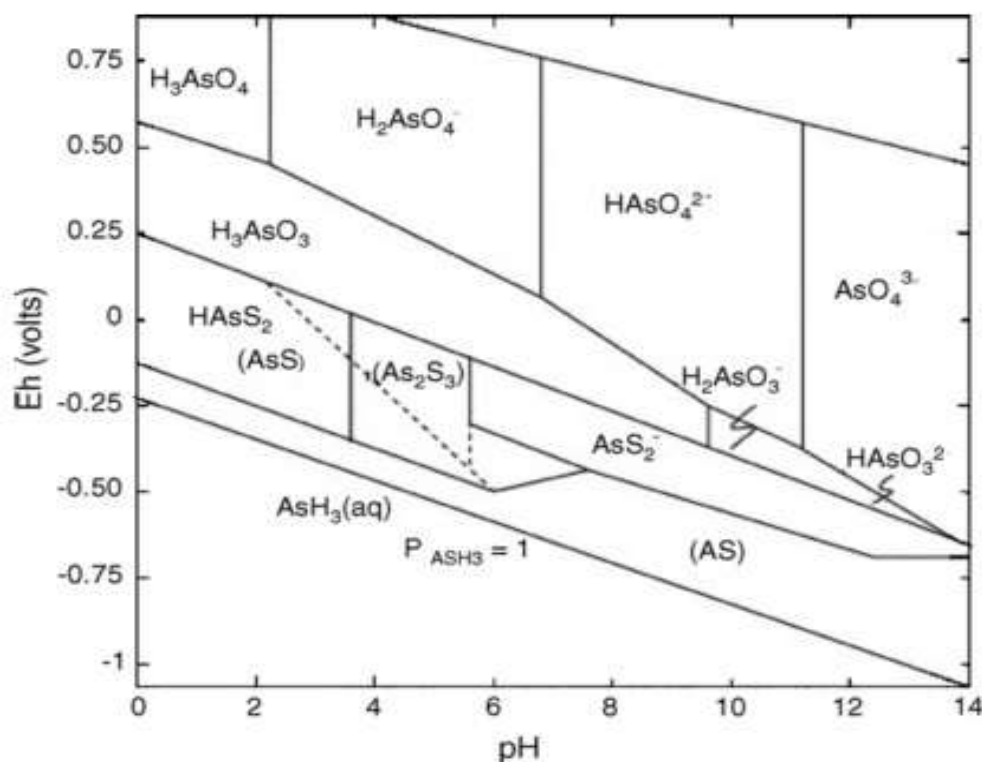
responsável pela contaminação de fontes de água (BARRA et al., 2000; LIÈVREMONT et al., 2009).

O arsênio é um elemento muito reativo que pode ser encontrado nos estados de oxidação -3, 0, +3 e +5. Em águas naturais, pode estar presente como espécies arsenito (AsO_3^{-3}) e arsenato (AsO_4^{-3}) referentes à dissolução de As(III) e As(V) respectivamente, sendo o primeiro mais tóxico do que o segundo (LIZAMA et al., 2011). Os estados de oxidação -3 e -1 se referem ao gás arsina (AsH_3), arsênio alquilico (RAsO(OH)_2 ou $\text{R}_2\text{AsO(OH)}$) (SULLIVAN et al., 2010).

Alguns compostos de arsênio podem ser altamente solúveis, resultando num elevado nível de biodisponibilidade. A toxicidade de suas diversas espécies decresce na seguinte ordem: compostos de As^{3+} inorgânico > compostos de As^{5+} inorgânico > compostos de As^{3+} orgânico > compostos de As^{5+} orgânico (USEPA, 2000).

O diagrama Eh-pH (**Figura 3.1**) apresenta as áreas nas quais as diversas espécies iônicas existentes são estáveis. As linhas inclinadas separam espécies em equilíbrios redox que se formam a partir de reações que dependem tanto do Eh quanto pH. As linhas horizontais equivalem às espécies em equilíbrios redox e depende do Eh do meio enquanto as linhas verticais separam espécies que estão em equilíbrio ácido-base, o que indica que são dependentes do pH do meio (LOPES, 2014).

Figura 3.1: Diagrama Eh–pH do arsênio a 25 °C e 101.3 kPa.



Fonte: WANG & MULLIGAN, 2006 *apud* MOHAN & PITTMAN, 2007.

A partir das informações apreendidas na figura 3.1 acima pode-se perceber que, em águas naturais, o arsênio encontra-se sob duas formas iônicas: As(III) e As(V), arsenito e arsenato, respectivamente. As formas pentavalentes do arsênio encontradas em meio aquoso são as espécies AsO_4^{3-} , $HAsO_4^{2-}$ e $H_2AsO_4^-$ enquanto as trivalentes incluem $As(OH)_3$, $As(OH)_4^-$, AsO_2OH^{2-} e AsO_3^{3-} . As espécies pentavalentes predominam e são estáveis em ambientes aeróbios enquanto as espécies trivalentes prevalecem em ambientes anaeróbios, redutores. A espécie $H_2AsO_4^-$ domina em pH baixo (inferior a pH 6,9) em condições oxidantes. Já em pH mais elevado, $HAsO_3^{2-}$ é a espécie dominante (H_3AsO_4 e AsO_4^{3-} podem estar presentes em fortes condições ácido ou base, respectivamente). As espécies de arsênio trivalentes (H_3AsO_3) apresentam-se neutras em uma ampla faixa de pH e Eh, sendo portanto menos reativas e mais estáveis.

Embora existam alguns relatos sobre sua utilização como agente terapêutico, que se deu entre o final do século XIX e meados do século XX (GONTIJO & BITTENCOURT, 2005) e que foi retomado agora mais recentemente no início do século XXI (MATHEWS et al., 2011) a história de arsênio em ciência, medicina e tecnologia tem sido ofuscada pela sua notoriedade como um veneno no número de homicídios, dado que

este é considerado sinônimo de toxicidade (MOHAN & PITTMAN, 2007). Portanto, é de se destacar que o monitoramento das concentrações de arsênio nas águas é de grande importância.

Em áreas onde o arsênio não está naturalmente presente em níveis elevados, peixes, mariscos, carnes, aves, produtos lácteos e cereais são as principais fontes de ingestão alimentar de arsênio embora em menor quantidade. A World Health Organization (WHO, 2010) prevê um limite de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (valor de referência provisória, tendo em conta incertezas científicas sobre o risco do elemento).

Concentrações arsenicais acima dos padrões aceitáveis para água potável foram detectados recentemente nos EUA, China, Chile, Bangladesh, Taiwan, México, Argentina, Polônia, Canadá, Hungria, Japão e Índia. São 21 países, de diferentes partes do mundo afetados pela contaminação das águas subterrâneas com arsênio, entretanto, o lugar com maior risco é Bangladesh, seguido da Bengala Ocidental, na Índia (MOHAN & PITTMAN, 2007; MALIK et al., 2009).

Em estudos anteriormente descritos, concentrações de As total de amostras de água obtidas em minas subterrâneas, poços artesianos e nascentes da região de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, variando entre 2 e $2980 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram encontradas, sendo que, na maioria das amostras, os valores foram superiores ao valor máximo permitido em água para consumo humano (BORBA et al., 2004). Como nos municípios de Ouro Preto e Mariana o abastecimento público é feito através da captação de água superficial, de nascentes, e sendo comum a utilização das águas subterrâneas provenientes de antigas minas de ouro, torna-se necessário uma avaliação a longo prazo dos efeitos dessa presença de contaminantes sobre a população, que utiliza essa água (BORBA et al., 2004).

Em se tratando de toxicidade, em geral, os compostos contendo arsênio (orgânicos ou inorgânicos), em contato com o organismo, são rapidamente convertidos em trióxido de arsênio, composto que reage com os grupos sulfidrila (-SH) das proteínas, inibindo a ação de enzimas que contenham estes grupamentos em seus sítios ativos, bloqueando a respiração celular (TSALEV & ZAPRIANOV, 1985).

As manifestações sistêmicas decorrentes da ingestão de arsênio mais frequentes são alterações cutâneas (hiperpigmentação, hiperqueratose), alterações circulatórias (arritmias cardíacas, hipotensão e falha congestiva no coração, problemas no sistema circulatório vascular levando à gangrena) e do sistema respiratório (fibrose), diabetes,

transtornos gastrointestinais (diarréia, hemorragias gastrintestinais) e neoplasias internas malignas (BORBA et al., 2004; GONTIJO & BITTENCOURT, 2005).

3.2. Métodos para remoção de arsênio

A contaminação por arsênio ocorre não só nas águas residuais industriais mas também nas águas destinadas ao consumo humano (TEIXEIRA, 2004). Em consequência, existe considerável interesse das indústrias metalúrgicas e de mineração em estudos sobre a imobilização do arsênio por rotas em que o elemento possa ser fixado com pouco risco de mobilização, como o processo no qual o As(V) é removido por precipitação hidrotérmica, na presença de Fe(III), formando um precipitado mais conhecido como escorodita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (SULLIVAN et al., 2010).

Este tipo de remoção de arsênio por precipitação com íons metálicos obtém os melhores resultados na precipitação com sais férricos na faixa de pH de 7,2-7,5.

No caso de águas advindas da mineração, o propósito dos tratamentos é sempre satisfazer um padrão de descarga de metais para níveis aceitáveis pela legislação. Muitas vezes esses tratamentos demandam gastos excessivos (LUO et al., 2008).

Há muito tempo a forma mais utilizada para a remoção de arsênio é a precipitação com cal na forma de arsenato de cálcio. Todavia, o arsenato de cálcio ($\text{Ca}(\text{AsO}_4)_2$) não é considerado apropriado para disposição de longo prazo devido à possibilidade de redissolução do arsênio nele contido através de reações de carbonatação (ZOUBOULIS et al., 1995; SULLIVAN et al., 2010).

Como alternativa aos métodos químicos, o processo de adsorção pode ser considerado uma boa alternativa a desestabilização das formas químicas geradas nestes processos a longo prazo. Vários tipos de adsorventes vem sendo estudados para imobilização do arsênio, dentre eles podemos citar a quitosana, melão, pó de penas de galinhas, dentre outros (TEIXEIRA, 2004; PANDEY et al., 2009; TECLU et al., 2009; NETO et al., 2013).

Em TECLU et al., 2009 a resposta obtida para o crescimento das BRS com a utilização do melão como fonte de carbono depende da concentração utilizada do substrato. No entanto, os resultados obtidos não foram tão satisfatórios como quando utilizado o lactato de sódio. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se As(V) (TECLU et al., 2009). Um adsorvente à base de quitosana, quitosana-Fe(III)-reticulado

(Ch-FeCL), foi desenvolvido usando Fe(III) imobilizado em esferas de quitosana. O comportamento de adsorção do As(III) e As(V) na Ch-FeCL foi avaliado em pH 7 e as máximas capacidades de adsorção estimadas pelo modelo de adsorção de Langmuir foram 21,24 e 27,59 mg.g⁻¹ para As(III) e As(V), respectivamente (NETO et al., 2013).

Todos os materiais descritos na literatura tem uma limitação quando se trata de adsorver o As(III), pois este é pouco adsorvido em ambientes onde o pH é ácido ou quase neutro (SULLIVAN et al., 2010). Sendo assim, é necessário promover a oxidação do arsenito a arsenato para se obter uma remoção mais eficiente do ânion, aumentando o custo do processo. A possibilidade de desenvolvimento de materiais capazes de adsorver ou precipitar o As(III) diretamente, sem uma etapa prévia de oxidação é interessante, visando a diminuição dos custos e o aumento da eficiência do processo.

Em seus estudos para desenvolvimento de uma metodologia alternativa para a remoção de arsênio, TEIXEIRA (2004) obteve resultados convincentes de imobilização de As(III) por meio de sua adsorção na superfície de biomassa proteica residual (pó de penas de galinha) contendo aminoácidos sulfidril. O complexo de adsorção obtido foi caracterizado por meio de Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Absorção de Raios-X e a ocorrência de um complexo de adsorção As/S na proporção 1:3 foi confirmada. Tal complexo possui estrutura muito semelhante à de sulfetos minerais tais como o realgar (AsS) e ouropigmento (As₂S₃), cuja baixa solubilidade é reconhecida.

As investigações demonstraram que o As(III) é especificamente adsorvido sobre a biomassa e, contrariamente ao comportamento observado com adsorventes inorgânicos, o pH ácido melhora a adsorção. A adsorção do arsênio atinge valores de até 270 µmol As(III) .g⁻¹ de biomassa (TEIXEIRA & CIMINELLI, 2005).

Embora o As seja altamente tóxico, alguns micro-organismos contem genes de resistência ao mesmo, o que lhes permite sobreviver em ambientes com níveis de arsênio que seriam tóxicos para a maioria dos seres (LIAO et al., 2011). Assim sendo, diversos estudos tem sido desenvolvidos com enfoque na utilização destes micro-organismos, resistentes ao metaloide, para tratamento de águas residuárias e solos contaminados com arsênio e outros mais contaminantes, como o sulfato (TECLU et al., 2008; COSTA, 2012; MATOS, et al., 2013).

TECLU et al., (2008) utilizando um consórcio microbiano de BRS, em meio contendo como fonte de carbono o lactato de sódio, obteve uma remoção de 77 e 55% de As(V) e As(III), respectivamente, em pH 6,9 enquanto VIGGI et al., 2010, utilizando

também este grupo de bactérias em pH 7,8 e a mesma fonte de carbono acima, obteve remoção de arsênio de aproximadamente 98%.

Encontram-se, ainda, na literatura, relatos da utilização de pó de penas de galinha comercial como substrato orgânico para o crescimento das BRS, observando-se que, na presença de lactato de sódio, a remoção de As(III) é 38%, enquanto juntamente com a biomassa este valor chega a 80% (COSTA et al., 2013).

Todos estes estudos nascem da necessidade de uma busca constante de métodos economicamente viáveis para remoção de arsênio e metais pesados. Assim, os resultados já obtidos com as BRS tornam-se uma alternativa de remoção do metaloide na forma de seus sulfetos insolúveis, ouropigmento (As_2S_3) e realgar (As_4S_4).

3.3. Bactérias redutoras de sulfato

Os micro-organismos desempenham um importante papel no ciclo químico de vários elementos como Enxofre, Nitrogênio, Carbono e Ferro. O enxofre possui três estados de oxidação (-2, 0 e +6) e agentes biológicos ou químicos são responsáveis pelas suas transformações (oxidação ou redução) (TANG et al., 2009), que encontram-se esquematicamente representadas na **Figura 3.2**.

Figura 3.2: Ciclo biogeoquímico do enxofre.



Fonte: Extraído de COSTA, 2012

O ciclo do enxofre, acima representado, possui reações de oxidação e redução. O sulfato pode atuar como acceptor de elétrons, e assim, ser reduzido a sulfeto por diversos tipos de micro-organismos, como as bactérias redutoras de sulfato. Por sua vez, o sulfeto pode sofrer oxidação biológica sendo convertido a compostos de enxofre elementar ou sulfato (TANG et al., 2009).

O grupo de BRS compreende uma série de gêneros, sendo mais citado o *Dessulfovibrio* (CASTRO & MOORE, 2000). Eles estão presentes, geralmente, em habitats anóxicos, tendo um papel importante nos ciclos de enxofre e carbono (MUYZER & STAMS, 2008). Nos ambientes aquáticos, mais especificamente na região bentônica (extrato mais profundo) ocorre a redução de sulfato, onde produtos da degradação da matéria orgânica, como por exemplo o acetato (CH₃COO⁻), são utilizados como doadores de elétrons e fonte de carbono, em condições anaeróbias (dessulfatação).

As BRS pertencem a um grupo de micro-organismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos que, sob condições adequadas de presença de nutrientes e sulfato, podem reduzir biologicamente este íon a gás sulfídrico e produzir íons bicarbonato. O sulfeto gerado (gás sulfídrico), por sua vez, pode ser complexado com metais gerando sulfetos

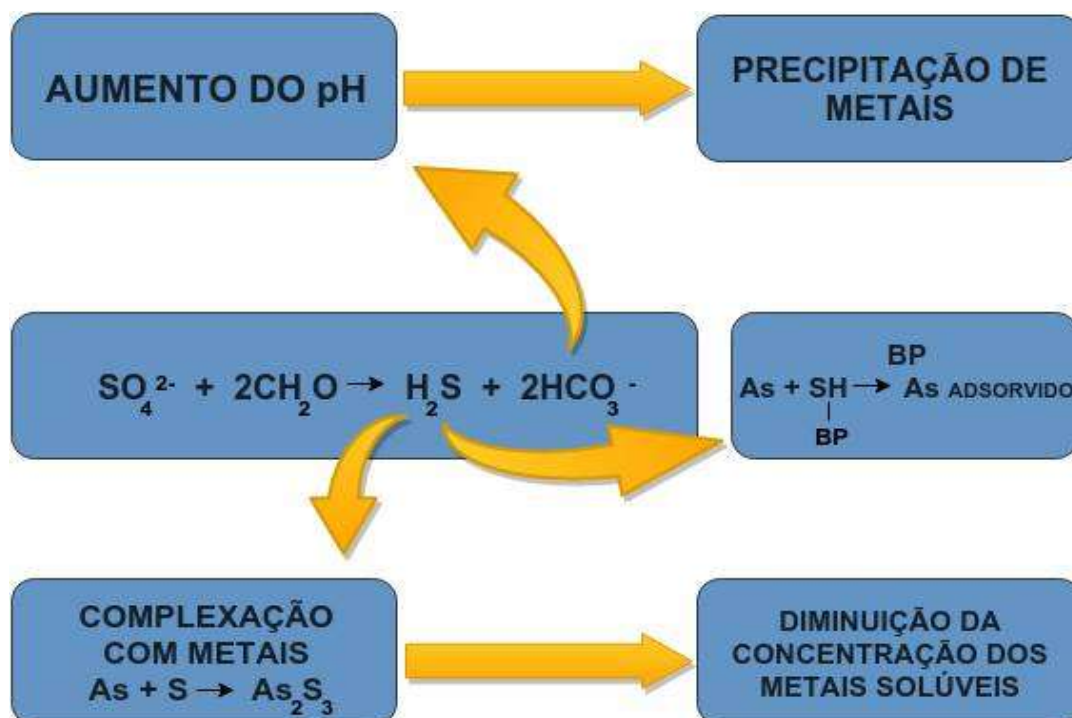
metálicos, enquanto os íons bicarbonato, que são responsáveis pela alcalinização do meio, também podem contribuir para a precipitação de metais na forma de seus carbonatos. É importante salientar que a eficácia da remoção depende, principalmente, da fonte de carbono escolhida (GIBSON, 1990; MUYZER & STAMS, 2008; BARBOSA, 2009; TECLU et al., 2009; TANG et al., 2009)

O sulfeto pode ser produzido por micro-organismos anaeróbios como um resultado da quebra de proteínas e também uma maior degradação dos aminoácidos ou pela redução direta de sulfato pelas BRS. A redução pode ocorrer pelas vias assimilativas ou dissimilativas. A via de assimilação gera compostos reduzidos de enxofre pela biossíntese de proteínas e aminoácidos e não leva à excreção direta de sulfeto, por outro lado, na via dissimilativa o sulfato é reduzido para sulfeto inorgânico por BRS, podendo colaborar para a remoção de arsênio, precipitando-o como sulfeto de arsênio (TECLU et al., 2009; TANG et al., 2009). O sinergismo dos ciclos do enxofre e do carbono disponibiliza os recursos essenciais para o metabolismo celular de BRS (BARBOSA, 2009).

A formação da drenagem ácida de minas (DAM) e seu lançamento em águas naturais têm sérios impactos ambientais. O teor de sulfato e metais dissolvidos nesse tipo de efluente contribui para o aumento dos sólidos totais dissolvidos das águas receptoras (TANG et al., 2009). O tratamento biológico com bactérias redutoras de sulfato tem sido considerado como uma das alternativas mais promissoras para a descontaminação de efluentes contaminados com metais e metaloides (MARTINS et al., 2009).

Efluentes ácidos contendo metais e sulfato podem ser tratados com este tipo de micro-organismo. Trata-se, em um primeiro momento, da conversão de sulfato a sulfeto pela atividade das BRS, levando a uma elevação de pH, resultando na precipitação de metais na forma de seus respectivos sulfetos. Na ausência de íons metálicos suficientes, agentes oxidantes são usados para converter o sulfeto remanescente em enxofre elementar. O tratamento biológico destes efluentes oferece várias vantagens, incluindo a remoção permanente de enxofre e metais, produção de água potável e possibilidade para a recuperação de metais de valor.

Figura 3.3: Tratamento de efluentes com Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).



Fonte: Próprio autor

A figura acima (**Figura 3.3**) apresenta a reação de redução biológica do sulfato pelas BRS considerando-se ainda a adição de biomassa residual proteica (BP) ao sistema. Como já dito anteriormente, durante seu metabolismo este grupo de bactérias transforma o sulfato em sulfeto e produz carbonato no meio. O carbonato é responsável pelo aumento do pH no meio e consequente precipitação dos metais disponíveis. Já o sulfeto, por sua vez, pode complexar com os metais, produzindo os sulfetos metálicos ou reduzir a biomassa proteica, deixando-a disponível para complexação com os metais ou metaloides.

O interesse na utilização de biorreatores com inoculados com bactérias redutoras de sulfato cresceu muito nas últimas décadas como um método alternativo para remediação de efluentes contaminados com arsênio e selênio. Algumas bactérias anaeróbias que não são, necessariamente, bactérias redutoras de sulfato, como *Pseudomonas* e *Clostridium*, também podem ser utilizadas (LUO et al., 2008).

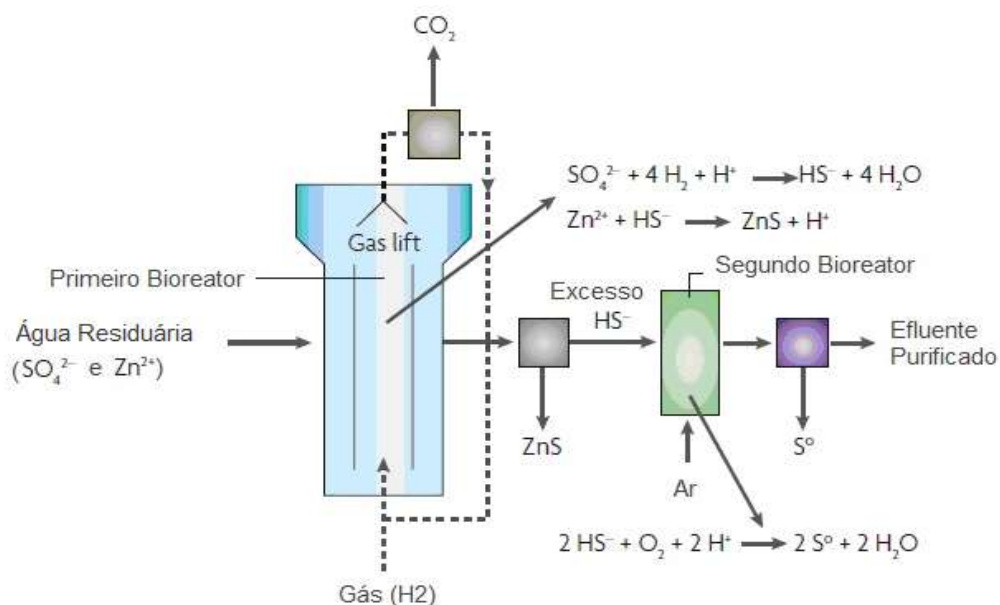
As fontes de carbono preferidas para as bactérias destes referidos grupos são os ácidos orgânicos ou seus sais, tais como lactato, piruvato e malato, e álcoois, tais como etanol, propanol e butanol. No entanto, a oxidação destes substratos é incompleta (GIBSON, 1990), resultando na distinção de dois grupos fisiológicos (não sistemáticos): os

oxidantes completos e incompletos. O primeiro grupo é capaz de mineralizar os compostos até CO_2 , enquanto o segundo converte a matéria orgânica somente até acetato (COSTA, 2012).

O glicerol, um poliálcool, também é uma alternativa válida como substrato para o crescimento microbiano apresentando as seguintes vantagens: (i) é um produto relativamente barato, (ii) encontra-se prontamente disponível e (iii) é produzido em larga escala, como um subproduto durante a produção de sabão e outros detergentes, bem como durante a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (DINKEL et al., 2010). Embora a redução do sulfato seja energeticamente mais favorável a partir da oxidação do lactato, alguns autores descreveram que o glicerol produziu resultados satisfatórios, sendo selecionado como uma alternativa de baixo custo, quando comparado ao lactato (BERTOLINO et al., 2014).

A **Figura 3.4** apresenta o sistema THIOPAQ[®] (Paques), um sistema comercialmente disponível que utiliza micro-organismos redutores de sulfato para promover a redução de sulfato a sulfeto visando a remoção de Zn. A redução de sulfato é feita em um Reator do tipo Gás-lift, o gás presente no reator, contém 76% de H_2 , o qual é utilizado como doador de elétrons. O sulfeto de zinco que é precipitado com a biomassa é reutilizado, pois mais de 95% de peso seco do lodo presente no reator é composto de sulfeto de zinco (MUYZER; STAMS, 2008).

Figura 3.4: Esquema do processo de redução de sulfato e imobilização de zinco em sistema THIOPAQ® (Paques).



Fonte: Extraído de COSTA,2012

A redução de sulfato pode ser benéficamente aplicada à biotecnologia para a remoção de metais pesados presentes tanto em águas subterrâneas quanto águas residuais, devido ao fato de o sulfeto metálico, produzido pelo metabolismo desses micro-organismos, ser capaz de se ligar à cátions metálicos (MUYZER; STAMS, 2008; COSTA, 2012).

Como a DAM e os efluentes da indústria minero-metalúrgicas são geralmente deficientes em fontes de carbono, a adição de uma fonte de carbono externa é necessária para alcançar a redução de sulfato. Portanto, a escolha da fonte de carbono para BRS pode ser o ponto-chave para garantir alto desempenho, a eficiência de longo prazo e viabilidade econômica do tratamento (COSTA et al., 2009).

No que tange os micro-organismos redutores de sulfato, as condições favoráveis para o crescimento são: condições moderadamente alcalinas (pH 7,0 – 7,8), temperaturas medianas para garantir a sua mesofilia (28 – 38°C) e ambientes redutores, cujos valores de Eh se encontrem na faixa de -150 a -300 mV (MADIGAN *apud* COSTA, 2012). Para o seu crescimento podem ser utilizadas diversas fontes de carbono simples (lactato, etanol, glicerol) ou complexas (esgoto, lamas, melão, estrume, pó de penas de

galinha)(ANDRIANISA et al., 2008; TECLU et al., 2009; COSTA et al., 2014). A escolha da fonte de carbono a ser utilizada possui um efeito extremamente importante para a eficiência e viabilidade econômica de todos os processos de biorremediação baseados na utilização destas bactérias (MARTINS et al., 2009). A natureza do substrato define a taxa de redução do sulfato e, portanto, o rendimento da reação (DINKEL et al., 2010).

Para a avaliação do crescimento dos micro-organismos, uma das ferramentas mais utilizadas é a observação de sua capacidade de produzir precipitados negros em meios contendo íons ferrosos (GIBSON, 1990). No que se refere a eficiência da remoção de sulfato, um parâmetro que deve ser controlado é a demanda química por oxigênio em relação ao sulfato presente no meio (DQO/SO_4^{2-}) (VELASCO et al., 2008). A concentração do substrato orgânico (lactato ou glicerol) também pode ser representada pela DQO, definida como a quantidade de oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica biodegradável, ou seja, avalia a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) em $mg.L^{-1}$ de O_2 que será consumido para degradação completa de matéria orgânica a CO_2 (BARBOSA, 2009). Segundo resultados relatados por COSTA, 2012, o melhor crescimento microbiano foi obtido com a maior relação DQO/SO_4^{2-} (razão 3,0). A importância da relação DQO/SO_4^{2-} para o cultivo de BRS pode ser determinante, pois estudos já demonstraram que esta relação, ao ser alterada, acarreta em uma modificação na densidade das células, principalmente de culturas mistas (VELASCO et al., 2008; CHOU et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; COSTA, 2012).

Nos métodos de tratamento convencionais, onde o sulfato é tratado por neutralização com cal (TANG et al., 2009), há exigência da adição de reagentes, o que aumenta os custos do tratamento. Como vantagem, a precipitação biológica com sulfetos possui possibilidade de utilizar o precipitado metálico ao final do processo (DINKEL et al., 2010).

Reatores para tratamento concomitante de sulfato, metais e metaloides tem sido estudados a fim de encontrar uma metodologia rápida, eficaz e de baixo custo para tratamento de águas residuais poluídas com estes contaminantes (LUO et al., 2008; GHAZY et al., 2011; LATIF et al., 2011; BERTOLINO, 2012; COSTA, 2012). No entanto, diversos entraves são encontrados, como por exemplo, a perda de biomassa ao longo do processo, diminuindo assim a eficiência do reator (COSTA, 2012).

A imobilização de materiais sólidos e de baixo custo, bem como micro-organismos e biocatalisadores vem sendo explorados para utilização nos processos de

biossorção e adsorção de corantes de efluentes, remoção de sulfato, dentre outros contaminantes (GIESE, 2015). Assim, torna-se necessário desenvolver metodologias eficazes para corrigir possíveis problemas advindos de perda de biomassa em reatores de fluxo contínuo ou semi-contínuo.

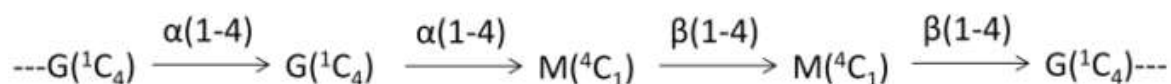
3.4. Imobilização por alginato de cálcio

A encapsulação é uma das técnicas mais importantes de imobilização de células, sendo responsável pela segregação das células frente ao meio que está presente, promovendo o melhor potencial biotecnológico do uso dos micro-organismos, melhorando a seleção das células ao meio de cultivo e proporcionando o uso de maiores densidades celulares no processo realizado (GUO et al., 2006; GIESE, 2015). O aprimoramento de novas técnicas para imobilização celular faz com que seja possível a utilização de células microbianas que possivelmente não seriam utilizadas com eficiência estando livres no meio (COVIZZI et al., 2007).

Em se tratando métodos para imobilização, as microcápsulas de alginato de cálcio representam um dos carreadores mais usados mundialmente na imobilização de enzimas e proteínas, bem como de drogas de liberação controlada (CULPI et al., 2010).

O alginato é naturalmente derivado de um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo β - (1→4) (Unidade M) e, também, por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo α -(1→4) (Unidade G), derivados de algas marrons como a *Laminaria digitata* e *L. hyperboria* (GUO et al., 2006; CULPI et al., 2010).

Figura 3.5: Estrutura química do alginato de sódio: G-ácido gulurônico, M-ácido manurônico.



Fonte: (GIESE, 2015)

Por apresentar a capacidade de geleificar e espessar soluções, esta substância possui grande importância comercial. Podendo ser utilizado como suporte para

imobilização celular e enzimática, possibilitando o uso de células vivas ou inativadas em biorreatores, bem como filmes bioativos, para proporcionar um melhoramento das propriedades de pasta, modificando as características reológicas e a textura do material, retardando a degradação e capacidade de hidratação do amido (MÜLLER et al., 2011).

O processo de formação das esferas de alginato de cálcio ocorre através de uma reação denominada gelificação iônica. Uma suspensão enriquecida de células microbianas dispersas em solução de alginato de sódio é gotejada em uma solução iônica de concentração adequada, geralmente CaCl_2 , podendo-se obter níveis variáveis de encapsulamento (GIESE, 2015). Dentre os diversos métodos de produção de microcápsulas este é o processo mais simples e de baixo custo, sendo reproduzível e rápido. A otimização da técnica através de medidas simples de controle experimentais mostraram-se importantes na melhora e desenvolvimento das microcápsulas (CULPI et al., 2010).

Dentre as limitações da utilização do uso do alginato, destaca-se a baixa estabilidade destes géis com elementos presentes no meio, como íons fosfato e citrato, que podem ser responsáveis pela ruptura e dissolução das esferas. Entretanto, este problema pode ser corrigido com a utilização dos sais de bário ou tratamento com quitosana (GIESE, 2015).

O uso de biorreatores operados na presença de células microbianas imobilizadas em gel de alginato de cálcio tem sido descrito na literatura em processos fermentativos de produção de antibióticos, ácidos, edulcorantes, bebidas fermentadas, enzimas, polissacarídeos, entre outros (GIESE, 2015).

O trabalho aqui proposto visa a otimização dos parâmetros utilizados por COSTA, 2012 em um reator de fluxo semi-contínuo empregado para a remoção de arsênio. Objetiva-se inocular os novos reatores com células de bactérias redutoras de sulfato e biomassa protéica (BP) advinda da indústria avícola imobilizadas em pérolas de alginato de cálcio .

4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O trabalho exposto se assemelha a um projeto previamente desenvolvido em nosso grupo de pesquisa (COSTA, 2012). Ao final daquele projeto, entretanto, muitos questionamentos surgiram justificando a realização do projeto aqui proposto. Tal reator demandava paradas constantes para manutenção devido a problemas operacionais, principalmente relativos à perda de massa microbiana.

Alguns pontos importantes a ser esclarecidos ou solucionados a partir do trabalho de Costa (2012) eram:

- Seleção do consórcio microbiano ao cultivo em pH ácido;
- Utilização de fontes de carbono alternativas;
- Otimização dos parâmetros operacionais do reator;
- Diminuição da perda de biomassa no reator.

Este processo de biorremediação aqui proposto visa à diminuição dos gastos com alcalinização do efluente, já que as bactérias serão selecionadas a meio ácido e será testado uma fonte de carbono alternativa de um material residual da indústria avícola e um subproduto da produção de biodiesel sem grande valor comercial.

Ao fim deste trabalho, espera-se responder a todas estas perguntas e apresentar uma metodologia completa, eficaz, rápida e de baixo custo para utilização na descontaminação de efluentes contaminados com sulfato e arsênio.

Devido a relevância da remoção de arsênio nos dias atuais, torna-se muito importante o desenvolvimento de novas técnicas de alto rendimento e baixo custo. Neste contexto, encontramos diversos estudos sobre a utilização das bactérias redutoras de sulfato (BRS) visando obter a remoção do arsênio na forma de seus sulfetos insolúveis: condições ácidas redutoras favorecem a precipitação do ouropigmento (As_2S_3), do realgar (As_4S_4) ou outros sulfetos minerais contendo arsênio co-precipitado. Este processo requer uma fonte de sulfato. Em zonas onde há tratamento de drenagem ácida de minas, o sulfato está geralmente disponível devido à exposição de minerais sulfetados contendo a água e oxigênio, o que resulta na geração de sulfato. Não estando disponível, a precipitação do arsênio será limitada para a formação de outros minerais em vez de minerais de sulfetados (LIZAMA A et al., 2011).

Assim, entender os processos metabólicos deste grupo de bactérias realizados para que sua atividade metabólica não seja prejudicada no ambiente em que está alocada é de

suma importância quando se trata de sua utilização em processos biotecnológicos. Sendo assim, os resultados obtidos em escala laboratorial são considerados para aplicação em escala real.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra Microbiana

Uma porção de sedimento foi coletada da margem da Lagoa do Gambá, em Ouro Preto-MG, a fim de obter um consórcio microbiano a ser utilizado nos ensaios. Os procedimentos de coleta e enriquecimento microbiano foram descritos previamente por COSTA, 2012.

A cultura microbiana foi mantida no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UFOP por meio de repiques periódicos em meio líquido Postgate B, cuja composição está descrita na tabela 5.1. Este consórcio microbiano, após a seleção às condições de cultivo no laboratório de Biotecnologia Ambiental, foi parcialmente identificado por meio do emprego de técnicas de biologia molecular baseadas na análise do perfil das amostras submetidas à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*) (MOREIRA, 2013).

5.2. Enriquecimento das amostras e dosagem do teor de sulfato

O consórcio microbiano de BRS foi mantida por meio de repiques em meio líquido Postgate B, acrescido de uma fonte de carbono escolhida (**Tabela 5.1**). O meio de cultura foi preparado pesando-se seus componentes em balança analítica. Os sais foram dissolvidos em água destilada e, após a dissolução, a mistura foi acrescida de pó de penas de galinha 2% (p/v), lactato de sódio ($5,6 \text{ g.L}^{-1}$) e/ou glicerol ($6,7 \text{ g.L}^{-1}$) como fonte de carbono exclusiva ou em combinação.

Tabela 5.1: Composição do meio Postgate B.

Componente	Quantidades (g.L ⁻¹)
Sulfato de Cálcio (CaSO ₄)	1,26
Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	0,5
Cloreto de Amônio (NH ₄ Cl)	1,0
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2,0
Extrato de levedura	1,0
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,5
Tioglicolato de Sódio	0,5
Ácido Ascórbico	0,1
Glicerol	6,7
Lactato	7,0

Alíquotas de 5mL do inóculo (10% v/v) foram adicionados a 45mL de meio líquido contidos em frascos de vidro tipo penicilina com capacidade para 50mL, previamente esterilizados por calor úmido em autoclave (120°C; 1,5atm; 20min). Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e anel de alumínio e incubados em estufa microbiológica, a 35°C, até a detecção do crescimento das culturas, evidenciado pela presença de precipitado negro, resultante da reação entre o sulfato ferroso e o sulfeto produzido biologicamente.

A **Figura 5.1**, descreve de forma objetiva todas as etapas no processo de seleção da cultura. A primeira fase dos cultivos - fase de seleção das culturas ao meio Postgate B (POSTGATE, 1973) foi executada utilizando-se apenas o lactato como fonte de carbono em pH neutro. Nas seguintes fases, a utilização do lactato como fonte de carbono foi reduzida enquanto a concentração do glicerol foi acrescida (Tabela 5.1) . O valor de pH do meio de cultura também foi alterado pela acidificação até pH 5,0 com a adição de solução de HCl de 0,2 mol/L.

Em todo o processo os repiques foram executados com e sem adição da biomassa proteica. Ao final do processo, ao ser identificado o crescimento microbiano (decorridos aproximadamente 10 dias após a inoculação), sucessivos repiques foram realizados com

concentrações crescentes de arsênio trivalente ($0-8 \text{ mg.L}^{-1}$) para seleção da cultura ao elemento.

Figura 5.1: Fases de seleção do consórcio microbiano a diferentes condições.



Fonte: Próprio autor.

5.3. Reagentes

Biomassa Proteica - Uma biomassa proteica composta por pó de penas de galinhas e vísceras, comercialmente disponível, geralmente descartada em indústrias avícolas foi utilizada com intuito de promover a remoção de As e ainda colaborar para o crescimento microbiano.

A biomassa proteica (BP) é uma mistura de penas e vísceras trituradas, acrescida de sangue cozido. É constituído basicamente por proteínas estruturais e insolúveis, principalmente queratina, com seu teor bruto de proteínas em torno de 80%, sendo que os teores de aminoácidos contendo grupamentos sulfeto em sua estrutura é de aproximadamente 0,67 e 3,68%, para metionina e cisteína, respectivamente (SCAPIM et al., 2003; COSTA, 2012). Para ser empregada nos experimentos, as amostras foram padronizadas, segundo sua granulometria, sendo peineirada em tamizes para separação

quanto à distribuição granulométrica. A porção utilizada foi a com granulometria inferior a 0,71mm. Esta fração foi escolhida e utilizada em todos os repiques e experimentos.

Arsênio trivalente - Uma solução estoque foi preparada utilizando NaAsO_2 , sendo a concentração de As(III) de 1000mg.L^{-1} . Depois de autoclavada, a solução foi mantida estéril e acondicionada em geladeira para posterior utilização.

Reagentes de uso geral – Foram empregados reagentes de grau de pureza analítica para todos os experimentos.

5.4. Estudos para Remoção de Sulfato e Arsênio trivalente – Testes em Batelada

Após a seleção das culturas às condições descritas anteriormente, as amostras foram empregadas em experimentos para a remoção de sulfato e As utilizando lactato na razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 2,5, com pH do meio ajustado para 5.0.

As condições experimentais empregadas foram:

- A) Meio Postgate B + Lactato de sódio (Lac)
- B) Meio Postgate B + Lac + BP (Biomassa residual)
- C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L^{-1}
- D) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L^{-1} + BP
- E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L^{-1}
- F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L^{-1} + BP

Os experimentos foram repetidos nas mesmas condições, somente havendo a troca da fonte de carbono de lactato para glicerol, razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ 3,0. Assim denominados:

- G) Meio Postgate B + Glicerol (Gli)
- H) Meio Postgate B + Gli + BP
- I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L^{-1}
- J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L^{-1} + BP
- K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L^{-1}
- L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L^{-1} + BP

Em ambos os ensaios foram utilizados frascos com volume útil de 600 mL contendo 473mL de meio de cultura Postgate B modificado (pH 5,0), previamente autoclavado (120°C ; 1,0atm; 20min), 25 mL de inóculo; 2,4 mL de solução estoque contendo As(III), para os meios com 4mg.L^{-1} e 4,8 mL para aqueles cuja concentração

final de arsênio seria 8mg.L^{-1} e concentrações 2% de biomassa proteica. Um frasco contendo o mesmo volume de meio de cultura (com $7,0\text{mL.L}^{-1}$ de lactato), solução estoque de As(III), 2% de pó de penas (p/v), sem adição de inóculo, foi utilizado para fins comparativos como controle. Os frascos foram lacrados com tampa de borracha. No tempo de cultivo (15 dias), alíquotas de 2 mL eram retiradas a cada 24h para realização das análises de concentração de sulfato. O pH, Eh, e concentração de As(III) foram realizadas apenas no início e fim dos experimentos. As análises químicas serão descritas detalhadamente no item 5.8.

Em todos os frascos, antes de serem lacrados, a dissolução de oxigênio foi inibida pela adição de 10 mL de parafina líquida (MARTINS et al., 2009).

Os parâmetros: remoção de sulfato e remoção de arsênio foram avaliados por análise de variância (ANAVA) usando o programa SISVAR versão 4.3 (Ferreira, 2011), seguido do teste de Scott-Knott para agrupamento de médias (Scott e Knott, 1974), com 5% de significância.

5.5. Imobilização de biomassa e células microbianas

Foram produzidas pérolas de alginato de cálcio contendo biomassa residual (BP) ou biomassa microbiana (BRS) por processo sol-gel (GIESE, 2015).

No estudo de imobilização da biomassa residual (BP), o material previamente peneirado foi utilizado. Uma suspensão foi preparada com a biomassa selecionada (2% p/v) e alginato de sódio (Sigma-Aldrich) a 1% (p/v). A suspensão contendo alginato de sódio a 1% e 2g de pó de penas de galinhas foi adicionada à bureta de 50 mL e gotejada sobre solução de cloreto de cálcio (0,2M), sob agitação constante. As pérolas (esferas) formadas, contendo o pó de penas de galinhas foram coletadas por filtração em papel e pesadas (determinação da massa úmida). As esferas, assim obtidas, foram submetidas a testes de resistência química, térmica e mecânica. Uma massa conhecida de pérolas foi agitadas, em agitador orbital (100 rpm), em presença de água destilada com pH ajustado para diferentes valores (pH 4, 5, 6, e 7), por meio da adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, por 24 horas, a 34°C . A temperatura escolhida foi a mesma utilizada para operação dos reatores. Após os testes as amostras foram novamente filtradas e pesadas para observação de ganho ou perda de massa. O mesmo teste foi feito para imobilização

das bactérias adicionando-se uma suspensão de células viáveis à mistura de BP e alginato de sódio.

5.6. Testes de adsorção – Estudo cinético

Os testes de adsorção (estudo cinético) foram feitos usando os materiais escolhidos (BP, pérolas de alginato de cálcio e células microbianas livres ou imobilizadas), em solução contendo NaAsO_2 sendo a concentração de As(III) de 4 mg.L^{-1} , em agitador orbital por 24 horas. As condições testadas foram:

1. Biomassa proteica dispersa
2. Biomassa proteica imobilizada
3. Células microbianas livres
4. Células microbianas imobilizadas
5. Pérolas de alginato de cálcio

Cada material foi testado separadamente em frascos de penicilina com 20 mL de água, 4 mg.L^{-1} de arsênio, 1 g ou 5%(p/v) de pérolas do material a ser testado. Amostras foram retiradas nos intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 600, 1440 minutos, filtradas em papel e em filtro quantitativo e em membrana de microfiltração (poro de $0,45 \mu\text{m}$) e enviados para análise de teor de Arsênio (sendo a concentração inicial de 4 mg.L^{-1}) por Espectrofotômetro de Emissão Atômica com fonte Plasma do laboratório de Bio&Hidrometalurgia da UFOP.

Os testes contendo a biomassa proteica e as células microbianas foram refeitos utilizando-se o meio Postgate B, acrescido de 4 mg.L^{-1} , a fim de se avaliar o efeito do meio de cultura e da presença de células viáveis no processo. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor de As.

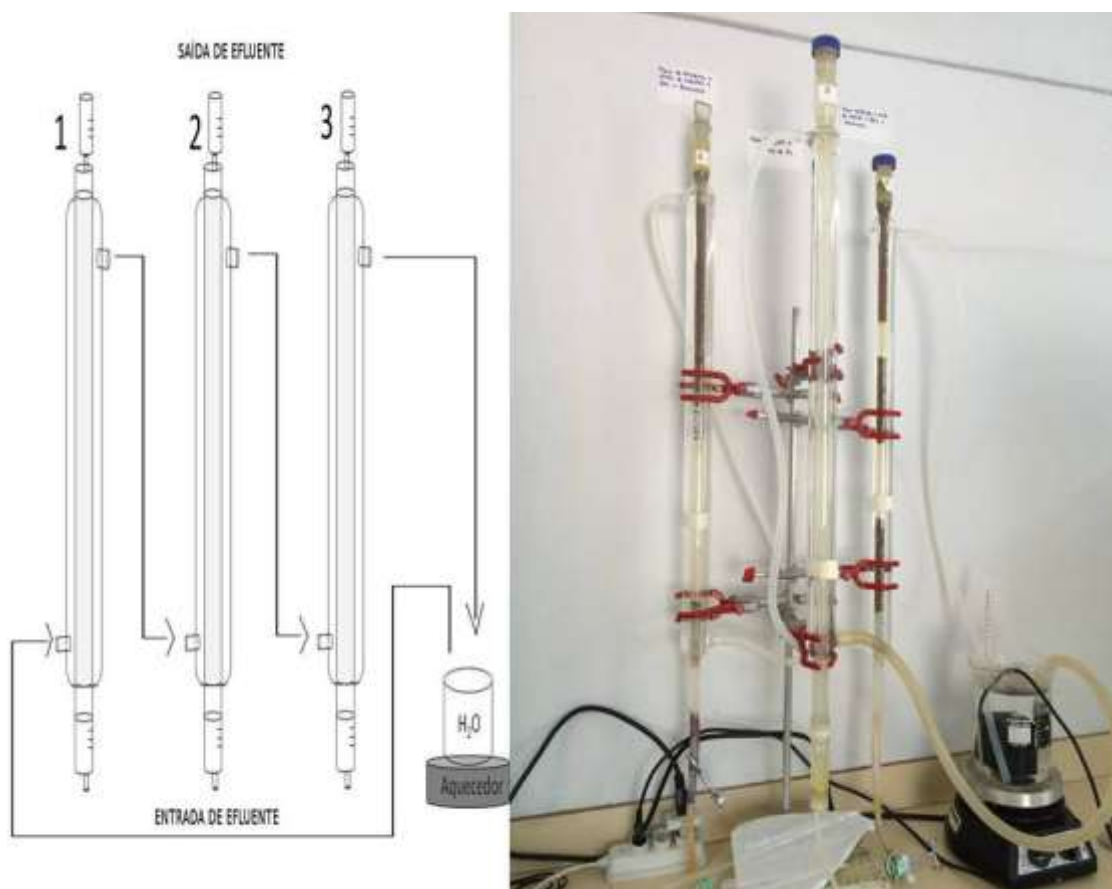
5.7. Montagem e operação dos biorreatores

Definidos os melhores parâmetros operacionais e visando obter a redução de sulfato e a remoção de As(III), em condições mais próximas daquelas esperadas para um sistema de tratamento de efluentes reais, foram empregado três reatores de leito fixo, semelhantes a um modelo desenvolvido por COSTA (2012), e mantido em operação, desde então, no Laboratório de Biotecnologia Ambiental. Trata-se de um reator construído utilizando coluna de condensação, comumente utilizada em destiladores, com as seguintes

dimensões: 80cm de altura e 4cm de diâmetro e dimensões internas de 60cm de altura e 2cm de diâmetro (COSTA, 2012).

Além do reator já construído e descrito acima foram montados outros dois reatores, com colunas menores, com capacidade de 75 mL, para fins de comparação de desempenho. O esquema da figura 5.2 mostra a montagem e organização dos três reatores, atualmente em operação.

Figura 5.2: Reatores de bancada de leito fixo, construídos e mantidos em operação no Laboratório de Biotecnologia Ambiental.



Fonte: Próprio autor.

A temperatura no interior dos reatores foi mantida constante por meio de recirculação de água, aquecida a uma temperatura de $32^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$, na camada externa dos reatores, que foram interligadas por mangueiras (conforme a **Figura 5.2**). A água foi mantida aquecida com uso de aquecedor de bancada (Fisatom) e recirculada no sistema por uma bomba peristáltica.

A alimentação e a retirada de alíquotas para as análises foram realizadas por meio do uso de seringas com capacidade para 10mL. A alimentação foi realizada na porção inferior e a retirada de alíquotas para análises se dava na porção superior, operando-se assim em fluxo ascendente.

Na **Tabela 5.2**, , estão descritas as constituições dos meios de cultura adicionados aos três reatores.

Tabela 5.2: Meios de cultura adicionados aos reatores em operação no Laboratório de Biotecnologia Ambiental.

Reagentes (g/L)	Reator1	Reator 2	Reator 3
Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	-	-	0,5
Cloreto de Amônio (NH ₄ Cl)	-	-	1,0
Sulfato de Cálcio (CaSO ₄)	1,26	1,26	1,26
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2,0	2,0	2,0
Extrato de Levedura	-	-	1,0
Tioglicolato de Sódio	-	-	0,5
Ácido Ascórbico	-	-	0,1
Glicerol (mL)	6,7	6,7	6,7
Água de torneira (TAP)	+	-	-
Água destilada	-	+	+

Os reatores 1 e 2 foram inoculados com células microbianas, 6,25% (p/v) e biomassa proteica (BP) imobilizadas conforme procedimento descrito anteriormente. No reator 3, o inóculo foi realizado acrescentando-se 10% (v/v) de cultura microbiana previamente enriquecida. Nos reatores 2 e 3 o meio de cultura adicionado foi dissolvido em água destilada, enquanto no reator 1 a água utilizada foi de torneira, como uma possível solução de metais traços. A fonte de carbono solúvel empregada nos três reatores foi o glicerol e os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,0 antes da alimentação. O reator 3 trata-se, portanto, de um reator convencional, contendo células microbianas livres,

sem a adição de BP, alimentado com meio de cultura Postgate B preparado de modo convencional, utilizando-se uma solução de sais e nutrientes dissolvidos em água destilada, que foi utilizado como parâmetro de comparação da eficiência do processo. Durante a operação, foram avaliados parâmetros tais como pH, Eh e concentração de sulfato pelo método turbidimétrico (descritos no item 5.2).

5.8. Análises químicas

A concentração de sulfato foi estimada através do Método Turbidimétrico (KOLMERT et al., 2000). Neste método, o sulfato da solução é precipitado, por meio da adição de cloreto de bário na presença de solução ácida e, assim, a concentração de sulfato pode ser mensurada pela determinação da absorbância em 420 nm, em espectrofotômetro.

Para a determinação da concentração de sulfato no meio, 1mL de amostra era diluída em balão de 10mL, seguida de centrifugação por 15 minutos à 10000rpm. Alíquotas de 1mL do sobrenadante foram transferidas para tubo cônico contendo o mesmo volume de solução condicionante (KOLMERT et al., 2000). Em seguida, o cloreto de bário, em excesso, foi adicionado, sendo, então, a solução levada ao espectrofotômetro para leitura da absorbância em 420nm.

As medidas de pH e Eh foram realizadas em um potenciostato digital DIGIMED, com eletrodo combinado de platina. Para a determinação da concentração de As(III), foi retirada uma alíquota de 10mL de amostra e centrifugada 15 minutos, à 10000rpm. Em seguida, a amostra foi filtrada em membrana de celulose 0,45 μ m (Sartorius) e o filtrado acondicionado em frascos âmbar, com volume de 10mL, acrescidas de ácido clorídrico (50 μ L) para preservação da amostra. A quantificação da concentração de As(III) foi realizada por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), marca Varian modelo 725-ES, no Laboratório de Bio&Hidrometalúrgia. Cerca de 8 mL de amostra foram retiradas dos reatores em intervalos de 7 dias. A alíquota era filtrada, primeiramente em papel de filtro quantitativo, e, posteriormente, em membrana de microfiltração (poro de 0,45 μ m). Com esta técnica somente é possível determinar a concentração de As total, porém, considerando-se que o metaloide introduzido no meio era o arsênio trivalente As(III) e as condições reacionais eram redutoras, assumiu-se que a concentração detectada tratava-se da concentração de As(III).

5.9. Preparação de material para Microscopia eletrônica de Varredura MEV/EDS)

Para identificação e análise das pérolas de alginato presentes no reator, foi realizada uma retirada de amostra no 100º dia de operação. Nos reatores um e dois, foram retiradas 10 esferas, na porção superior do reator e uma amostra do resíduo sólido que se formou na entrada de ambos (porção inferior). Os resíduos sólidos da entrada dos reatores foi retirado com ajuda de uma espátula de aço inox. Antes de serem recolhidos, o fluxo do reator foi interrompido com ajuda de uma pinça de mohr, evitando que se perdesse o material contido no mesmo.

Para fabricação da lâmina delgada polida, 5 pérolas de cada reator foram enviadas para o Laboratório de Laminação do Departamento de Geologia da Escola de Minas (UFOP). As outras 5 pérolas foram encaminhadas ao Laboratório NanoLab, do Programa de Rede Temática em Engenharia de Materiais da UFOP para serem analisadas dispostas em uma fita de carbono. Após a retirada dos resíduos sólidos, cerca de 1g de material foram depositados, na forma de esfregaço, em lâminas de vidro convencionais (1,0X26X76mm). As lâminas foram dispostas em estufa a 35°C/2h para secagem.

A caracterização de todos os sólidos realizada por microscopia eletrônica de varredura acoplado ao sistema de espectroscopia por energia dispersa (MEV-EDS) (*Tescan*, modelo *vega3*) pelo Laboratório NanoLab. Nesta técnica, um feixe de elétrons é direcionado para a superfície de uma amostra, estas por sua vez emitem sinais que são detectados. A energia do raio é específica para cada elemento, sendo assim possível identificar o teor da amostra (KAILASAM, ROSENBERG & NIELSEN 2009).

Para realização das imagens, uma película micrométrica de material condutor (ouro) foi depositada sobre a superfície do mineral, por precipitação a vácuo, possibilitando assim a condução da corrente elétrica.

Após o recobrimento com ouro, as amostras foram levadas para o aparelho de MEV/EDS para aquisição das imagens.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Enriquecimento das amostras e determinação dos teores de sulfato do meio

Na fase de enriquecimento da cultura, a presença de BRS pode ser evidenciada pela formação de precipitado negro no meio. Tal precipitado se deve à formação de sulfeto de ferro (FeS), advindo da reação entre o ferro presente no meio e o H₂S produzido pelos micro-organismos. Esta reação de precipitação foi utilizada como indicador indireto da atividade de BRS no meio.

Figura 6.1: Crescimento bacteriano evidenciado pelo escurecimento devido à formação de precipitado negro de FeS.



Fonte: Próprio autor.

6.2. Remoção de Sulfato e Arsênio em diferentes condições – Testes em batelada

O consumo de sulfato foi avaliado utilizando-se diferentes fontes de carbono solúveis (glicerol e lactato) e parcialmente solúveis, biomassa proteica (BP) e ainda em concentrações distintas de arsênio (0,4 e 8 mg.L⁻¹). A razão DQO/sulfato teórica utilizada para todos os experimentos, considerando-se a fração de carbono solúvel, foi de 3,0. Esta razão teórica é considerada ideal pois a estequiometria da relação garantiria que toda a concentração do substrato orgânico adicionado ao meio seria metabolizada pelas células microbianas a dióxido de carbono, via redução dissimilativa de sulfato, garantindo ainda

maior consumo de sulfato, tanto na presença quanto na ausência de As(III) (COSTA, 2012).

As remoções de sulfato e As(III) em pH ácido, em diferentes condições experimentais (A a L), conforme item 5.4, serão apresentadas e discutidas.

Tabela 6.1: Condições experimentais empregadas nos testes em batelada.

Condição	Meio Postgate B	Lactato de sódio	Glicerol	BP	As(III) 4mg.L ⁻¹	As(III) 8mg.L ⁻¹
A	+	+				
B	+	+		+		
C	+	+			+	
D	+	+		+	+	
E	+	+				+
F	+	+		+		+
G	+		+			
H	+		+	+		
I	+		+		+	
J	+		+	+	+	
K	+		+			+
L	+		+	+		+

Fonte: Próprio autor.

Os valores de remoção de As(III) ao final de 15 dias de cultivo estão representados na **Figura 6.2** onde pode-se observar o decaimento dos teores de sulfato remanescente no meio ao final do experimento. As concentrações iniciais de sulfato, 2,14 g.L⁻¹ a 2,43 g.L⁻¹ decaíram ao final dos experimentos, independentemente da condição experimental empregada, atingindo valores na faixa entre 1,08 g.L⁻¹ e 1,30 g.L⁻¹, correspondendo a uma remoção final de sulfato entre 49 % e 46 %, empregando-se o lactato como fonte de carbono. Por outro lado, quando o glicerol foi escolhido como fonte de carbono, a concentração de sulfato inicial variou entre 2,10 g.L⁻¹ e 2,50 g.L⁻¹ chegando a alcançar valores finais entre 1,01 g.L⁻¹ e 1,55 g.L⁻¹, correspondentes a percentuais de remoção de 52% e 38%.

No que tange aos valores do metaloide analisado, as concentrações iniciais de As nos experimentos realizados foram de 4 mg.L^{-1} e 8 mg.L^{-1} , independentemente da fonte de carbono escolhida. Utilizando-se o lactato como fonte de carbono, o maior valor de remoção alcançado foi de $5,57 \text{ mg.L}^{-1}$ no experimento com 8 mg.L^{-1} de As iniciais ou seja, 70%. Enquanto isso, no experimento realizado com o uso do glicerol, a maior remoção de As também foi obtido nesta concentração inicial do elemento, sendo o valor residual encontrado de $3,16 \text{ mg.L}^{-1}$ com redução correspondente a 40%.

A concentração de sulfato decresce com o passar dos dias, pois as células metabolizam o substrato orgânico a dióxido de carbono via redução dissimilativa de sulfato. O melhor resultado de remoção de sulfato foi obtido na condição K, na qual se utiliza o glicerol como fonte de carbono na presença de 8 mg/L de As(III). Em alguns casos, o menor rendimento pode ser explicado devido à presença de uma maior concentração do metaloide que, em altas concentrações, pode inibir o metabolismo das BRS (MADIGAN et al., 2004). Entretanto, o As(III) reage com o sulfeto e o precipita, levando assim, há uma diminuição das concentrações de sulfeto na fração solúvel do meio, favorecendo a atividade metabólica das BRS, devido ao fato de que o sulfeto pode ser tóxico para as culturas microbianas de BRS. Os dados obtidos aqui confirmam mais uma vez os resultados já observados pelo nosso grupo de pesquisa e descritos na literatura. Na ausência do As, o sulfeto estaria solúvel e, portanto, em maior concentração no meio, podendo causar inibição da cultura (COSTA, 2012).

O gráfico 6.2 demonstra que, em alguns casos, mesmo com a presença de altas concentrações de As(III), a redução de sulfato não é prejudicada. Vários autores já relataram a resistência de células microbianas à presença de agentes reconhecidamente tóxicos como o As, em concentrações variando entre $17 \text{ } \mu\text{g}$ até 8 mg.L^{-1} (ANDRIANISA et al., 2008; TECLU et al., 2008; COSTA et al., 2013). O valor utilizado por COSTA (2012) e agora, novamente empregado neste trabalho, é muito superior ao descrito pelos outros dois autores, embora as remoções de sulfato tenham sido semelhantes. Os melhores resultados alcançados por TECLU (2008) e seus colaboradores foram obtidos utilizando-se concentrações de As de 1 mg.L^{-1} . Os mesmos autores ainda comentam que as culturas empregadas eram muito mais sensíveis ao As(III) do que ao As(V).

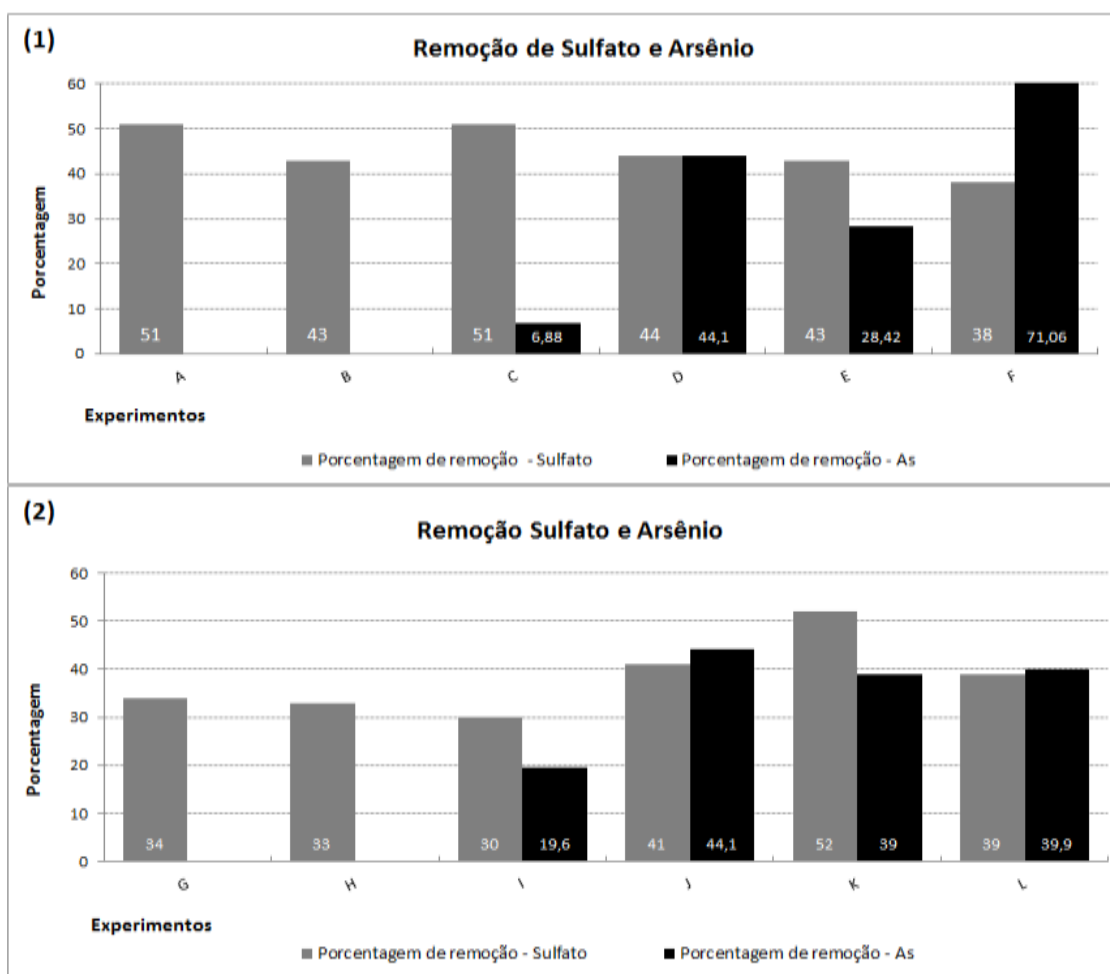
COSTA et al., 2013, comentaram em seus estudos a possível utilização desse material como fonte complementar de carbono para essas bactérias. Nas condições estudadas por tais autores, empregando-se lactato de sódio como fonte de carbono

principal, a remoção de sulfato passou de 38% (presença de lactato) para 80% (lactato e BP) (COSTA et al., 2013).

O substrato solúvel escolhido para utilização neste trabalho tem como vantagens ser relativamente barato, uma vez que é produzido em grandes quantidades durante a produção de sabão e outros detergentes, bem como durante a produção de biodiesel a partir de óleo de canola. Pode, também, ser um componente de muitos lubrificantes e vernizes (DINKEL et al., 2010; BERTOLINO et al., 2014), sendo muitas vezes descartado junto com as águas residuais destas empresas, podendo causar impactos ambientais.

Figura 6.2: Remoção de sulfato e arsênio em meio ácido sob diferentes condições experimentais:(A) Meio Postgate B + Lac; (B) Meio Postgate B + Lac + BP; (C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L⁻¹; (D) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L⁻¹+ BP; (E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹; (F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹+ BP; (G) Meio Postgate B + Gli; (H) Meio Postgate B + Gli + BP; (I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹; (J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹+ BP; (K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹; (L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹+ BP; pH 5,5.

(1) fonte de carbono: lactato; (2) fonte de carbono: glicerol.



Fonte: Próprio autor

Os dados de remoção de sulfato e arsênio em batelada também foram analisados pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade e organizados nas **Tabela 6.2 e 6.3**, referindo-se aos experimentos utilizando lactato com fonte de carbono e glicerol, respectivamente.

Os valores precedidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, ou seja, a remoção de sulfato não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos avaliados. Sendo assim, havendo ou não a adição da biomassa e arsênio não ocorre interferência na remoção biológica de sulfato.

Pode-se inferir também que, em relação à remoção de As, houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Além disso, utilização do lactato como fonte de carbono, a adição de biomassa proteica promoveu maior remoção de As quando comparada à mesma condição na ausência da biomassa proteica. Por fim, no cultivo com 8 mg.L^{-1} de As promoveu maior remoção que o cultivo com 4 mg/L , demonstrando assim uma possível tolerância a uma concentração maior de As.

Ao utilizar o glicerol como fonte de carbono a presença de biomassa proteica apresentou valores melhores ($p < 0,05$) de remoção de As apenas no cultivo 4 mg.L^{-1} de As. Pode-se observar também que, o experimento de 8 mg.L^{-1} , não houve diferença ($p > 0,05$) na remoção de As (na presença e ausência de BP).

Tabela 6.2. Remoção de sulfato e arsênio (III) por BRS cultivadas em meio Postgate B com lactato como fonte de carbono, com e sem adição de biomassa proteica.

Condição	Remoção de sulfato		Remoção de As (III)	
	----g----	---%---	--mg--	---%---
A	1,23 a	51,25 a	0	0 d
B	0,99 a	44,80 a	0	0 d
C	1,13 a	49,56 a	0,2395	6,55 d
D	1,08 a	46,75 a	1,4545	28,42 c
E	0,98 a	40,32 a	2,4690	44,07 b
F	0,81 a	37,85 a	6,1675	71,06 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

A – Meio de cultura sem biomassa proteica, B – Meio de cultura com biomassa proteica, C – Meio contendo 4 mg.L^{-1} de As(III) sem biomassa proteica, D - Meio contendo 4 mg.L^{-1} de As(III) com biomassa proteica, E - Meio contendo 8 mg.L^{-1} de As(III) sem biomassa proteica, F - Meio contendo 8 mg.L^{-1} de As(III) com biomassa proteica.

Tabela 6.3. Remoção de sulfato e arsênio (III) por BRS cultivadas em meio Postgate B com glicerol como fonte de carbono, com e sem adição de biomassa proteica.

Condição	Remoção de sulfato		Remoção de As (III)	
	G	%	Mg	%
G	0,76 a	34,08 a	0	0 c
H	0,73 a	33,18 a	0	0 c
I	0,68 a	30,49 a	0,8996	19,72 b
J	0,94 a	41,59 a	2,0780	43,95 a
K	1,04 a	49,52 a	3,3602	39,07 a
L	0,97 a	38,8 a	3,2910	39,99 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

G – Meio de cultura sem biomassa proteica, H – Meio de cultura com biomassa proteica, I – Meio contendo 4 mg.L^{-1} de As(III) sem biomassa proteica, J - Meio contendo 4 mg.L^{-1} de As(III) com biomassa proteica, K -

Meio contendo 8 mg.L⁻¹ de As(III) sem biomassa proteica, L - Meio contendo 8 mg.L⁻¹ de As(III) com biomassa proteica.

Na **Figura 6.3**, pode-se observar que, mesmo utilizando-se pH inicial ácido (pH 5), ao final do processo encontramos valores de pH próximos à neutralidade, quando a fonte de carbono utilizada é o lactato. A geração de alcalinidade devido à oxidação da matéria orgânica durante o crescimento microbiano contribui para este fenômeno. Íons carbonato e bicarbonato são produzidos (BARBOSA, 2009; COSTA, 2012) a partir da degradação do lactato e outras matérias orgânicas, contribuindo assim para a elevação o pH do meio. Sabe-se que estes micro-organismos são metabolicamente mais ativos em pH neutro, no entanto, a amostra microbiana utilizada neste projeto, foi selecionada ao cultivo em meio ácido, sem prejuízo de sua atividade metabólica. Este resultado é extremamente relevante visto que o presente trabalho tem como um de seus objetivos a investigação da possibilidade do emprego de tratamentos biológicos para o tratamento de efluentes ácidos da indústria minero-metalúrgica dispensando, ainda que parcialmente, os processos de neutralização prévia dos efluentes. Dessa maneira, os resultados experimentais obtidos em pH ácido são de extrema importância para o desenvolvimento do processo.

Com a utilização do glicerol, entretanto, os valores de pH do meio de cultura apenas sofrem elevação para valores próximos à neutralidade naquelas condições experimentais nas quais a biomassa proteica foi adicionada ao meio. Em um trabalho anteriormente publicado (DINKEL et al., 2010) alguns autores comentaram que a adição de pequenas quantidades de glicerol ao meio de cultura (3 e 4 mL.L⁻¹) é suficiente para causar decréscimo no valor de pH de 6,2 para 4,7. Isso pode ser explicado pela formação de ácidos orgânicos derivados do glicerol que, por sua vez, causam inibição da atividade das BRS. Entretanto, esta inibição é passageira e, após a atividade microbiana ser restaurada, observa-se o aumento dos valores de pH do meio de cultura.

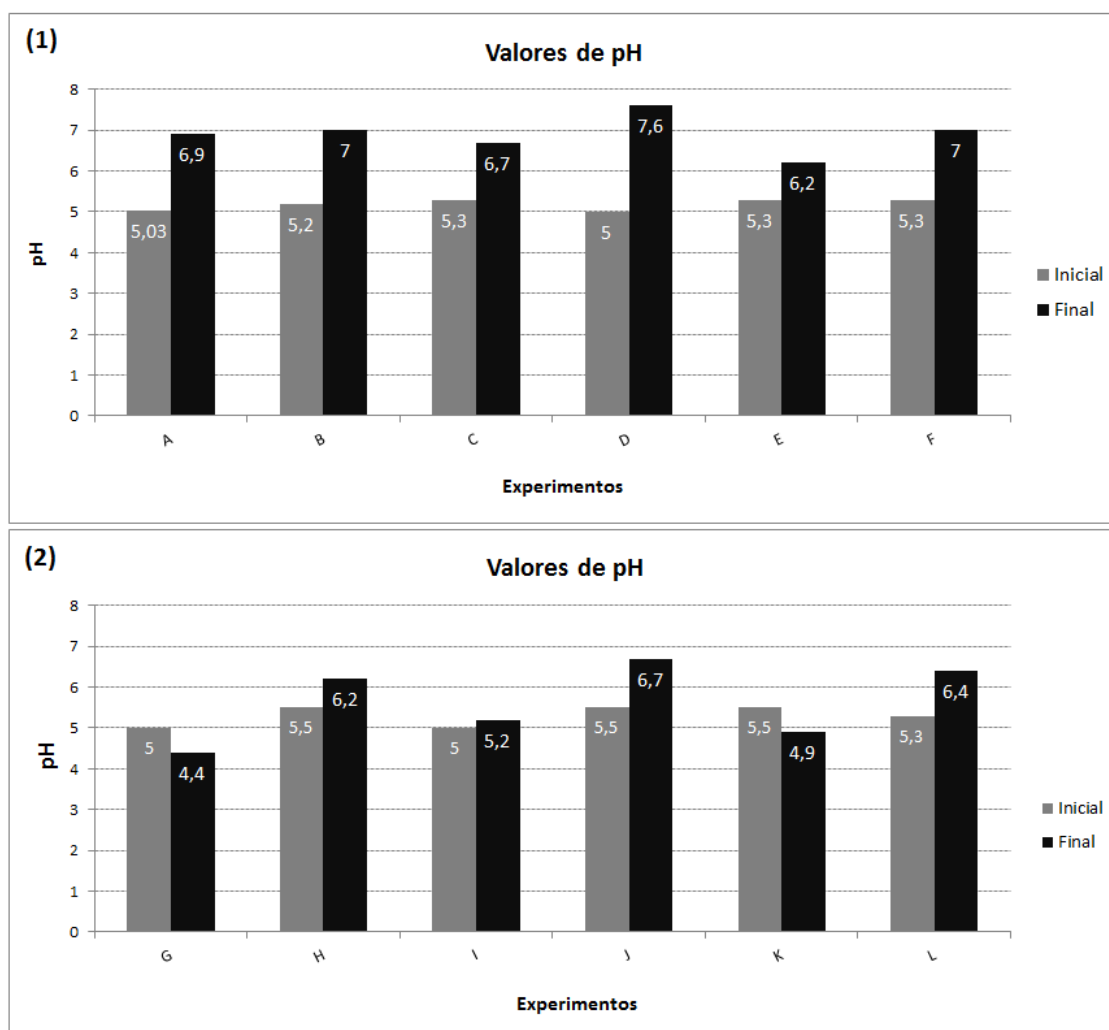
A maioria dos estudos realizados sobre redução de sulfato foi executada utilizando-se meio neutro, com pH 7,0, e lactato como fonte de carbono a fim de se obter um melhor rendimento (GHAZY et al., 2011; COSTA, 2012). Os resultados obtidos no presente trabalho são de grande valor, pois trabalhou-se com culturas previamente adaptadas ao cultivo em meio ácido. Dispensar a etapa de ajuste do pH do efluente a ser tratado ou utilizar menor quantidade de reagentes nesta etapa, fazendo um ajuste parcial do valor de pH, pode contribuir para diminuir os custos com reagentes químicos nas etapas

que precedem o tratamento. Os efluentes industriais contendo sulfato e arsênio possuem valores de pH excessivamente ácidos, da ordem de 3 a 4, condições diferentes daquelas propostas pelos autores.

Ainda nesta fase do projeto, pode-se também observar que foi possível obter crescimento microbiano satisfatório utilizando o glicerol como fonte de carbono solúvel, em substituição do lactato de sódio. Este dado é um outro parâmetro importante que também pode contribuir para a diminuição dos gastos envolvidos no tratamento biológico de efluentes ricos em sulfato, já que o glicerol é, muitas vezes, descartado por ser um subproduto da produção do biodiesel com pequeno valor agregado (DINKEL et al., 2010) .

Na fase de seleção da cultura, os frascos contendo biomassa proteica sempre apresentavam melhores crescimentos em comparação com os frascos onde este material residual não havia sido acrescentado. Já na seleção da cultura a crescentes concentrações de arsênio, os resultados obtidos mostraram que os micro-organismos não tem seu crescimento prejudicado até a concentração de 8 mg de As.L⁻¹. O estudo da resistência das BRS a elevadas concentrações de metais e metaloides potencialmente tóxicos é importante para se garantir a eficiência dos processos de biorremediação que usam este tipo de bactérias (COSTA, et al., 2009).

Figura 6.3: Alterações de pH observadas durante crescimento microbiano sob diferentes condições experimentais: (A) Meio Postgate B + Lac; (B) Meio Postgate B + Lac + BP; (C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L⁻¹; (D) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L⁻¹+ BP; (E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹; (F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹+ BP; (G) Meio Postgate B + Gli; (H) Meio Postgate B + Gli + BP; (I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹; (J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹+ BP; (K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹; (L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹+ BP; pH 5,5. (1) fonte de carbono: lactato; (2) fonte de carbono: glicerol.



Fonte: Próprio autor

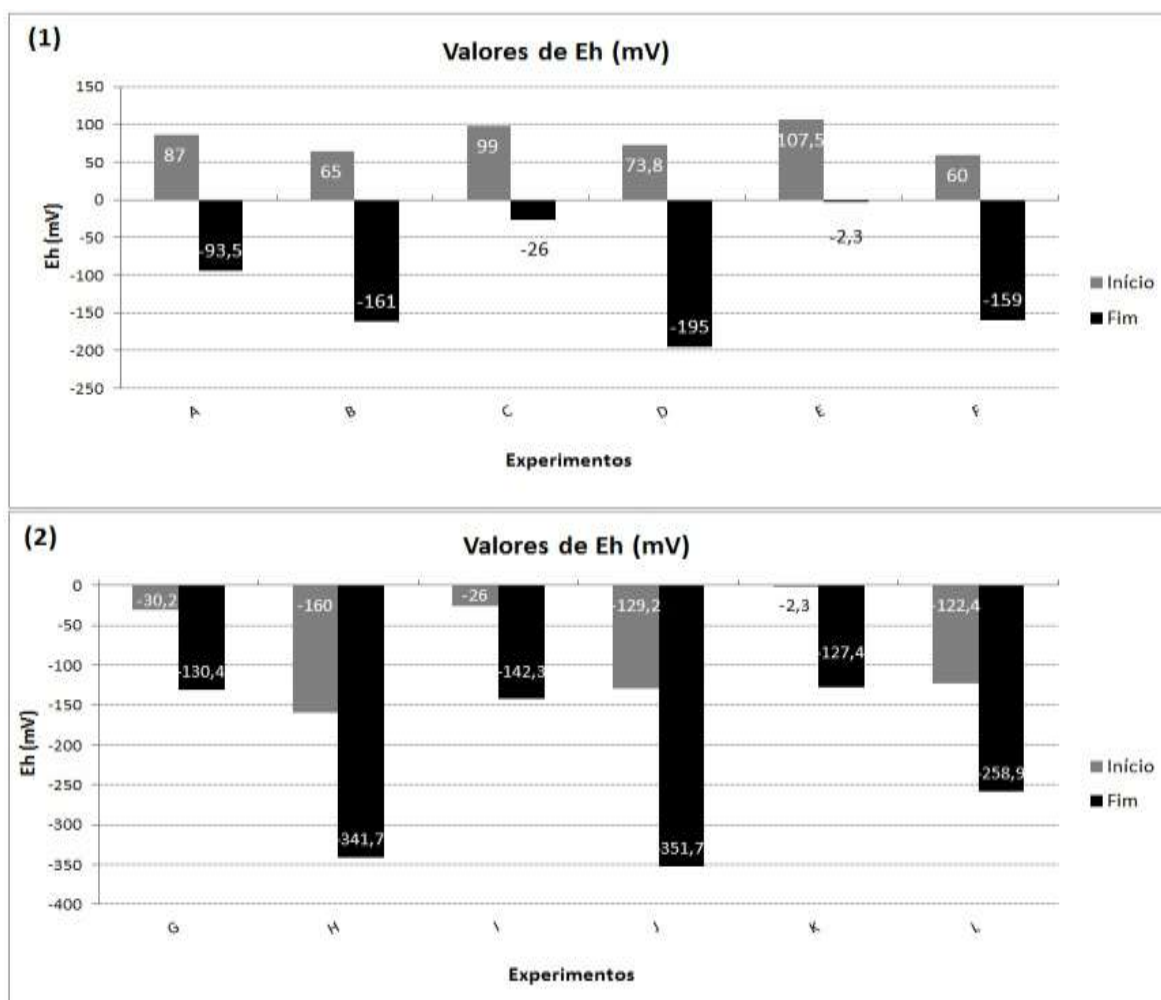
Além do acompanhamento do valor de pH, o valor do potencial de oxi-redução (Eh) do meio é um dos parâmetros utilizados para se avaliar a atividade metabólica das BRS, visto que o próprio sulfeto gerado pelo metabolismo das BRS é responsável por manter baixo o Eh do meio (GIBSON, 1990). Com o passar dos dias de cultivo, a tendência é que se observe um decréscimo no valor de Eh do meio denotando condições

tipicamente redutoras. Podemos observar na figura (**Figura 6.4**) que os potenciais de oxidação diminuem ao final do experimento, sendo que os menores valores são encontrados nas condições que se diferem das outras pela presença da biomassa proteica (BP). Portanto, pode-se afirmar que as condições ambientais durante os experimentos foram propícias ao desenvolvimento das células microbianas e, ainda, que a adição de biomassa residual (BP) ao sistema contribui significativamente para o abaixamento do potencial redox do meio, tornando-o ainda mais favorável ao crescimento de BRS e à metabolização dissimilativa do sulfato.

O aumento da concentração da concentração do substrato orgânico no meio, leva a um maior consumo de oxigênio no meio que conseqüentemente faz com que o potencial redox do meio decresça significativamente.

É importante ainda lembrar que as condições redutoras favorecem a remoção de As(III) por adsorção na superfície da BP (TEIXEIRA & CIMINELLI, 2005; TEIXEIRA et al., 2007; COSTA et al., 2014) podendo assim diminuir a toxicidade do meio aos microorganismos e resultando, conseqüentemente, em uma maior eficiência na remoção de As(III) conforme observado na **Figura 6.2**.

Figura 6.4: Alterações de Eh observadas durante crescimento microbiano sob diferentes condições experimentais: (A) Meio Postgate B + Lac; (B) Meio Postgate B + Lac + BP; (C) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L⁻¹; (D) Meio Postgate B + Lac + As(III), 4mg.L⁻¹ + BP; (E) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹; (F) Meio Postgate B + Lac + As(III), 8mg.L⁻¹ + BP; (G) Meio Postgate B + Gli; (H) Meio Postgate B + Gli + BP; (I) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹; (J) Meio Postgate B + Gli + As(III), 4mg.L⁻¹ + BP; (K) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹; (L) Meio Postgate B + Gli + As(III), 8mg.L⁻¹ + BP; pH 5,5. (1) fonte de carbono: lactato; (2) fonte de carbono: glicerol.



Fonte: Próprio autor

6.3. Eficiência do processo de imobilização de biomassa microbiana e biomassa residual.

As pérolas de alginato de cálcio foram avaliadas quanto à sua resistência e eficiência de encapsulação. Todas as amostras analisadas, independentemente da condição

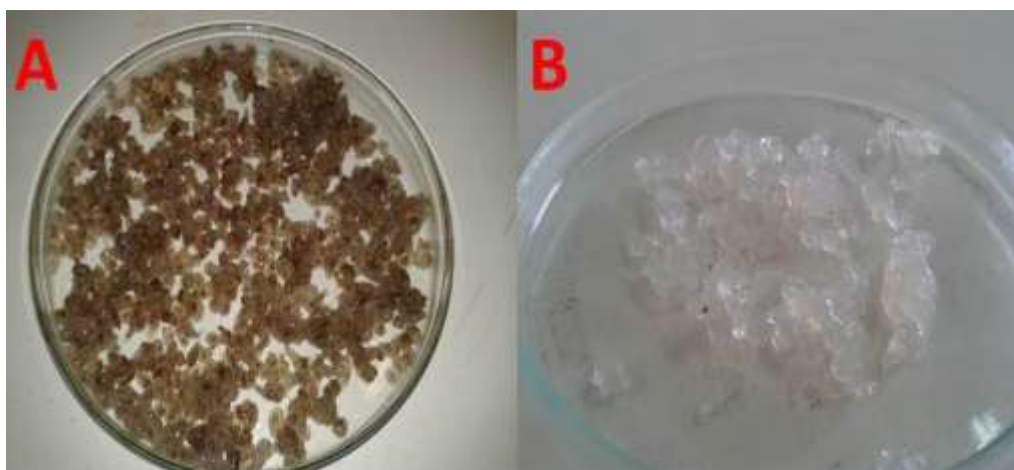
do experimento, apresentaram resultados satisfatórios quanto à resistência. Observou-se ganho de massa, possivelmente por hidratação, da ordem de 10-20%. A metodologia de encapsulação proposta teve eficiência de 86,9%, e, dessa forma, pode-se afirmar que uma porcentagem muito pequena da biomassa é perdida no processo de fabricação das esferas.

No caso das esferas com micro-organismos, houve a repetição de todo o processo para testar a resistência mecânica (sob agitação), térmica (30°C) e química (pH 4, 5, 6 e 7) das amostras. Nas condições testadas as esferas mostraram-se resistentes, com ganho de massa na ordem de 20-30% e a eficiência do processo foi de 92,7%.

As esferas contendo a biomassa residual foram inoculadas em meio Postgate C modificado contendo sulfato ferroso, para avaliação da viabilidade metabólica das células imobilizadas. Observou-se que, após uma semana de incubação, ocorreu a formação de precipitado negro no meio, indicativo de atividade metabólica de BRS, com consequente redução de sulfato. É importante comentar que houve formação de precipitado negro na fase líquida do cultivo mas, sobretudo, no interior das esferas. Foi assim demonstrada a viabilidade celular após o processo de produção de pérolas com alginato de sódio.

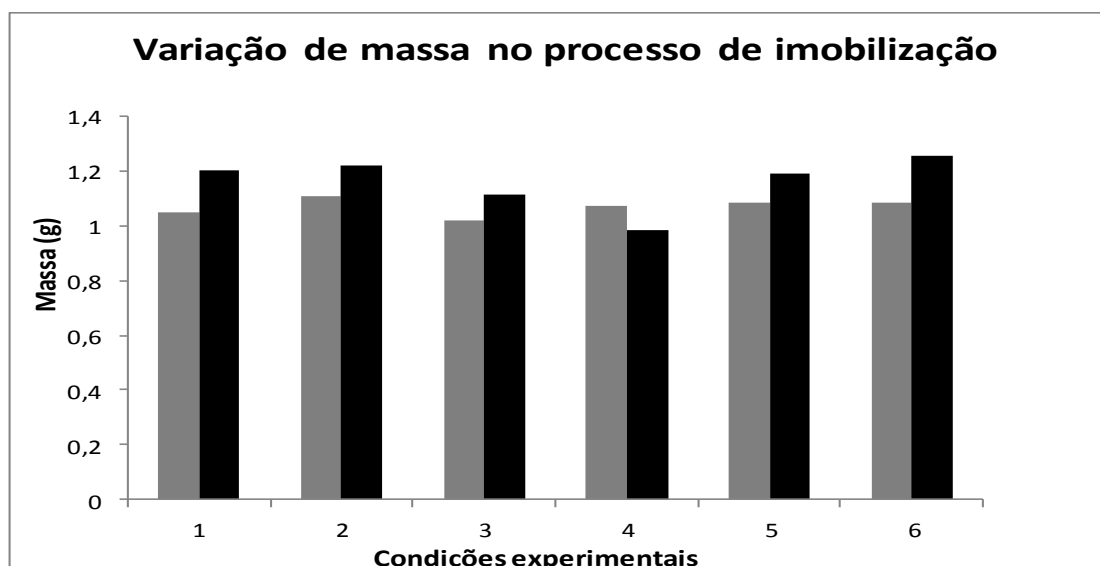
Em COSTA, 2012 a atividade metabólica do consórcio microbiano contendo BRS, utilizada nos itens anteriores, foi avaliada em condição semi-contínua. No decorrer do experimento, acredita-se que, pela perda da biomassa, o processo foi prejudicado e os resultados, antes satisfatórios, foram decaindo. Neste trabalho, a imobilização da biomassa proteica vem como alternativa para melhorar o desempenho das BRS em condição semi-contínua.

Figura 6.5: Pérolas produzidas pela reação de uma suspensão de BP 2% (p/v) ou inóculo microbiano 2% (p/v) e alginato de sódio a 1% (p/v) com solução de cloreto de cálcio (0,2M). (A) pérolas contendo exclusivamente BP (B) pérolas contendo exclusivamente micro-organismos.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6.6: Variação de massa das esferas de alginato de cálcio contendo BRS e BP em diferentes condições experimentais: (1) pH 4,0; (2) pH 5,0; (3) pH 6,0; (4) pH 7,0; (5) As(III), 4mg.L⁻¹, pH 7,0 (6) As(III), 8 mg.L⁻¹, pH 7,0, T=30°C.



Fonte: Próprio autor.

6.4. Testes de adsorção

Nos testes de adsorção do As(III) foram comparados os materiais escolhidos (BP e BRS) imobilizados e livres, separadamente. Os resultados experimentais obtidos (dados não mostrados) não apontaram a ocorrência de adsorção significativa do As(III) adicionado em ambas soluções durante as 24 horas de observação.

O fato de não ter acontecido o processo de adsorção nas células microbianas livres pode ser explicado pelo fato de suas membranas não terem afinidade pelos íons arsenicais que, em pH 5,0 apresentam-se na forma do ácido arsenioso, H_3AsO_3 , neutro, que não seria capaz de interagir com as superfícies celulares por um processo simples de adsorção eletrostática. A biomassa residual BP, por sua vez, possui boa capacidade de adsorção específica das espécies trivalentes do As, porém, é necessário que a biomassa seja ativada por meio da reação de redução das pontes de cistina em sua estrutura por ação de agentes redutores fortes como o tioglicolato de sódio (TEIXEIRA, 2004; TEIXEIRA E CIMINELLI, 2005). Assim, durante as 24 horas do teste de adsorção, nem as células microbianas, nem a BP empregada, sejam livres ou encapsuladas e, nem mesmo o gel de alginato de cálcio, foram capazes de remover o As(III) por adsorção. Por outro lado, durante os cultivos microbianos de BRS em presença de BP, o sulfeto biogênico produzido parece ser capaz de reduzir as pontes de sulfeto da BP aumentando sua capacidade adsorptiva de As(III) (COSTA et al, 2013). Este dado foi novamente observado nos experimentos em batelada e em condição semi-contínua descritos no presente trabalho.

6.5. Cultivo semi-contínuo para remoção de Arsênio e Sulfato

Os resultados de todos os testes preliminares em batelada foram analisados quanto à eficiência na remoção de sulfato e arsênio, bem como às alterações nos valores de pH e Eh e, ainda, quanto às diferentes fontes de carbono empregadas. A partir dos dados coletados foram selecionadas as condições experimentais para a realização de testes de remoção de sulfato e As por BRS na presença de BP, em condição de cultivo semi-contínua, visando otimizar o processo e, ainda, minimizar a perda de massa, observada anteriormente por Costa (2012), que contribuía negativamente para a eficiência do processo.

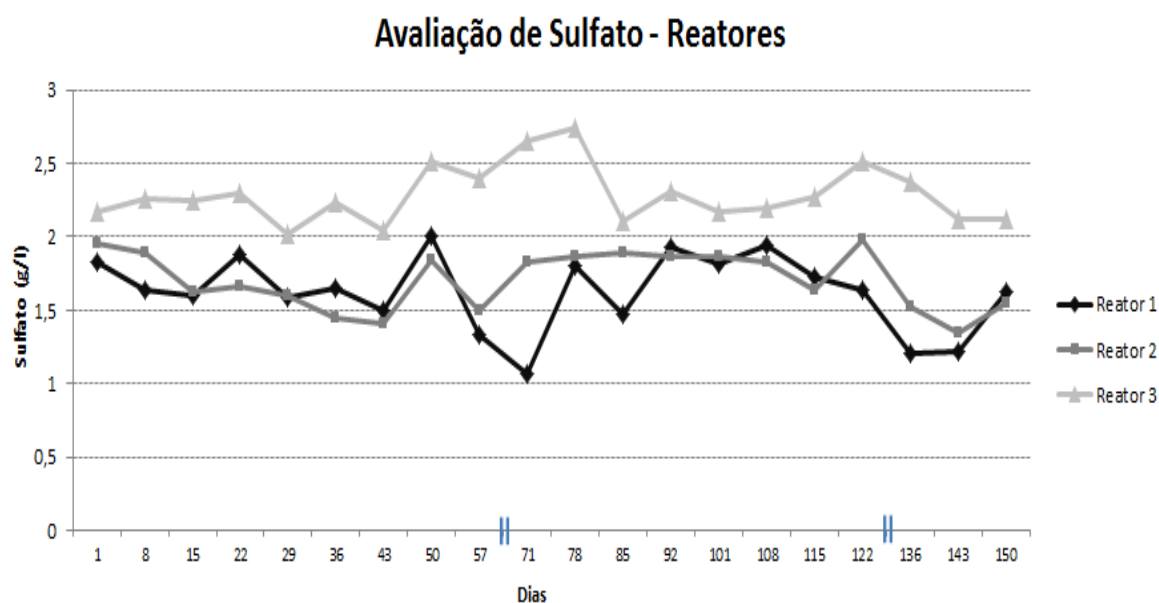
Os reatores foram construídos conforme descrito no item 5.7 da metodologia e operados nas seguintes condições: a biomassa proteica imobilizada, BRS livres no meio,

fonte de carbono glicerol e 8mg.L^{-1} considerados mais satisfatórios na etapa de testes em batelada. Os resultados aqui apresentados referem-se às variações das concentrações residuais de sulfato, arsênio, pH e Eh do meio observadas durante todo o tempo de operação dos reatores (150 dias).

Na análise por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) da água de torneira foram encontrados em quantidade significantes de alumínio ($0,04\text{ mg.L}^{-1}$) e magnésio ($0,51\text{ mg.L}^{-1}$). Outros metais podem estar presentes, entretanto estes foram os únicos encontrados na curva selecionada para análise.

Por volta do dia 86, houve uma parada para manutenção dos reatores, por isso os resultados cerca desse dia não condizem com a evolução do reator.

Figura 6.7: Concentração de sulfato residual em reatores de fluxo ascendente em cultivo semi-contínuo. Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L^{-1} ; pH 5,0; $T=34^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Próprio autor.

Como demonstrado na figura (**Figura 6.7**), o Reator 3 não houve variação significativa na concentração de sulfato, o que já era esperado visto que este reator foi planejado, montado e operado para ser utilizado apenas como controle dos testes, tendo sido inoculando apenas com a cultura de BRS em meio Postgate B, pH 5,5. Neste reator, a

remoção de sulfato foi baixa, equivalente a 8%. Nos demais reatores, como havia a presença da biomassa proteica, esperava-se uma remoção de sulfato maior, o que de fato aconteceu.

Os melhores valores foram obtidos no Reator 1, cuja concentração chega a $1,05 \text{ mg.L}^{-1}$, representando um percentual de remoção de 42%, enquanto no Reator 2 o menor valor observado foi de $1,35 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo correspondente a um percentual de remoção de 31 %.

Os resultados obtidos neste trabalho, à primeira vista, poderiam ser considerados insatisfatórios, uma vez que o lactato, os valores de remoção de sulfato chegaram a 80% (MATOS, et al., 2013). Entretanto, deve-se lembrar que a fonte de carbono utilizada neste trabalho não é a preferencialmente utilizada nos estudos já realizados com estes micro-organismos. Pode-se inferir que, a utilização do glicerol vem sendo abordada como forma de diminuição dos gastos com o fornecimento de fontes de carbono aos sistemas de tratamento biológico de resíduos ricos em sulfato. Estes micro-organismos são capazes de metabolizar diversas fontes de carbono distintas, e a opção por uma delas pode ser a chave para garantir um bom desempenho no bioreator (ZHAO et al., 2010).

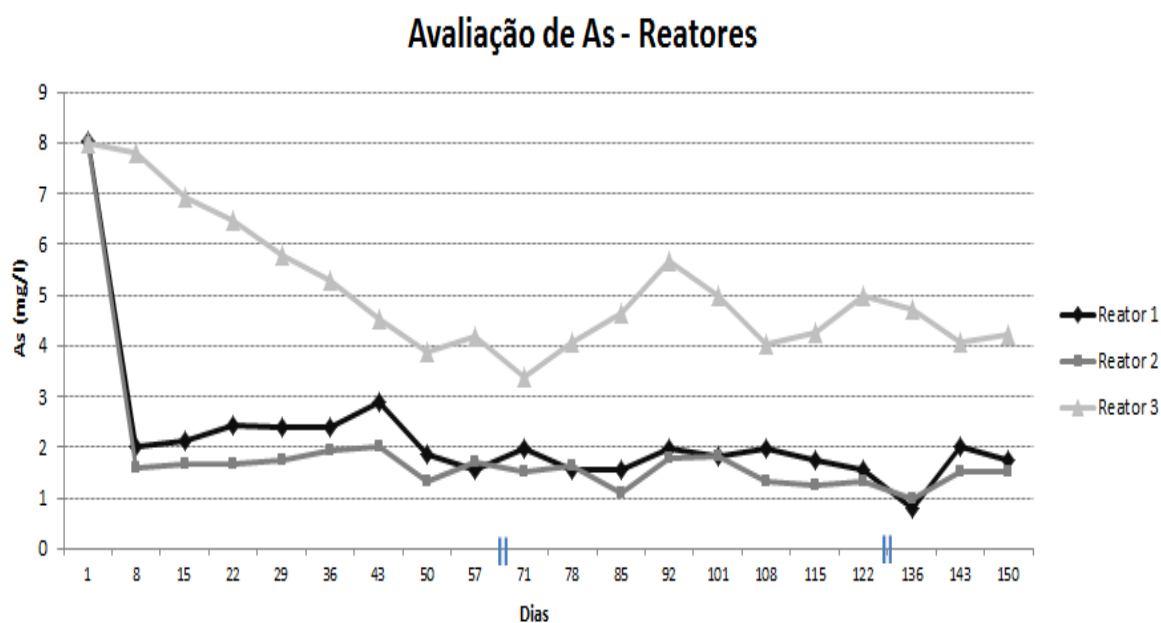
No caso deste trabalho, as fontes de carbono (biomassa proteica e glicerol) testadas são de baixo valor comercial, sendo que uma delas, a biomassa proteica já provou ser eficiente como suporte para crescimento das BRS (COSTA, 2012). Assim, os valores aqui alcançados podem ser considerados promissores.

No Reator 1, aquele que promoveu a maior remoção de sulfato (Figura 6,4), tem-se como diferencial a utilização de água de torneira (TAP) para a dissolução dos sais e nutrientes do meio de cultura. O melhor resultado obtido nesta condição abre a possibilidade de se utilizar deste artifício metodológico numa possível utilização desta metodologia em larga escala, reduzindo assim seus custos operacionais.

Sabe-se que ambientes com altas concentrações de metais e metaloides, são considerados tóxicos para BRS, pois, uma vez em contato com as células, podem substituir os íons essenciais que compõem a estrutura celular bloqueando grupos funcionais de moléculas como enzimas, promovendo danos a integridade da membrana celular, desnaturação e inativação de enzimas celulares (COSTA, 2012).

Os dados aqui apresentados, no entanto, comprovam que, mesmo em concentrações elevadas de arsênio, o desenvolvimento e metabolismo da cultura microbiana não foram alterados.

Figura 6.8: Concentração de arsênio residual. Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada ; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L^{-1} ; pH 5,0; $T=34^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Próprio autor.

Na análise da remoção de arsênio no meio, observa-se uma forte semelhança nos valores obtidos nos reatores 1 e 2, que se diferem apenas pela utilização de TAP no reator 1 e água destilada no reator 2.

Na primeira semana de monitoramento (8 dias), os valores de arsênio que iniciaram na faixa de 8mg.L^{-1} chegaram a faixa de $2,02 - 1,60\text{mg.L}^{-1}$ nos reatores 1 e 2, representando 74,8% e 80,0% de remoção do metaloide respectivamente, resultando em remoções de $0,031-0,033\text{mg As(III).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

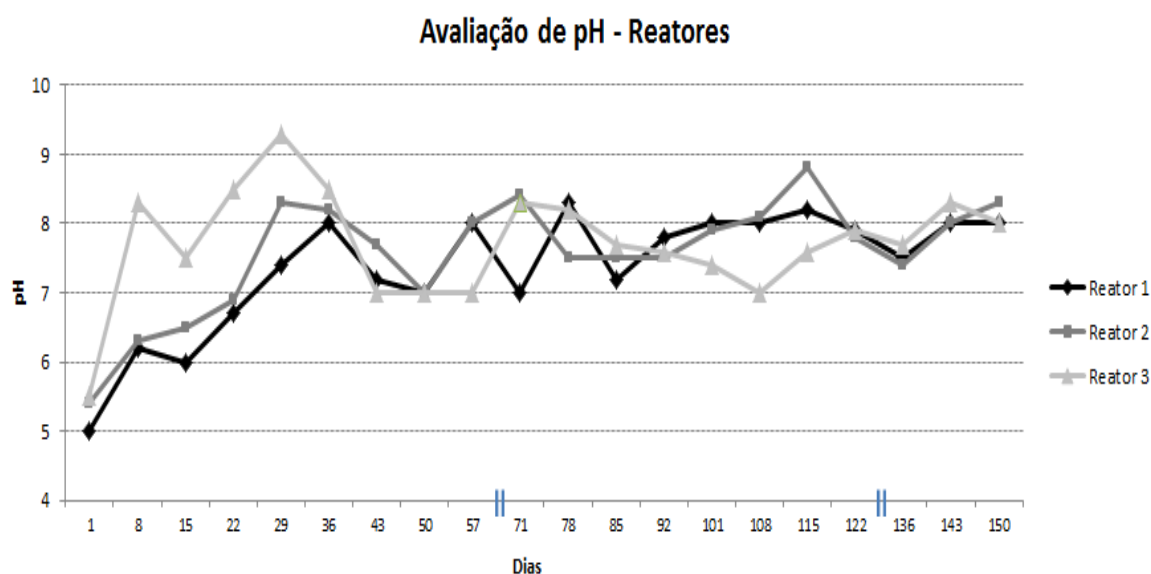
BATTAGLIA-BRUNET et al., 2012, obtiveram uma remoção de $2,5\text{mg As(V).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em um reator de fluxo contínuo com pH ácido (2-5), utilizando glicerol e/ou hidrogênio e uma concentração inicial do metaloide de $100\mu\text{g.L}^{-1}$. No caso do trabalho aqui apresentado, os resultados de remoção de As são inferiores, porém, a concentração de As(III) aqui empregada é 80 vezes maior do que a concentração de As(V) utilizada pelos autores no trabalho acima e além disso, há que se reforçar que a toxicidade do As(III) quando comparada ao As(V) é indiscutivelmente maior, para os micro-organismos em geral. Assim, estes valores obtidos nesta pesquisa são de extrema importância, mostrando, principalmente, a resistência destes micro-organismos em meios ricos deste elemento e à capacidade do sistema de remoção da espécie trivalente do metaloide, cuja presença nas

drenagens ácidas e águas de processo é muito frequente e também muito problemática por se tratar de um elemento muito tóxico (BATTAGLIA-BRUNET et al., 2012).

Os resultados aqui apresentados são promissores visto que, durante o processo utilizou-se uma concentração muito alta do metaloide meio com pH ácido. Sabe-se que para obter o melhor rendimento destas bactérias aqui utilizadas o pH deve ser próximo da neutralidade (RAMPINELLI et al., 2008). Dispensar o ajuste de pH num processo de tratamento de efluentes é de grande importância para diminuir os custos e o tempo dispendido.

A **Figura 6.9** apresenta os dados dos valores de pH obtidos pelas análises semanais dos reatores.

Figura 6.9: Avaliação da variação do pH. Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP imobilizada e água destilada ; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L^{-1} ; pH 5,0; T=34°C.



Fonte: Próprio autor.

Para experimentos com pH inicial 7 e fonte de carbono lactato, os valores obtidos de remoção são sempre muito elevados (70-90%), podendo estes valores serem explicados pela seleção das BRS a este pH (COSTA et al., 2013) . Sabe-se que um meio com pH 7,0 é o melhor para o crescimento deste tipo de bactérias. Entretanto, neste trabalho o valor inicial de todos os experimentos foi de 5,0 para possível emprego desta metodologia em efluentes ácidos.

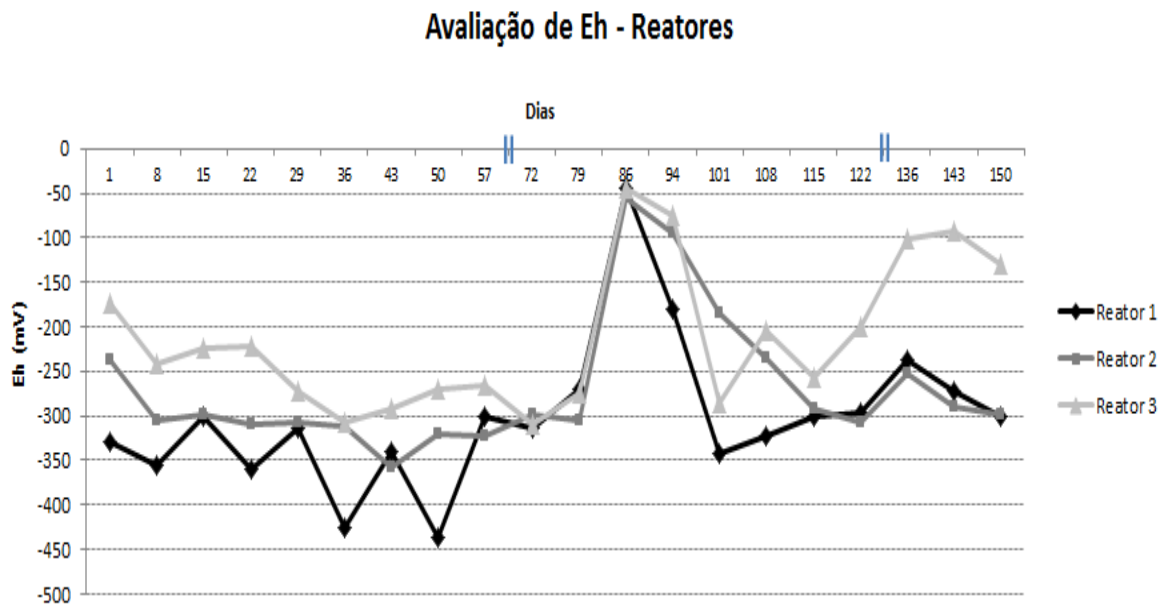
Em todos os reatores houve um acréscimo no valor do pH, chegando a valores entre 7,5-9,3, os quais estão, provavelmente, associados à produção de bicarbonato gerado pela degradação do substrato orgânico pelas BRS (KAKSONEN et al., 2003). Esse aumento de pH também pode ser observado em outros estudos, que após varios dias de experimento, obtinha-se valores neutros (LUO et al., 2008).

Quanto aos valores de Eh (**Figura 6.10**) observamos que a presença da biomassa proteica (reator um e dois), como aconteceu também nos testes em batelada, por si só, já é um fator que faz com que os valores de Eh sejam baixos.

O Eh no qual a atividade das bactérias é máxima ocorre por volta de -320 mV (GIBSON, 1990). Nos reatores, os valores obtidos chegam a valores -420 mV, mostrando assim que o ambiente é favorável ao crescimento das BRS.

A partir, exclusivamente, dos dados de concentração de sulfato e arsênio residuais e variações de Eh ou pH no sistema não foi possível, entretanto, aprofundar na discussão sobre os possíveis mecanismos de remoção e diferenciar entre os processos de remoção de As, por precipitação química na forma de sulfeto ou por adsorção na superfície das pérolas de alginato. Assim, foram retiradas amostras das pérolas e dos precipitados formados nos reatores a fim de que fosse realizada uma análise mais detalhada dos produtos sólidos gerados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS).

Figura 6.10: Avaliação da variação do potencial redox (Eh). Condições: Reator 1, fontes de sulfato, BP immobilizada e água de torneira; Reator 2, fonte de sulfato, BP immobilizada e água destilada; Reator 3, Meio Postgate B em água destilada. Concentração de As inicial de 8mg.L^{-1} ; pH 5,0; $T=34^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Próprio autor.

6.6 Análises dos produtos sólidos por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS).

Por volta de 30 dias de funcionamento dos reatores, observou-se a formação de um precipitado negro na entrada dos reator 1 (cujo meio foi dissolvido em água de torneira) e branco/amarelado no reator 2 (meio dissolvido em água destilada) ambos. Não foram observados precipitados no reator 3. Estes sólidos foram retirados e analisados por MEV/EDS.

Foram retiradas, também, amostras de pérolas dos dois reatores para análises. As pérolas retiradas foram analisadas de duas maneiras: em lâminas polidas (preparadas pelo Laboratório de Laminação da Universidade Federal de Ouro Preto) e em deposição sob uma fita de carbono e lidas diretamente pelo microscópio.

Estas amostras, retiradas simultaneamente dos reatores foram analisadas pelo equipamento de MEV/EDS do Laboratório NanoLab.

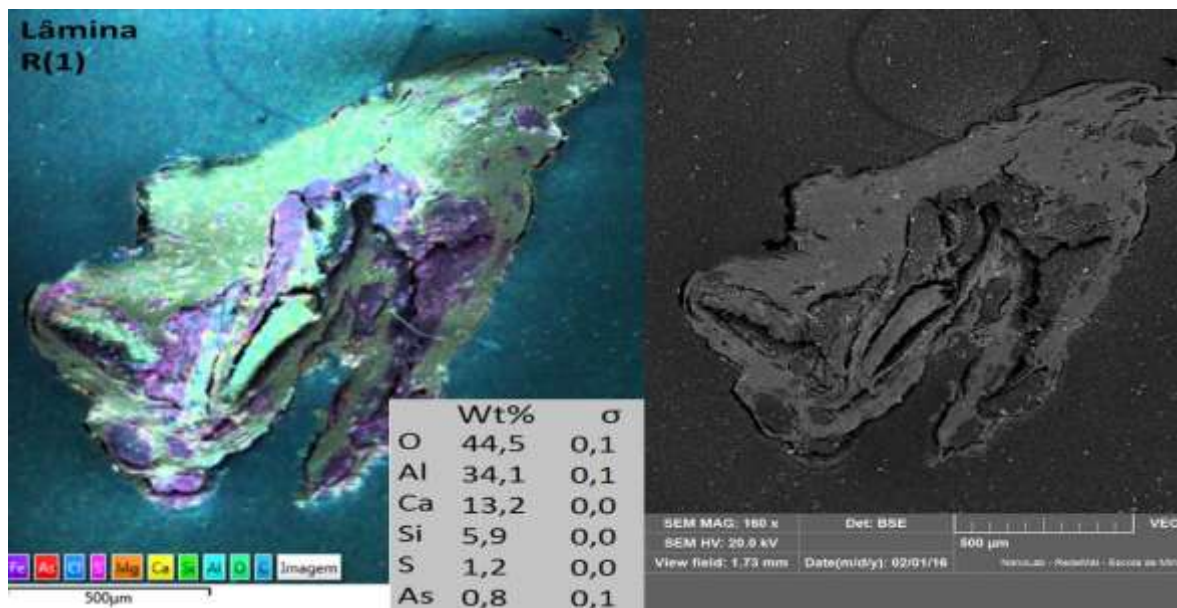
As figuras 6.11 e 6.12 correspondem as lâminas preparadas com as pérolas de BP, trazem os resultados obtidos pelo MEV/EDS. A estrutura das esferas foi parcialmente deformada pelo processo de dessecação e preparo das lâminas de sessão polida para as análises de microscopia mas as estruturas não foram destruídas. As pérolas, com tamanho aproximado de 1mm, foram visualizadas, porém, seus contornos apresentam-se irregulares.

Nas pérolas retiradas do Reator 1 (água de torneira), podemos observar que a estrutura celular não foi preservada, entretanto, esta imagem nos traz dados importantes sobre a imobilização de arsênio. A análise química indica a presença de 0,8% de arsênio na amostra, enquanto as esferas analisadas do Reator 2 (água destilada) não possuíam o metaloide.

Assim, podemos inferir que existe afinidade da superfície das esferas pelo metaloide nesta condição, o que pode ser explicado pela maior concentração de íons dissolvidos na água de torneira que pode influenciar positivamente na remoção de As, possivelmente, por precipitação na superfície e no interior das esferas. Além disso, a água de torneira, por ser mais rica em sais e micronutrientes essenciais para o crescimento microbiano, pode, também, contribuir para a redução biológica do sulfato, aumentando, assim, a produção de sulfeto biogênico que, por sua vez, também contribui positivamente para a remoção de As na forma de sulfetos arsenicais. Essa metodologia de encapsulação por alginato de cálcio vem sendo muito utilizada para aumentar a produção de metabólitos

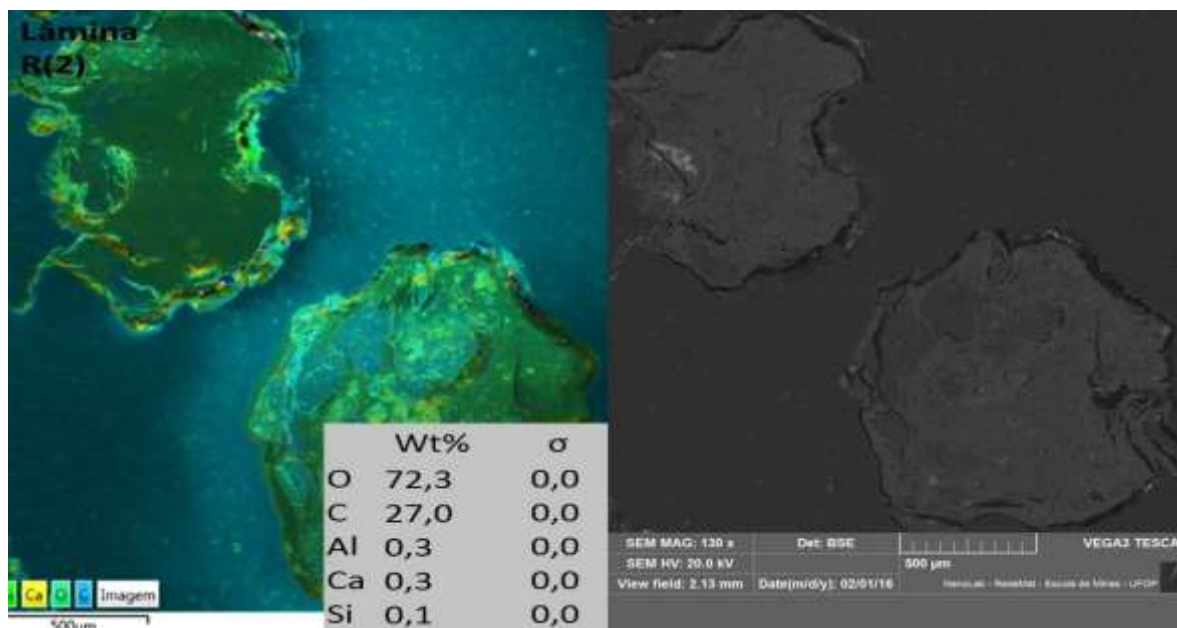
microbianos, bem como nos processos de biorremediação para degradação de compostos xenobióticos (COVIZZI et al., 2007).

Figura 6.11: Análise de MEV/EDS de uma preparação laminar de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 1 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira). Concentração de As inicial de 8mg.L^{-1} ; pH 5,0; $T=34^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6.12: Análise de MEV/EDS de uma preparação laminar de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 2 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água destilada). Concentração de As inicial de 8mg.L-1; pH 5,0; T=34°C.



Fonte: Próprio autor.

As Figuras 6.13 e 6.14 trazem as imagens obtidas por MEV a partir das amostras contendo esferas secas, recobertas com uma fita de carbono.

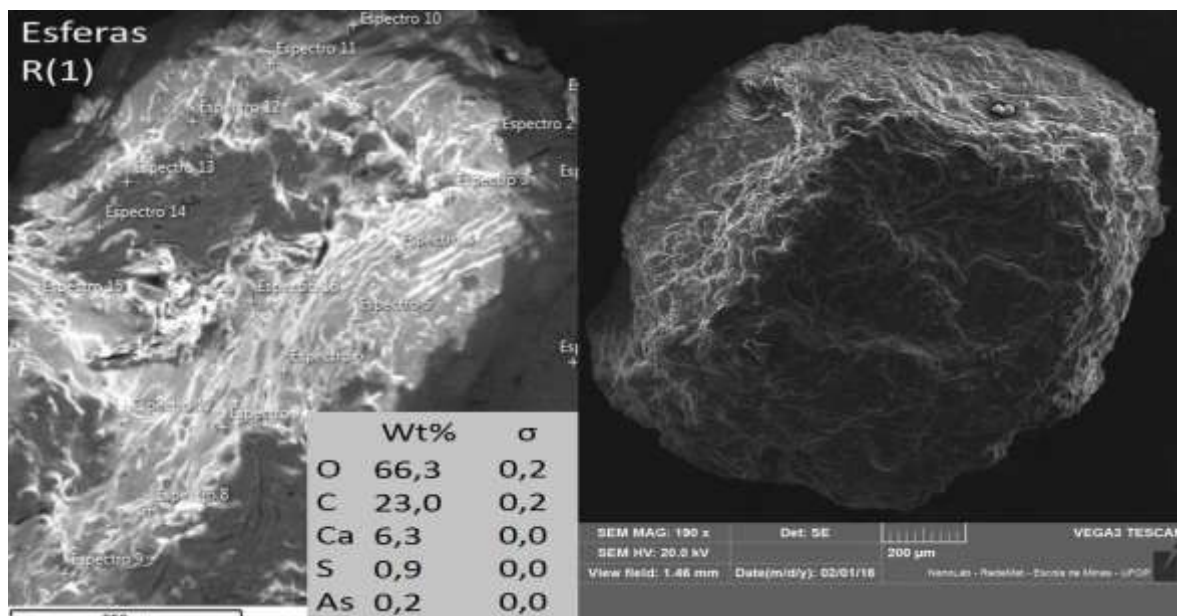
Nas imagens pode-se observar que a estrutura das pérolas foi melhor preservada, mesmo após as mesmas terem sido submetidas a processo de dessecação. Tratam-se de estruturas arredondadas e de aparência porosa e, novamente, observam-se diâmetros aproximados de 1000 μ m.

Ao contrário da análise anterior, neste caso encontrou-se arsênio, associado a presença de enxofre e cálcio, nas amostras provenientes dos dois reatores. A associação destes três elementos já foi observada em precipitados onde se utilizava Bactérias Redutoras de Ferro para imobilização de arsênio (LIM et al., 2008). Neste trabalho aqui apresentado, houve a adição de arsênio (As(III)); enxofre, na forma de sulfato, e cálcio, para a produção das pérolas, assim, a ocorrência dos três elementos na estrutura dos precipitados é compatível com a composição do meio.

Nas condições experimentais empregadas neste trabalho, pH 5,0 e Eh -200 a -300mV, segundo o diagrama Eh/pH, é de se esperar que a forma sólida predominante do arsênio seja o As_2S_3 . Infelizmente, a metodologia experimental aqui utilizada não nos permite identificar, com segurança, as composições químicas dos produtos sólidos gerados. Entretanto, pode-se inferir que, dadas às proporções químicas dos elementos identificados

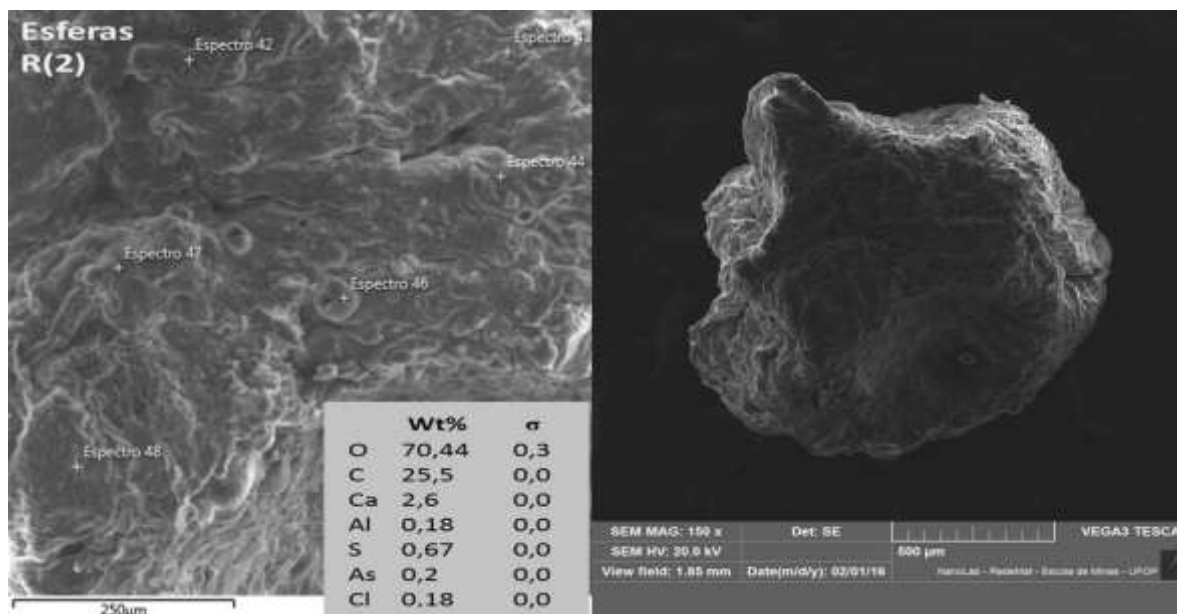
pela análise de EDS, que a concentração de enxofre é mais de três vezes maior que a do As, portanto, seria possível a formação deste composto em ambos os casos (1 e 2).

Figura 6.13: Análise de MEV/EDS de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 1, secas em estufa de secagem (35°C). Condições: fontes de sulfato, BP imobilizada, água de torneira, As(III), 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6.14: Análise de MEV/EDS de esferas de alginato de cálcio com biomassa imobilizada do Reator 2 secas em estufa de secagem (35°C). Condições: fontes de sulfato, BP imobilizada, água destilada, As(III), 8mg.L⁻¹; pH 5,0; T=34°C.

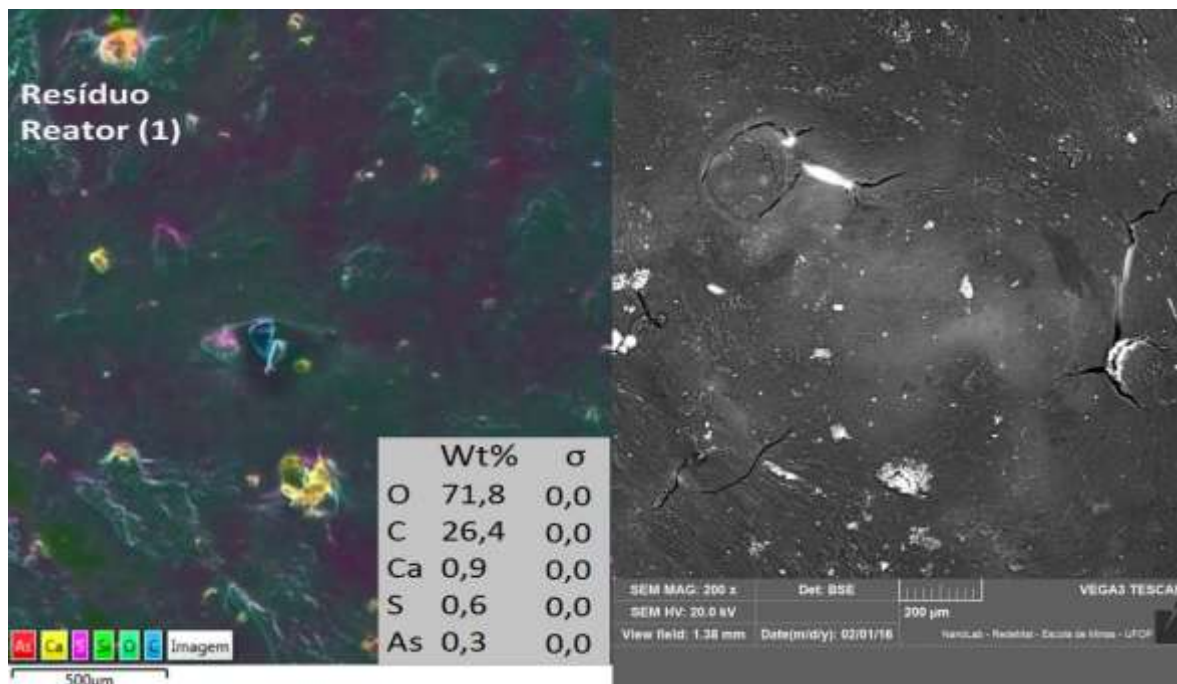


Fonte: Próprio autor.

Na investigação dos resíduos do reator 1 e 2 foi possível identificar novamente a presença dos elementos enxofre e arsênio e neste caso, a concentração do primeiro elemento foi sempre o dobro da concentração do segundo (**Figura 6.15** e **Figura 6.16**). Considerando-se que, nas condições de operação do reator os resíduos foram formados e coletados na região mais anóxica, podemos concluir que ocorreu a redução de sulfato pelas BRS resultando na precipitação do metaloide na sua forma de sulfeto, a partir da reação do As(III) presente na alimentação do reator com o sulfeto biogênico gerado em condição de baixa pressão de oxigênio. Assim, o crescimento das células microbianas nas demais zonas do reator torna-se menos inibido pela presença de íons tóxicos, uma vez que parte do sulfeto e do As(III) presentes no meio foram removidos por precipitação. A fração de As(III) remanescente é precipitada/adsorvida pelas pérolas de alginato de cálcio contendo BP e células microbianas ativas conforme foi demonstrado.

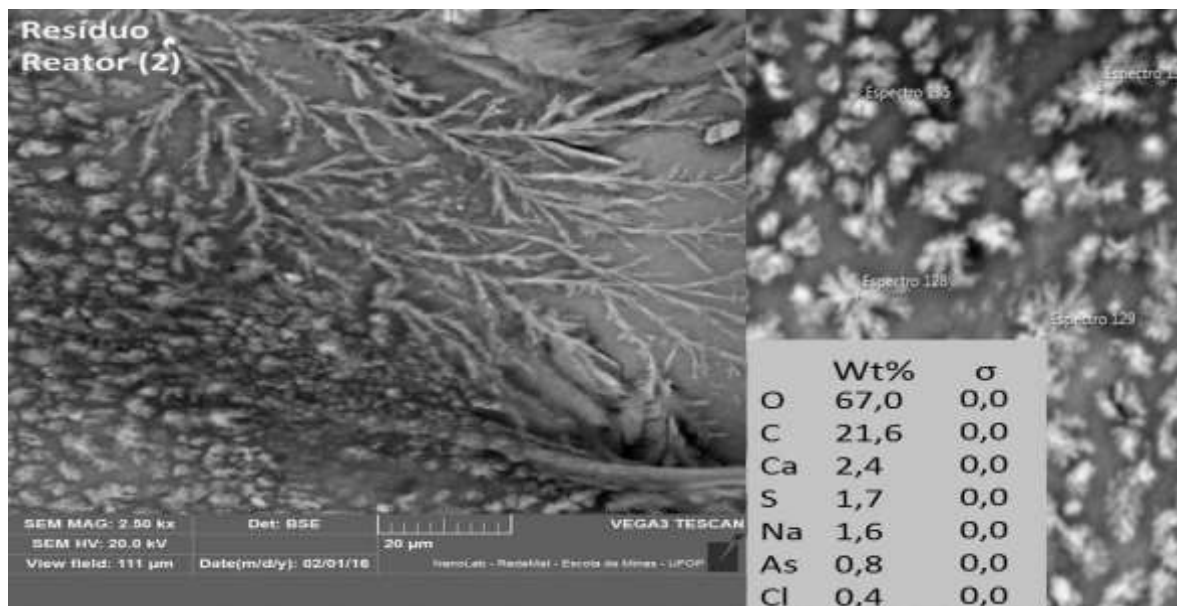
Assim sendo, podemos entender que o processo de remoção do arsênio no interior do reator dá-se por duas formas: adsorção nas pérolas de biomassa e precipitação na forma de sulfeto. A precipitação do metaloide fica mais evidenciada na **Figura 6.16**, na qual consegue-se identificar a formação de cristais, os quais tem em sua formação enxofre e arsênio.

Figura 6.15: Análise de MEV/EDS do resíduo formado no Reator 1 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água de torneira). Concentração de As inicial de 8mg.L-1; pH 5,0; T=34°C.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6.16: Análise de MEV/EDS do resíduo formado no Reator 2 (fontes de sulfato, BP imobilizada e água destilada). Concentração de As inicial de 8mg.L-1; pH 5,0; T=34°C.



Fonte: Próprio autor.

7 CONCLUSÕES

A metodologia aqui proposta é promissora e apresenta uma nova abordagem que visa a solução de diversos entraves experimentais descritos por diferentes pesquisadores, a saber:

- dispensa a etapa de correção de pH do efluente;
- dispensa a etapa de oxidação do As(III) a As(V);
- possibilita a diminuição com gastos para aquisição de fontes de carbono com composição química definida e de alto custo;
- diminui as perdas durante a operação do reator.

O presente trabalho comprovou a viabilidade do emprego de uma metodologia biotecnológica utilizando Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) para a remoção concomitante de arsênio trivalente e sulfato em meio ácido em uma única célula de reação, sem a necessidade de neutralização do pH ou oxidação prévia do arsenito adicionado ao sistema.

As remoções de sulfato e arsênio alcançadas foram satisfatórias. O sistema mostrou-se eficaz utilizando glicerol e biomassa proteica como fontes alternativas de carbono. Além disso, tanto a biomassa protéica quanto a biomassa microbiana foram imobilizadas de maneira eficiente em pérolas de alginato de cálcio, que se mostraram resistentes durante todo tempo de realização dos experimentos (150 dias), evitando a perda de massa.

Todos os parâmetros analisados, tanto em sistema semi-contínuo quanto em batelada mostraram desempenhos semelhantes. Nos testes em batelada, os parâmetros analisados evidenciaram que o meio de cultivo, bem como o pH ácido, não foram inibitórios para os micro-organismos empregados. Tais resultados, se comparados com os já descritos na literatura, são inovadores, principalmente tendo em conta o fato dos experimentos haverem sido realizados em meio ácido, pH 5,0, e na presença dos íons arsenicais trivalentes As(III), reconhecidamente mais tóxicos aos organismos vivos.

A imobilização da biomassa proteica em alginato de cálcio foi de grande importância evitando-se, assim, que no cultivo em sistema semi-contínuo houvesse perda

tanto de biomassa microbiana quanto de biomassa proteica, durante o todo o tempo de operação dos reatores.

A biomassa proteica teve sua capacidade de adsorção de As preservada, mesmo após o processo de imobilização com alginato de cálcio. Sua capacidade adsortiva, entretanto, mostrou-se dependente da atividade microbiana. Ainda, as análises dos precipitados formados na porção inferior dos reatores apontaram a ocorrência de compostos de enxofre e arsênio, sendo esta uma evidência da redução biológica de sulfato no interior dos reatores e da imobilização do As por bioprecipitação.

Em ambiente anóxico, as BRS promoveram a redução do sulfato adicionado, originando sulfetos solúveis que, por sua vez, reagem com os íons arsenicais em solução, precipitando-os na forma de seus sulfetos insolúveis. Além disso, parte do sulfeto biogênico produzido interage com a biomassa proteica, reduzindo-a e aumentando a sua afinidade pelos íons arsenicais trivalentes, que são adsorvidos pelas pérolas de alginato de sódio.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Mesmo respondendo a diversas perguntas existentes, vários aspectos ainda podem ser investigados e melhor estudados a fim de que o processo seja melhor compreendido e otimizado e, assim, possa sua utilização ser em larga escala.

- Análises complementares dos produtos sólidos gerados, possivelmente com emprego de técnicas de difração de Raios-X e espectroscopia (Raman, Absorção de Raios-X- XANES e EXAFS)
- Construção de um reator em maior escala, com operação contínua, utilizando efluente real de indústrias de mineração e metalurgia.
- Identificação da capacidade de adsorção das esferas de alginato de cálcio no interior do reator.
- Diminuição do “head space” do reator.
- Controle de DQO remanescente após o tratamento realizado.

8. PRODUÇÕES

- TEIXEIRA, M. C. ; COSTA, P. F. ; **MATOS, L. P.** . 'Bioimobilização de Arsênio e Sulfato em Efluentes'. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI102012022692, data de depósito: 10/09/2012, título: "Bioimobilização de Arsênio e Sulfato em Efluentes" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- **MATOS, L. P.**; COSTA, P. F. ; TEIXEIRA, M.C. . (Bio)Precipitation of Trivalent Arsenic Using an Anaerobic Bioreactor. 20th International Biohydrometallurgy Symposium.(Bio)Precipitation of Trivalent Arsenic Using an Anaerobic Bioreactor. Antofagasta, Chile. 2013.
- **DE MATOS, LETÍCIA PAIVA**; FREITAS, PATRICIA ; TEIXEIRA, MÔNICA CRISTINA . (Bio)Precipitation of Trivalent Arsenic Using an Anaerobic Bioreactor. Advanced Materials Research (Online), v. 825, p. 544-547, 2013.
- **MATOS, L. P.**; GOMES, P. C. S. ; TEIXEIRA, M. C. . Arsenic bioprecipitation. Seminário Ciências Farmacêuticas, 2015. Ouro Preto, Minas Gerais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIANISA, H. A.; ITO, A.; SASAKI, A.; AIZAWA, J.; UMITA, T. Biotransformation of arsenic species by activated sludge and removal of bio-oxidised arsenate from wastewater by coagulation with ferric chloride. *Water Research*, v. 42, n. 19, p. 4809–17, 2008.

BARBOSA, L. D. P. Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na bioremediação de efluentes ácidos contendo metais. (Dissertação de Mestrado), Departamento de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

BARBOSA, L. DE P.; BERTOLINO, S. M.; COSTA, P. F. C.; PINA, P.; LEÃO, V. A.; TEIXEIRA, M. C.; Effects of different COD/Sulfate ratios on the growth of metal tolerant sulfate reducing bacteria. *Advanced Materials Research (Online)*, v. 71-73, p. 569–572, 2009.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; LA GUARDIA, M. DE. Especificação de arsênio - uma revisão. *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 59–70, 2000.

BATTAGLIA-BRUNET, F.; CROUZET, C.; BURNOL, A.; COULON, S. M.; JOULIAN, C. Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. *Water Research*, v. 46, n. 12, p. 3923–33, 2012.

BERTOLINO, S. M. Estudo da redução de sulfato em reatores contínuos utilizando glicerol. (Tese de Doutorado), Departamento de Ciências de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

BERTOLINO, S. M.; MELGAÇO, L. A.; SÁ, R. G.; LEÃO, V. A. Comparing lactate and glycerol as a single-electron donor for sulfate reduction in fluidized bed reactors. *Biodegradation*, v. 25, n. 5, p. 719–733, 2014.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Geociências Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Revista Escola de Minas*, v. 57, n. 1, p. 45–51, 2004.

BRASIL. DECRETO Nº 24.643, de 10 de julho de 1934. Decreta o Código de Águas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Disponível em

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d24643.htm> acesso em Setembro de 2014.

BRASIL. Decreto nº 49.974-A, de 21 de Janeiro de 1961. Regulamenta, sob a denominação de Código Nacional de Saúde, a Lei nº 2.312, de 3 de setembro de 1954, de normas gerais sobre defesa e proteção da saúde. . Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, seção 1, p. 1027, 23 jan, 1961.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, n. 239, p. 39-46, setembro, 2014.

CASTRO, J. M.; MOORE, J. N. Pit lakes : their characteristics and the potential for their remediation. *Environmental Geology*, v. 39, n. 11, p. 1254–1260, 2000.

CHOU, H.-H.; HUANG, J.-S.; CHEN, W.-G.; OHARA, R. Competitive reaction kinetics of sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic filters. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 17, p. 8061–7, 2008.

COSTA, M. C.; SANTOS, E. S.; BARROS, R. J.; PIRES, C.; MARTINS, M. Wine wastes as carbon source for biological treatment of acid mine drainage. *Chemosphere*, v. 75, n. 6, p. 831–6, 2009.

COSTA, P. F. Cultivo de Bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na remoção de sulfato e arsênio utilizando pó de penas de galinha como substrato orgânico. (Dissertação de Mestrado), Departamento de Pós graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

COSTA, P. F.; MATOS, L. P.; LEÃO, V. A.; TEIXEIRA, M. C. Bioremoval of arsenite and sulfate by a mixed culture with sulfate-reducing capacity growing on powdered chicken feathers. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, n. 1, p. 70–75, 2014.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. vol. 28, no 2. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, n. 2, p. 143–160, 2007.

CULPI, T. A.; PASQUALIM, P.; FIN, M. T.; Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de Ca^{2+} -Alginato. *Visão Acadêmica*, v. 11, n. 1, p. 38–44, 2010.

DESCHAMPS, E.; CIMINELLI, V. S. T.; LANGE, F. T.; MATSCHULLAT, J.; RAUE, B. and SCHMIDT, H. Soil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil. *J Soils & Sediments*, v. 2, n. 4, p. 216–222, 2002.

DINKEL, V. G.; FRECHEN, F. B.; DINKEL, A. V.; SMIRNOV, Y. Y.; KALYUZHNYI, S. V. Kinetics of anaerobic biodegradation of glycerol by sulfate-reducing bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 46, n. 7, p. 712–718, 2010.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, v.35, n. 6, 2011.

FIGUEIREDO, B. R.; BORBA, R. P.; ANGÉLICA, R. S. Arsênio no Brasil e exposição humana. In: C. Roberto da Silva; B. R. Figueiredo; E. de M. Capitani; G. Cunha (Eds.); *Geologia Médica no Brasil : Efeitos dos materiais e fatores geológicos na saúde humana e meio ambiente*. p 220, 2006. Rio de Janeiro.

GHAZY, E.A.; MAHMOUD, M.G.; ASKER, M.S.; MAHMOUD, M. M.; ELSOUND, A.; ABDEL SAMI, M.E. Cultivation and detection of sulfate reducing bacteria (SRB) in Sea Water. *Journal of American Science*, v. 7, n. 2, p. 604–608, 2011.

GIBSON, G. R. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *The Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, n. 6, p. 769–97, 1990.

GIESE, E. C. Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2015.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. Arsênio – Uma revisão histórica *. *Anais-80 anos*, v. 80, n. 1, p. 81–86, 2005.

GUO, X.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M. Immobilization of *Rhodococcus* sp . AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans -2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1–5, 2006.

KAILASAM, V.; ROSENBERG, E.; NIELSEN, D. Characterization of surface-bound Zr (IV) and its application to removal of As (V) and As (III) from aqueous systems using

phosphonic acid modified nanoporous silica. *Industrial Engineering Chemical Research*, v. 48, n. 8, p. 3991–4001, 2009.

KAKSONEN, A.H., FRANZMANN, P. D.; PUHAKKA, J. A. Performance and ethanol oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation*, v. 14, p. 207–217, 2003.

KOLMERT, A; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K. B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, n. 3, p. 179–84, 2000.

LATIF, M. A.; GHUFRAN, R.; WAHID, Z. A.; AHMAD, A. Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters. *Water Research*, v. 45, n. 16, p. 4683–99, 2011. Elsevier.

LIAO, V. H. C., CHU, Y. J., SU, Y. C., HSIAO, S. Y., WEI, C. C., LIU, C. W., LIAO, C. M., SHEN, W. C., CHANG, F. J. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 123, p. 20-29, 2011.

LIÈVREMONT, D.; BERTIN, P. N.; LETT, M.-C. Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie*, v. 91, n. 10, p. 1229–37, 2009.

LIM, M. S.; YEO, I. W.; ROH, Y.; LEE, K. K.; JUNG, M. C. Arsenic reduction and precipitation by *Shewanella* sp.: Batch and column tests. *Geosciences Journal*, v. 12, n. 2, p. 151–157, 2008.

LIZAMA A, K.; FLETCHER, T. D.; SUN, G. Removal processes for arsenic in constructed wetlands. *Chemosphere*, v. 84, n. 8, p. 1032–43, 2011.

LOPES, L. R. Influência de Fatores Biológicos na Mobilidade de Arsênio Presente em Solos da Cidade de Ouro Preto – Estudos “ in vitro ”. (Dissertação de Mestrado), Departamento de Pós graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

LUO, Q.; TSUKAMOTO, T. K.; ZAMZOW, K. L.; MILLER, G. C. Arsenic, selenium, and sulfate removal using an ethanol-enhanced sulfate-reducing bioreactor. *Mine Water and the Environment*, v. 27, n. 2, p. 100–108, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. In: *Microbiologia de Brock*. Prentice Hall, 2004.

MALIK, A. H.; KHAN, Z. M.; MAHMOOD, Q.; NASREEN, S.; BHATTI, Z. A. Perspectives of low cost arsenic remediation of drinking water in Pakistan and other countries. *Journal of Hazardous Materials*, v. 168, n. 1, p. 1–12, 2009.

MARTINS, M.; FALEIRO, M. L.; BARROS, R. J.; VERÍSSIMO, A. R.; COSTA, M. C. et al. Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of hazardous materials*, v. 166, n. 2-3, p. 706–13, 2009.

MARTINS, M.; FALEIRO, M. L.; BARROS, R. J.; VERÍSSIMO, A. R.; COSTA, M. C. Biological sulphate reduction using food industry wastes as carbon sources. *Biodegradation*, v. 20, n. 4, p. 559–67, 2009.

MATHEWS, V.; CHENDAMARAI, E.; GEORGE, B.; VISWABANDYA, A.; SRIVASTAVA, A. Treatment of acute promyelocytic leukemia with single-agent arsenic trioxide. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 3, n. 1, p. e2011056, 2011.

MATOS, L. P. DE; FREITAS, P.; TEIXEIRA, M. C. (Bio)Precipitation of Trivalent Arsenic using an anaerobic bioreactor. *Advanced Materials Research*, v. 825, p. 544–547, 2013.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U. Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents--A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 142, n. 1-2, p. 1–53, 2007.

MOREIRA, M. Identificação de consórcio bacteriano com potencial para biorremediação de arsênio e sulfato. (Dissertação de mestrado), Departamento de Pós graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por micro-organismos. *Polímeros*, v. 21, n. 4, p. 305–310, 2011.

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

NETO, J. DE O. M.; BELLATO, C. R.; MILAGRES, J. L.; PESSOA, K. D.; ALVARENGA, E. S. Preparation and evaluation of chitosan beads immobilized with

Iron(III) for the removal of As(III) and As(V) from Water Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 24, n. 1, p. 121–132, 2013.

PANDEY, P. K.; CHOUBEY, S.; VERMA, Y.; PANDEY, M.; CHANDRASHEKHAR, K. Biosorptive removal of arsenic from drinking water. Bioresource Technology, v. 100, n. 2, p. 634–7, 2009.

POSTGATE, J. R.; GAL, J. L. The physiology of sulphate-reducing bacteria. Advances in Microbial Physiology, . 1973.

RAMPINELLI, L. R.; AZEVEDO, R. D.; TEIXEIRA, M. C.; GUERRA-SA, R.; LEÃO, V. A. A sulfate-reducing bacterium with unusual growing capacity in moderately acidic conditions. Biodegradation, v. 19, n. 5, p. 613–619, 2008.

SCAPIM, M. R. S.; LOURES, E. G.; ROSTAGNO, H.; CECON, P. R.; SCAPIM, C. A. Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. Acta Scientiarum Animal Sciences, v. 25, n. 1, p. 91–98, 2003.

SILVA, A.J., HIRASAWA, J.S., VARESCHE, M.B., FORESTI, E., ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic Archaea. *Anaerobe*, v. 12, p. 93–98, 2006.

SPERLING, M. VON. Análise dos padrões brasileiros de qualidade de corpos d'água. Revista Brasileira de Recursos Hídricos, v. 3, n. 031, p. 111–132, 1998.

SULLIVAN, C.; TYRER, M.; CHEESEMAN, C. R.; GRAHAM, N. J. D. Disposal of water treatment wastes containing arsenic - A review. Science of the Total Environment, v. 408, n. 8, p. 1770–1778, 2010.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATİ, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. Biochemical Engineering Journal, v. 44, n. 1, p. 73–94, 2009.

TECLU, D.; TIVCHEV, G.; LAING, M.; WALLIS, M. Bioremoval of arsenic species from contaminated waters by sulphate-reducing bacteria. Water Research, v. 42, n. 19, p. 4885–4893, 2008.

TECLU, D.; TIVCHEV, G.; LAING, M.; WALLIS, M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. Journal of Hazardous Materials, v. 161, n. 2-3, p. 1157–65, 2009.

TEIXEIRA, M. C. "Mechanism of selective As (III) biosorption onto fibrous protein rich waste material," 2004. Universidade Federal de Minas Gerais.

TEIXEIRA, M. C.; CIMINELLI, V. S. T. Development of a biosorbent for arsenite: Structural modeling based on X-ray spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 3, p. 895–900, 2005.

TEIXEIRA, M. C.; CIMINELLI, V. S. T.; DANTAS, M. S. S.; DINIZ, S. F.; DUARTE, H. A. Raman spectroscopy and DFT calculations of As(III) complexation with a cysteine-rich biomaterial. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 315, n. 1, p. 128–134, 2007.

TRINDADE, R. DE B. E.; SOARES, P. S. M. Tecnologia de sistemas passivos para o tratamento de drenagem ácida de minas. Rio de Janeiro, 2004.

TSALEV, D. L.; ZAPRIANOV, Z. K. Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. CRC Press, Flórida, p. 137–150, 1985.

USEPA. National Primary Drinking Water Regulations, Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. *Federal Register*, v. 65, n. 121, p.38888-38983. 2000.

VELASCO, A.; RAMÍREZ, M.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; REVAH, S. Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 2-3, p. 407–413, 2008.

VIGGI, C. C.; PAGNANELLI, F.; CIBATI, A.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; TORO, L. Biotreatment and bioassessment of heavy metal removal by sulphate reducing bacteria in fixed bed reactors. *Water research*, v. 44, n. 1, p. 151–8, 2010.

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. *Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG*. 3a ed., v. 1, p. 452, 2005.

WHO. ARSENIC IN DRINKING WATER. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic/en/> Acesso Dez 2014.

ZHAO, Y.-G.; WANG, A.-J.; REN, N.-Q. Effect of carbon sources on sulfidogenic bacterial communities during the starting-up of acidogenic sulfate-reducing bioreactors. *Bioresource technology*, v. 101, n. 9, p. 2952–9, 2010.

ZOUBOULIS, A. I.; KYDROS, K. A.; MATIS, K. A. Removal of hexavalent chromium anions from solutions by pyrite fines. *Water Research*, v. 29, n. 7, p. 1755–1760, 1995.