



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

“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.”

Autora: Patrícia Freitas Costa

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão

Fevereiro - 2012

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

Patrícia Freitas Costa

“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 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: Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Mônica Cristina Teixeira
Co-Orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão

Ouro Preto, MG

Fevereiro – 2012

C837c Costa, Patrícia Freitas.

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 [manuscrito] / Patrícia Freitas Costa - 2012.

vii, 69f.: il., color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina Teixeira.

Co-orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Programa de Pós - graduação em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Saneamento Ambiental.

1. Resíduos industriais - Teses. 2. Biorremediação - Teses. 3. Bactérias redutoras de sulfato - Teses. 4. Arsênio - Teses. 5. Efluente - Qualidade - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



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.

Autora: Patrícia de Freitas Costa

Dissertação defendida e aprovada, em 27 de fevereiro de 2012, pela banca examinadora constituída pelos professores:

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

Professor Dr. Versiane Albis Leão
Universidade Federal de Ouro Preto

Dr.ª. Grazielle Duarte
Universidade Federal de Minas Gerais

Professora Dr.ª. Silvana de Queiroz Silva
Universidade Federal de Ouro Preto

Agradecimentos

Ninguém trilha um caminho sozinho, e é por isso, que após uma caminhada é muito bom olhar para trás e reconhecer aqueles que foram o alicerce não somente na vida profissional, mas também pessoal.

Assim, agradeço imensamente a todos que fizeram parte dessa minha trajetória.

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais e irmãos, que compreenderam e apoiaram minha decisão.

Tão importante quanto, agradeço aos meus orientadores, Mônica Cristina Teixeira e Versiane Albis Leão pela oportunidade e pela confiança desde a Iniciação Científica, momento onde foi despertado o amor à pesquisa.

Agradeço também ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, PROAMB, e a todos os professores pelo suporte e por complementar minha formação.

Ao laboratório de Biotecnologia Ambiental, lugar onde fiz amigas que deram o maior suporte pessoal e profissional. Agradeço imensamente à ajuda de todas nos momentos em que a frustração estava presente, que a ansiedade e o medo de falhar tomavam conta de mim. Em especial, Letícia de Paiva Matos, Mariana Moreira e Keici Guedes. Obrigada pela amizade.

Pelo apoio incondicional, o despertar para a pesquisa, os conselhos e sugestões sábias; agradeço ao Leonardo de Paiva Barbosa. Agradeço também por estar ao meu lado nos dias difíceis e compartilhar os dias bons. Sem amor nada é conquistado.

Obrigada aos laboratórios de Controle de Qualidade (EFAR) e Geoquímica (DEGEO) pelo suporte material e pela realização das análises. Em especial, o laboratório de Bio&Hidrometalurgia (UFOP), onde encontrei pessoas queridas que sempre me ajudaram e incentivaram. Agradeço em especial à Sueli Bertolino, cuja ajuda foi imprescindível.

Agradeço aos meus amigos de Ouro Preto, principalmente às amigas Utopianas, que mesmo sem entender ao certo minhas preocupações durante a realização desse trabalho, apoiaram sempre.

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto, por me propiciar mais essa conquista em minha vida. E à CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
Resumo	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1 Resíduos líquidos e legislação brasileira	4
3.2 Arsênio	6
3.3 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	11
3.3.1 Relação DQO/sulfato.....	19
3.4 Interações entre micro-organismos e os metais	20
4. Materiais e Métodos	23
4.1 Área de coleta	23
4.2 Enriquecimento das amostras	23
4.3 Caracterização do pó de penas.....	24
4.4 Avaliação do substrato orgânico na remoção de sulfato	26
4.4.1 Lactato como substrato orgânico	26
4.4.2 Pó de penas como substrato orgânico	27
4.5 Relação entre substrato e remoção de As^{3+}	28
4.5.1 Enriquecimento da cultura mista de BRS contendo As^{3+}	28
4.5.2 Lactato como substrato orgânico	29
4.5.3 Pó de penas como substrato orgânico	29
4.6 Métodos Analíticos.....	32
4.7 Atividade metabólica de BRS em condição semi-contínua.....	33
5. Resultados e discussão	36
5.1 Coleta e Enriquecimento das BRS.....	36
5.3 Relação entre o substrato orgânico e o metabolismo das BRS	39
5.3.1 Potencial de oxi-redução (Eh) e pH.....	39
5.3.2 Crescimento Microbiano (Densidade Óptica)	43
5.3.4 Consumo biológico de sulfato	44
5.3.5 Imobilização de As^{3+}	49

5.4 Atividade Metabólica das BRS em condição semi-contínua.....	52
5.4.1 Avaliação do potencial de oxi-redução (Eh) e pH do meio.....	52
5.4.2 Consumo de sulfato	53
5.4.3 Imobilização do As^{3+}	56
6. Conclusões.....	58
7. Sugestões para trabalhos futuros	59
8. Produção científica	60
9. Referências Bibliográficas.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Especiação do arsenito (esquerda) e arsenato (direita) em função do pH (Teclu <i>et al.</i> , 2008).....	7
Figura 3.2. Principais processos de imobilização das espécies de arsênio As^{3+} e As^{5+} e a interação com outros elementos químicos. Extraído e adaptado de Lizama <i>et al.</i> (2011). ...	9
Figura 3.3. Representação esquemática do ciclo do enxofre. Extraído e adaptado de Tang <i>et al.</i> (2009).	12
Figura 3.4. Vias de degradação microbiana de matéria orgânica em ambientes anóxicos na presença (a) e na ausência de sulfato (b). Extraído de Barbosa (2009).....	14
Figura 3.5. Esquema do processo de redução de sulfato e imobilização de zinco em sistema THIOPAQ (Paques). Extraído e adaptado de Muyzer <i>et al.</i> (2008).....	18
Figura 4.1. Vista da Lagoa do Gambá, Ouro Preto – MG.....	23
Figura 4.2. Pó de penas comercial. Mistura de penas, vísceras trituradas e sangue cozido.	25
Figura 4.3. Frascos de vidro (600mL) utilizados para os testes de remoção de sulfato e arsênio contendo apenas lactato como substrato orgânico.	29
Figura 4.4. Frascos de vidro (600mL) utilizados nos testes de remoção de sulfato e As^{3+} contendo pó de penas.....	30
Figura 4.5. Fluxograma representando desde a coleta do sedimento para obtenção da cultura mista de BRS até os ensaios realizados em diferentes condições de cultivo.	31
Figura 4.6. Esquema (esquerda) e foto (direita) representando o reator semi-contínuo.	34
Figura 5.1. Amostra LG. Cultivo em meio líquido, a 35°C, pH 7,0. Presença (esquerda) e ausência (direita) de precipitação negro, característico do crescimento de BRS.	36
Figura 5.2. Valores de Eh em relação às diferentes condições avaliadas: A e B – Lactato, C e D – Lactato (1,2g.L ⁻¹) e pó de penas (diferentes concentrações), E e F – Pó de penas (diferentes concentrações). Ausência (linha tracejada) e presença de As^{3+} (linha sólida). Para A e B: ○ razão DQO/sulfato 0,67; Δ razão 1; □ razão 2; ◇ razão 3; linha preta: controle abiótico. Para C, D, E e F: azul: 1% de pó de penas, laranja: 2%, verde: 3%, vermelho: 4% e preto: controle abiótico.....	40
Figura 5.3. Valores de pH nas diferentes condições estudadas: A e B – Lactato, C e D – Lactato (1,2g.L ⁻¹) e pó de penas, E e F – Pó de penas. Ausência (linha tracejada) e presença de As^{3+} (linha sólida). Para A e B: ○ razão DQO/sulfato 0,67; Δ razão 1; □ razão 2; ◇ razão 3; linha preta: controle abiótico. Para C,D,E e F: azul: 1% de pó de penas, laranja: 2%, verde: 3%, vermelho: 4% e preto: controle abiótico.	42
Figura 5.4. Densidade Óptica em meio contendo lactato de sódio, na ausência (A) e presença de As^{3+} (B). Azul – razão 0,67; laranja – 1; verde – 2; vermelho – 3 e preto – controle abiótico.	44

Figura 5.5. Consumo biológico de sulfato em relação às diferentes condições estudadas: A e B - Lactato, C e D – Lactato e pó de penas, E e F – Pó de penas. Ausência (linha tracejada) e presença de As^{3+} (linha contínua). Para A e B: $\circ$ razão DQO/sulfato 0,67; Δ razão 1; $\square$ razão 2; $\diamond$ razão 3; linha preta: controle abiótico. Para C,D,E e F: azul: 1% de pó de penas, laranja: 2%, verde: 3%, vermelho: 4% e preto: controle abiótico.	47
Figura 5.6. Remoção de arsênio em relação ao consumo de sulfato nas diferentes condições de cultivo, A: lactato (razão 3) e As^{3+} ; B: lactato ($1,2\text{ g.L}^{-1}$), pó de penas (4%) e As^{3+} ; C: pó de penas (4%) e As^{3+}	50
Figura 5.7. Relação entre os valores de pH e Eh ao longo da operação do reator semi-contínuo, nas diferentes condições estudadas.....	53
Figura 5.8. Relação entre a concentração de sulfato e os valores de Eh durante a operação do reator semi-contínuo nas diferentes condições analisadas.	56
Figura 5.9. Relação entre a remoção de As^{3+} e concentração de sulfato durante as fases 4 e 5 de operação do reator semi-contínuo	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição do meio de cultura utilizado para enriquecimento da cultura mista de BRS.....	24
Tabela 4.2. Concentração de lactato de sódio e sulfato total presente no meio de cultivo de acordo com as razões DQO/sulfato determinadas.....	27
Tabela 4.3. Composição da solução condicionante utilizada para análise da concentração de sulfato.	32
Tabela 4.4. Condições de operação do reator semi-contínuo em relação aos dias de operação.....	35
Tabela 5.1. Caracterização físico-química do pó de penas quanto à fração solúvel e insolúvel.	38
Tabela 5.2. Remoção biológica de sulfato e As^{3+} relacionado ao tipo de substrato orgânico e sua concentração no cultivo de BRS, na presença e ausência de As^{3+}	48
Tabela 5.3. Eficiência na remoção de sulfato nas diferentes fases de operação do reator semi-contínuo.	54

Resumo

A presença de arsênio (As) em efluentes industriais e em águas de consumo representa um grande risco aos organismos vivos. A remoção desse metalóide é realizada usualmente por meio de processos físico-químicos e mais raramente por processos biológicos. Neste trabalho, foi empregada uma metodologia biológica alternativa baseada no cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS), foi testado também um material residual de baixo custo ainda pouco explorado, o pó comercial de penas de galinha. Tal material foi avaliado quanto ao seu potencial em ser utilizado simultaneamente como fonte de matéria orgânica para o crescimento de BRS e material suporte sólido para imobilização de arsênio trivalente (As^{3+}). Os experimentos em batelada e em condições semi-contínuas compararam a eficiência de remoção de sulfato e As^{3+} na presença de dois substratos orgânicos distintos: lactato de sódio e/ou pó de penas de galinha. Em batelada, a remoção de As^{3+} aumentou consideravelmente quando o pó de penas foi acrescido ao sistema, de 38% para aproximadamente 80%, com concentração inicial de 4mg.L^{-1} . A condição semi-contínua foi testada utilizando um reator de fluxo ascendente, operado por 202 dias, no qual se obteve remoção de sulfato e As^{3+} de aproximadamente 84% e 98%, respectivamente; sendo a concentração inicial de sulfato de 2000mg.L^{-1} . Foram testadas duas concentrações iniciais de As, 4 e 8mg.L^{-1} . Na condição em batelada, na presença do pó de penas, a remoção de As^{3+} não foi fortemente relacionada à remoção de sulfato, comprovando a participação ativa do material residual na imobilização do metalóide. O presente estudo demonstra que o pó comercial de penas de galinha é um material interessante do ponto de vista de cultivo de BRS visando à remoção de As^{3+} em condições redutoras, dispensando a usual necessidade da presença de um agente oxidante forte que promova a oxidação prévia das espécies trivalentes de arsênio a fim de garantir sua remoção da fase líquida.

Abstract

The presence of arsenic (As) in industrial wastewater and in drinking water represents a major risk to living organisms. Removal of this metalloid is usually carried out through chemical processes and more rarely by biological processes. In this work we employed an alternative approach based on the cultivation of sulfate-reducing bacteria (SRB) using different carbon sources. A relatively unusual and low cost waste material was also tested during the experiments, the powdered chicken feathers. This material was evaluated according to its potential to be used as organic material source and/or as a solid material to guarantee the immobilization of trivalent arsenic species (As^{3+}). The batch and semi-continuous experiments were done in order to compare the efficiencies of sulfate and arsenite removal in the presence of two different organic substrates (sodium lactate and/or powdered chicken feathers). The As^{3+} removal obtained during batch experiments increased considerably when the powdered chicken feathers were added to the system, from 38% to 80%, approximately. The semi-continuous experiments were done using an up flow reactor, operated during 202 days. The observed sulfate and As^{3+} removal were approximately 84% and 98%, respectively. In batch conditions, and in the presence of powder feathers, removal of As^{3+} was not strongly related to the removal of sulfate thus demonstrating the active participation of the waste material in the immobilization of the metalloid. The present study demonstrates that the powdered chicken feathers is an interesting material for improving SRB growing and sulfate removal in the presence of arsenic trivalent ions under reducing conditions. The experimental approach for arsenic removal here described do not require the use of a strong oxidizing agent to promote the oxidation of the trivalent arsenic species in order to ensure removal of the liquid phase.

1. Introdução

O crescimento da atividade industrial observado nas últimas décadas trouxe como consequência o aumento na geração de resíduos e uma maior preocupação com a interferência que os mesmos podem causar ao ambiente se descartados de forma incorreta. A legislação brasileira é responsável por orientar ações que devem ser tomadas em relação ao descarte e tratamento de resíduos, porém o impasse entre a lei e seu cumprimento ainda é preocupante. É de fundamental importância que os resíduos sólidos e efluentes industriais, agrícolas, ou domésticos, tenham um tratamento adequado antes de serem descartados nos corpos hídricos ou nos solos.

Tanto resíduos gerados de forma natural quanto antropogênica, contêm uma série de compostos que podem ser bastante danosos ao ambiente e ao seres vivos (Latif *et al.*, 2011). Os metais, por exemplo, estão presentes em efluentes de indústrias metalúrgicas, de produção de corantes e tintas, galvanoplastia, produção de baterias e pilhas, em Drenagem Ácida de Mina (DAM), entre outros.

A DAM é um tipo de resíduo líquido gerada naturalmente, quando minerais sulfetados presentes em resíduos de mineração são oxidados em presença de água. Esta solução age como agente lixivante dos minerais presentes no resíduo produzindo um percolado rico em metais dissolvidos, e sulfato (Neculita *et al.*, 2007). Quando o mineral lixiviado é a arsenopirita, por exemplo, há a formação de um percolado rico em sulfato e arsênio, um metalóide bastante tóxico mesmo em baixas concentrações (na ordem de ppm).

O arsênio é considerado bastante tóxico aos organismos vivos, uma vez que, ao ser absorvido, a maior parte dos compostos contendo arsênio, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, acaba sendo convertida ao trióxido de arsênio, o qual reage muito rapidamente com os grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas, inibindo a ação de enzimas que contenham estes grupamentos em seus sítios ativos e bloqueando a respiração celular (Tsalev e Zaprianov, 1985).

A remoção de sulfato contido em efluentes pode ser obtida tanto física e quimicamente, quanto biologicamente por micro-organismos capazes de reduzir o sulfato presente no efluente em sulfeto. Nesse sentido, são reconhecidas as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) como o grupo microbiano empregado nesse tipo de tratamento biológico de efluentes (Upadhyaya *et al.*, 2010; Teclu *et al.*, 2009; Muyzer *et al.*, 2008).

A remoção de arsênio em águas contaminadas se dá, principalmente, pela conversão do arsênio solúvel numa fase insolúvel. Alguns métodos físico-químicos são

utilizados, como a adsorção de espécies de arsênio em óxido-hidróxidos de ferro ou alumínio, troca iônica e osmose reversa (Greenleaf, *et al.*, 2006; Badruzzaman, *et al.*, 2004; Ning, 2002). Contudo, a utilização de BRS nesse tipo de tratamento pode ser uma alternativa muito eficaz, uma vez que a reação entre o sulfeto e o metal (metalóide) solúvel produz um composto (sulfeto metálico) que possui uma solubilidade muito baixa se comparada aos óxido-hidróxidos metálicos. Além disso, o sulfeto metálico é um composto bastante estável, sendo uma forma mais segura de imobilização de um metal ou metalóide (Lens *et al.*, 2007).

Para o sucesso do tratamento biológico de efluentes utilizando as BRS, a escolha do substrato orgânico necessário para o cultivo desses micro-organismos é determinante. A natureza do substrato orgânico e sua concentração devem ser levadas em consideração (Barbosa, 2009; Velasco *et al.*, 2008). Com isso, o substrato orgânico utilizado pode representar um custo elevado ao processo. A escolha de materiais que muitas vezes são considerados resíduos de outros processos industriais, como substrato orgânico para o cultivo de BRS, pode ser uma boa alternativa para diminuir os custos do processo.

Alguns materiais como melaço (Teclu *et al.*, 2009), vinhaça (Martins *et al.*, 2009), resíduo da indústria de queijo (Costa e Duarte, 2005) foram avaliados como substrato orgânico para o cultivo de BRS, representando alternativas de interesse econômico. A busca de materiais alternativos para o cultivo de BRS é de suma importância para a viabilidade desse tipo de processo. Esse trabalho avalia o pó de penas comercial como um possível substrato orgânico para o cultivo de BRS, além disso, foi analisada a influência desse material na remoção de As^{3+} presente em solução.

2. Objetivos

O presente trabalho objetivou obter uma cultura mista de BRS capaz de remover sulfato e arsênio trivalente (As^{3+}) de um efluente sintético (meio de cultura acrescido de arsenito de sódio). A possível utilização de um material residual abundante e pouco utilizado, o pó comercial de penas e vísceras de galinha foi avaliada. Sua possibilidade de uso tanto como suporte sólido, para o crescimento das BRS, como fonte de nutrientes, foi analisada e esse composto foi comparado com o lactato de sódio como fonte de carbono. Foi também avaliada a influência do pó de penas no processo de imobilização do As^{3+} . Como objetivos específicos podem ser destacados:

- Selecionar uma cultura mista de micro-organismos capaz de crescer e consumir sulfato em meio de cultivo específico para crescimento de BRS (Postgate C Modificado) com lactato de sódio e/ou pó de penas como substrato orgânico.
- Caracterizar o material pó de penas quanto a composição físico-química e orgânica.
- Avaliar a eficiência de remoção de sulfato pelas cepas cultivadas nos substratos orgânicos estudados sob diferentes condições de cultivo.
- Determinar uma concentração de substrato orgânico ideal para o processo de redução de sulfato e utilizar essa condição para a análise da imobilização de As^{3+} em meio sintético.
- Comparar a eficiência na remoção de sulfato na presença e ausência de As^{3+} utilizando lactato de sódio e/ou pó de penas.
- Utilizar as melhores condições de cultivo em batelada e compará-las às condições semi-contínuas, utilizando um mini-reator.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Resíduos líquidos e legislação brasileira

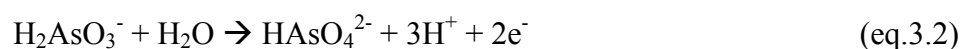
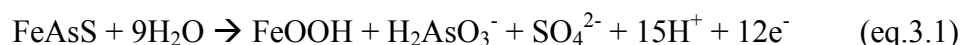
É recente a preocupação dos órgãos públicos em relação ao descarte de resíduos com alto poder poluidor, principalmente quando esses resíduos têm como destino os corpos hídricos. Em 1934, foi publicado o primeiro decreto (Decreto 24.643, Código das Águas) que tenta, de forma ainda tímida, dar suporte às questões ambientais. Somente em 1960 foi publicado o primeiro decreto brasileiro (Decreto 49.974-A, Código Nacional de Saúde) que trata de forma mais específica sobre a poluição das águas, classificando-as de acordo com seus usos preponderantes (Von Sperling, 1998). Desde então, a legislação brasileira tem melhorado de forma significativa, mas ainda vemos o impasse entre a lei e seu cumprimento. De 2005 a 2011 a resolução CONAMA/357 direcionou sobre os padrões de lançamento dos efluentes líquidos no Brasil e classificou os corpos de água de acordo com sua utilização. Em março de 2011 foi publicada a resolução CONAMA nº 430, que alterou alguns parâmetros da resolução CONAMA anterior (357/2005) e passa a ser a vigente. Também em 2011 foi publicada a portaria nº 2914, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Nas últimas décadas, com o aumento da atividade industrial, cresce também a preocupação com o destino dos resíduos produzidos neste setor. O efluente industrial pode ser gerado durante os processos de produção industrial, ou ainda nas etapas de lavagem de pátio, máquinas, tubulações; assim, o efluente gerado poderá conter uma diversidade muito grande em relação ao tipo de agente poluidor, dependendo, principalmente do tipo de produto formado pela indústria (Von Sperling, 2005). Os agentes poluidores podem, portanto, ser (i) de natureza orgânica, como lipídeos e proteínas, encontrados em efluentes de indústrias de laticínios, matadouros, suinoculturas; pesticidas e herbicidas, utilizados na agricultura; ou (ii) de natureza inorgânica, sendo alguns metais e os metais pesados considerados como os mais danosos ao ambiente; tais compostos estão presentes em efluentes de indústrias metalúrgicas, de produção de corantes e tintas, produção de baterias e pilhas, na drenagem ácida de mina, entre outros.

Além dos metais pesados, outro agente poluidor inorgânico comum em efluentes industriais é o íon sulfato (SO_4^{2-}), e este pode estar associado à presença de metais pesados em alguns efluentes industriais. O sulfato está presente em águas residuárias geradas por

indústrias de galvanoplastia, refino de petróleo, produção de papel e celulose, e por drenagens ácidas de mina (DAM), dentre outras. As DAM's contêm tanto sulfato como metais pesados, e constituem um grande problema ambiental vinculado a extração de minérios sulfetados (Groudev *et al.*, 2008).

Quando há a exposição de minerais sulfetados e estes são oxidados na presença de água, há a formação de um percolado rico em sulfato e metais pesados. Esse percolado é conhecido como Drenagem Ácida de Mina (Von Sperling, 2005). A formação da DAM pode ser explicada pelas equações seguintes:



O mineral oxidado pode ser, por exemplo, a pirita (FeS_2), liberando grande quantidade de ferro na água; ou outros minerais, como calcopirita (CuFeS_2) liberando cobre e ferro, ou ainda, arsenopirita (FeAsS) liberando arsênio solúvel (Von Sperling, 2005).

A remoção de sulfato e de metais pesados de efluentes industriais pode ser realizada por tratamento químico. Geralmente a remoção se dá pela adição de carbonato de cálcio (CaCO_3) havendo formação de precipitado contendo sulfato e metais. Contudo, essa técnica requer um alto custo operacional, além da geração de grande volume de lodo (Von Sperling, 2005). O tratamento biológico, utilizando Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) vem como uma alternativa eficiente e economicamente viável (Kaksonen *et al.*, 2003; Rizzo *et al.*, 2004) a esta metodologia. Como consequência do metabolismo das BRS, o sulfato presente em solução é utilizado como aceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbia. Com isso, o íon sulfato é reduzido a sulfeto, principalmente sob a forma de sulfeto de hidrogênio (H_2S).

Em relação à presença do íon sulfato nos efluentes, a legislação brasileira, de acordo com a Portaria 2914/2011, determina que seu limite de lançamento nos efluentes deve ser de 250mg.L^{-1} , a portaria em questão dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e sobre seu padrão de potabilidade. Além disso, o lançamento de efluentes nos corpos hídricos não deve descaracteriza-los, ou seja, a concentração máxima de sulfato nos corpos hídricos também não deve ultrapassar o valor de 250mg.L^{-1} .

3.2 Arsênio

O Arsênio (As) é o 20º metalóide mais abundante na crosta terrestre (Lièvremonet *et al.*, 2009). A disponibilização desse elemento no meio ambiente pode ocorrer de forma natural ou antropogênica. Em águas naturais, o arsênio está presente principalmente na forma de compostos inorgânicos, com valências 3+ e 5+ (Lièvremonet *et al.*, 2009). Em meio aquoso, o As pode ser encontrado sob a forma de arsenito (AsO_3^{-3}) e arsenato (AsO_4^{-3}), referindo-se, respectivamente a espécies trivalentes e pentavalentes. A toxicidade das diversas espécies de arsênio decresce na seguinte ordem: compostos de As^{3+} inorgânico > compostos de As^{5+} inorgânico > compostos de As^{3+} orgânico > compostos de As^{5+} orgânico. Em termos de intensidade, o As^{3+} inorgânico é 60 vezes mais tóxico que o As^{5+} inorgânico (USEPA, 2000).

O arsênio elementar não é tóxico, mas é rapidamente convertido a produtos tóxicos pelo organismo humano. A maior parte dos compostos contendo arsênio, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, acaba sendo convertida pelo organismo ao trióxido de arsênio, o qual reage muito rapidamente com os grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas, inibindo a ação de enzimas que contenham estes grupamentos em seus sítios ativos e bloqueando a respiração celular (Tsalev e Zaprianov, 1985).

As fontes naturais de contaminação por arsênio podem estar associadas a fenômenos geotermiais e vulcânicos e ainda à ocorrência de rochas auríferas sulfetadas, como é o caso da região do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais. A mineração de ouro nessa região foi a principal responsável pela liberação de grandes concentrações de arsênio presentes em águas subterrâneas e de consumo. Borba *et al.* (2004) avaliaram a concentração de arsênio total em água superficial e subterrânea em Mariana e Ouro Preto, MG. Em muitos pontos de coleta foram encontradas concentrações de arsênio superiores ao limite máximo permitido, de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CONAMA 430). Esse dado requer atenção uma vez que parte da população dessas duas cidades utiliza como água de abastecimento aquela retirada direto de mina, sem nenhum tipo de tratamento.

Ainda como fontes antropogênica de contaminação de arsênio, podemos destacar a utilização de pesticidas, inseticidas, produção de vidro e atividades relacionadas à preservação de madeira (Borba, 2002).

A exposição crônica ao arsênio pode levar ao desenvolvimento de câncer de pele, pulmão, próstata, bexiga, rim e fígado. Outras patologias também podem ocorrer, como:

hiperpigmentação cutânea, hemorragias gastrointestinais, arritmias cardíacas, confusão mental, entre outras (USEPA, 2000; WHO, 2009).

Os processos que visam à remoção de As de meios aquosos têm, geralmente, por objetivo, converter o arsênio solúvel numa fase insolúvel. Nesse sentido, alguns métodos físico-químicos são utilizados, como a adsorção de espécies de arsênio em óxido-hidróxidos de ferro ou alumínio, troca iônica e osmose reversa (Greenleaf, *et al.*, 2006; Badruzzaman, *et al.*, 2004; Ning, 2002). Uma vez que os ciclos biogeoquímicos do ferro e do arsênio estão intimamente relacionados em sistemas naturais, a presença de Fe afeta a especiação do As, uma vez que o ferro pode catalisar a reação de oxidação da espécie de arsênio trivalente (mais solúvel), produzindo sua espécie oxidada menos estável (menos solúvel) (Lièvremonet *et al.*, 2009). Os (oxi)(hidro)óxidos de ferro são especialmente importantes e efetivos na sorção e/ou coprecipitação de arsênio (Henken, 2009).

O principal fator que determina a especiação do As é o pH do meio (Lizama *et al.*, 2011) o que pode ser observado pela figura 3.1. Em águas naturais onde o pH é em torno de 6 a 9, o arsenito é mais comumente encontrado como espécie neutra (H_3AsO_3), enquanto o arsenato é encontrado como espécie carregada negativamente (H_2AsO_4^- e HAsO_4^{2-}) (figura 3.1). Espécies carregadas são mais facilmente removidas que espécies neutras e podem ser removidas por sorção, troca iônica ou precipitação. Portanto, o arsenato é mais facilmente removido de águas naturais que o arsenito.

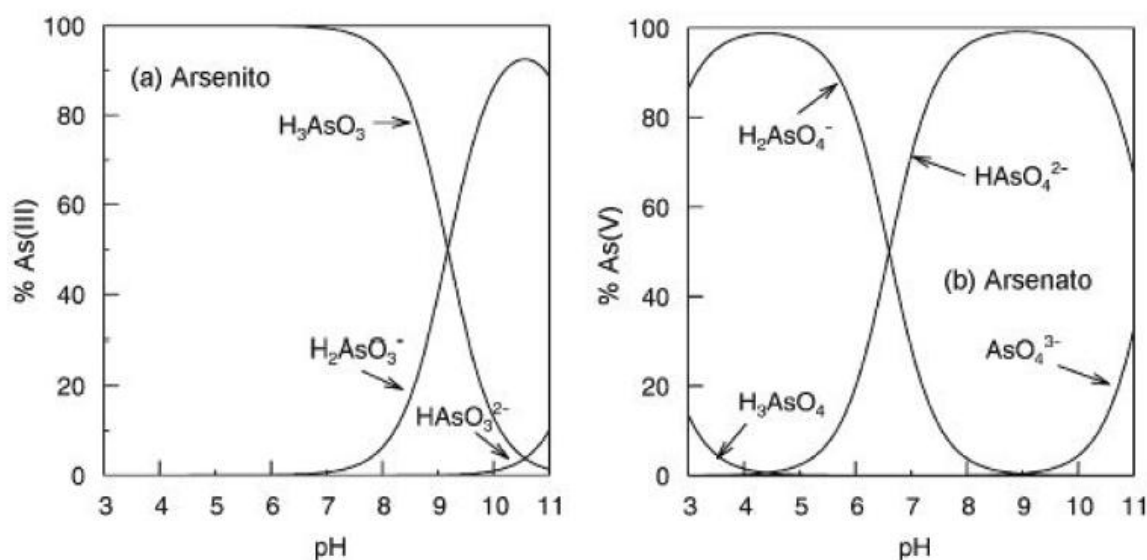


Figura 3.1. Especiação do arsenito (esquerda) e arsenato (direita) em função do pH (Teclu *et al.*, 2008).

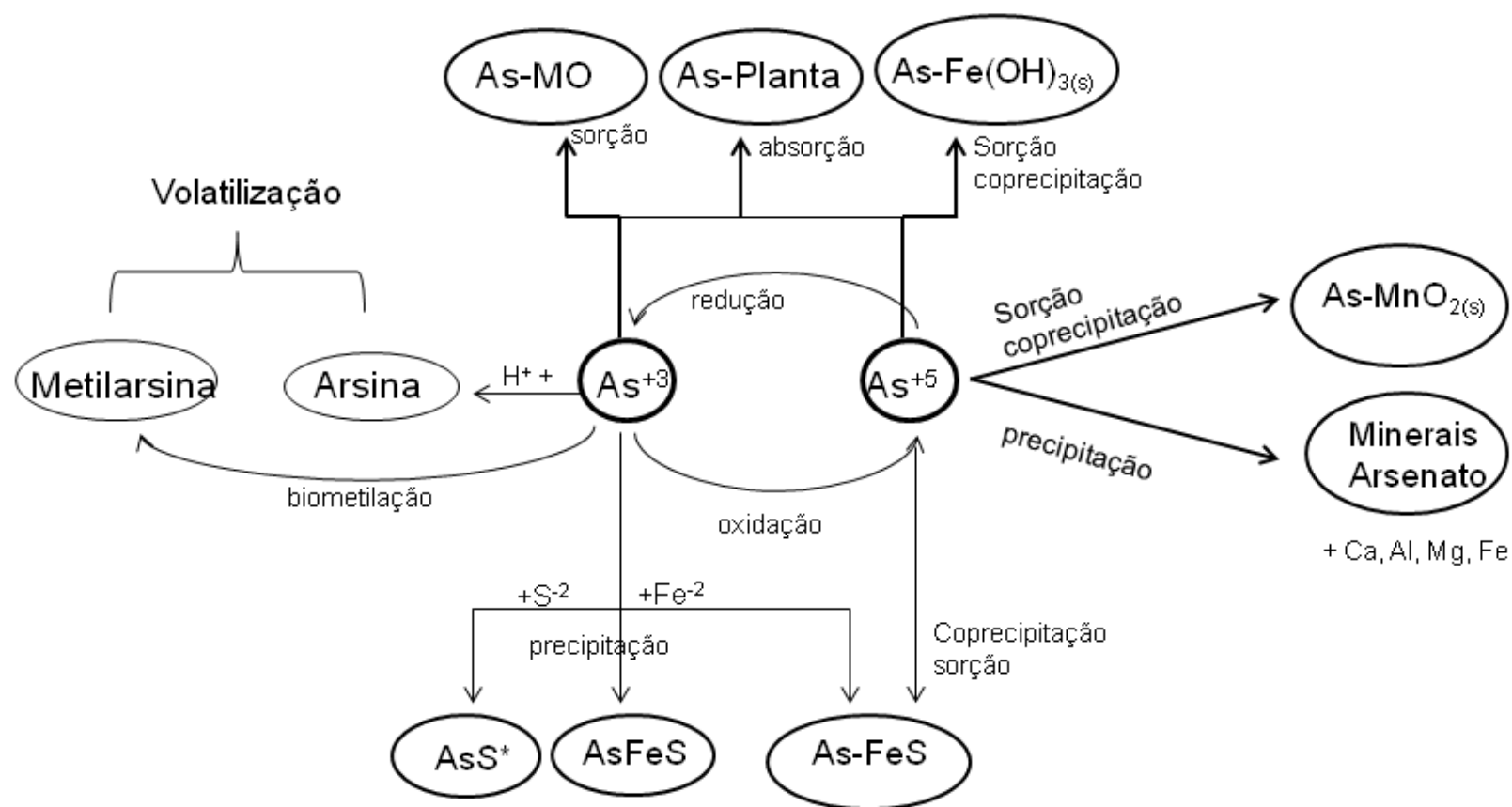
Os processos de remoção de arsênio são considerados bem distintos aos processos de remoção de outros metais como cobre, zinco e manganês (Lizama *et al.*, 2011). Metais

como Cu e Zn são cátions e precipitam facilmente em pH básico, já as espécies de As são neutras ou ânions e requerem condições ambientais mais específicas para sua remoção (Lizama *et al.*, 2011). A natureza da espécie de As envolvida no processo de remoção é de fundamental importância, porém as condições ambientais e a interação com outros elementos químicos também devem ser consideradas.

Os micro-organismos podem participar dos processos de remoção de arsênio mediando reações de oxi-redução ou influenciando nos mecanismos de precipitação (Gadd, 2004). As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) podem ser efetivas no processo de remoção de arsênio, uma vez que o sulfeto produzido através do metabolismo desses micro-organismos pode se ligar ao arsênio solúvel e precipitá-lo sob a forma de sulfeto metálico. Duncan e colaboradores (*apud* Lizama *et al.*, 2011) sugerem em seu trabalho que a remoção biológica de As ocorre, em maior parte, como precipitados minerais contendo S-As. Teclu *et al.*, (2008) utilizaram culturas mistas de BRS em estudo para precipitação de arsênio 3+ e 5+, como sulfeto metálico; conseguindo uma eficiência de remoção de 55 e 77%, respectivamente, utilizando uma concentração inicial de 0,5mg.L⁻¹.

Em Drenagem Ácida de Mina, o processo inicial de remoção de As mediado por BRS ainda é pouco conhecido, porém, a adsorção ou coprecipitação com outros sulfetos metálicos têm sido proposta (Lizama *et al.*, 2011). A formação de sulfeto de arsênio insolúvel deve ocorrer apenas depois que as condições de ambiente redutor forem estabelecidas (Neculita *et al.*, 2007). Outros micro-organismos como: Bactérias Oxidantes de Arsenito, Bactérias Redutoras de Arsenato e Bactérias Oxidantes de Ferro; podem também mediar a remoção de As de forma direta ou indireta. Esses micro-organismos coexistem em ambientes como os solos (Macur *et al.*, 2004).

As espécies de arsênio em água podem ter diferentes vias de transformação e remoção: (1) precipitação, (2) coprecipitação, (3) sorção em sólidos, (4) metilação, e (5) reações de oxidação e redução (figura 3.2) (Lizama *et al.*, 2011).



* e outros arsenosulfetos

Figura 3.2. Principais processos de imobilização das espécies de arsênio As^{3+} e As^{5+} e a interação com outros elementos químicos. Extraído e adaptado de Lizama *et al.* (2011).

A precipitação se refere a reações entre espécies dissolvidas formando sólidos insolúveis. Esse processo pode ser resultante da oxidação, redução ou mudanças de pH do meio. Em ambientes oxidados, com altos níveis de As^{5+} , a precipitação deste com Ca, Mg, Al e Fe^{3+} pode ocorrer. Em ambientes reduzidos e na presença de S e Fe, o As pode ser precipitado na forma de composto insolúvel como a orpimenta As_2S_3 , no qual o As está presente como As trivalente, e arsenopirita (AsFeS). A Orpimenta (Ouro-pigmento) precipita em ambientes contendo pouco Fe, porém ricos em sulfeto, especialmente sob condições ácidas (Lizama *et al.*, 2011). A USEPA considera que a precipitação química, e em particular a precipitação de arsenato férrico, só ou em combinação com outros métodos de precipitação, é a melhor tecnologia para o tratamento de efluentes contendo arsênio (Harris e Krause, 1993).

A coprecipitação é o processo pelo qual substâncias solúveis se incorporam aos precipitados durante sua formação, ela pode ocorrer por adsorção, onde um determinado composto é adsorvido na superfície do precipitado; como é o caso do As coprecipitado com (oxi)hidróxidos de ferro (Gadd, 2004).

O processo de sorção ocorre quando adsorção e absorção estão envolvidos simultaneamente, ou quando ambos processos não podem ser distinguidos. Adsorção se refere à remoção de íons ou outras espécies dissolvidas, de líquidos ou gases pela acumulação na superfície de um material sólido (Lizama *et al.*, 2011). O processo de adsorção mais comum envolve a troca iônica. O sucesso do processo de adsorção depende das propriedades da superfície do adsorvente, da concentração e da especiação das espécies químicas presentes, da competição entre espécies químicas e do pH do meio (Stollenwerk, 2003). Já o processo de absorção é a assimilação de espécies químicas no interior de substâncias sólidas (Henken e Hutchison, 2009). Um material que seja utilizado como sorvente deve ser primariamente analisado de acordo com suas características físico-químicas a fim de garantir o sucesso ao se utilizar esse tipo de tratamento.

A sorção do arsenato com a maioria dos hidróxidos metálicos, especialmente de Fe e Mn, e com argila tem sido reportada na literatura, sendo que, óxidos de ferro são melhores adsorventes para As do que argilas (Lizama *et al.*, 2011, Gadd, 2004).

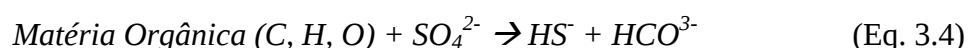
A sorção de oxiânions arsenicais é sensível a presença de ânions competidores, como por exemplo, fosfato (PO_4^{-3} , HPO_4^{-2} , H_2PO_4^-), sulfato (SO_4^{-2}), carbonato (CO_3^{-2}), bicarbonato (HCO_3^-) e cloreto (Cl^-) (Mukherjee *et al.*, 2009). O fosfato possui a mesma configuração tetraédrica do arsenato, e, portanto, pode desorver o As^{5+} de diferentes superfícies (Henken, 2009). Em águas contendo concentrações muito altas de sulfato, este

pode diminuir a sorção de As. Porém, essa competição pode ser diminuída ao se reduzir o sulfato a sulfeto, pelo metabolismo das BRS (Lizama *et al.*, 2011).

A metilação seguida de volatilização de metalóides como o mercúrio, selênio e arsênio são fenômenos que ocorrem em ambientes aquáticos (Kosolapov *et al.*, 2004). Em condições anóxicas e ambientes redutores, o As pode ser convertido no gás arsina, que é um composto altamente tóxico. Exemplos de arsinas voláteis são: arsina AsH_3 , metilarsina $\text{CH}_3(\text{AsH}_2)$, dimetilarsina $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$. A formação de metilarsina é um processo que pode ser mediado por diferentes organismos, como fungos e bactérias (Lizama *et al.*, 2011). Michalke *et al.* (2000) relatam que as BRS podem estar envolvidas no processo de metilação do arsênio.

3.3 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) representam um grupo de micro-organismos que realiza a redução dissimilativa do íon sulfato. Esse processo difere da redução assimilativa onde os íons sulfato são reduzidos a sulfeto e este é incorporado às moléculas orgânicas como os aminoácidos e coenzimas (Madigan *et al.*, 2004). Na redução dissimilativa, o íon sulfato atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica, da mesma forma que atua o oxigênio na respiração convencional. O sulfeto produzido pela redução do sulfato é normalmente excretado na forma de H_2S livre (Postgate *et al.*, 1984). A degradação da matéria orgânica, tendo o sulfato como oxidante, pode ser resumida de acordo com a equação 2.4:



As BRS têm ampla distribuição, estando presentes em ambientes anaeróbios terrestres ou aquáticos. O grupo das BRS contém representantes considerados muito versáteis em termos de colonização do ambiente. É possível encontrar BRS em ambientes considerados inóspitos, como fontes hidrotermais e domo de lama vulcânica, onde as temperaturas são bem elevadas (Elsgaard *et al.*, 1994); em locais com alta pressão como as fendas oceânicas e sedimentos marinhos (Jeanthon *et al.*, 2002); em ambientes ácidos como as drenagens ácidas de mina (Johnson, 1995) ou em locais extremamente alcalinos, como em lagos de soda (Pikuta *et al.*, 1997). Em contrapartida, as BRS são mais comumente encontradas em regiões bentônicas de lagos, rios e mares (Gibson, 1990). A

diversidade microbiana referente ao grupo das BRS está intimamente relacionada com o tipo de ambiente colonizado e reflete a complexidade biológica do grupo.

A presença das BRS com alta atividade metabólica é facilmente revelada pela presença de precipitado negro resultante da precipitação do sulfeto de ferro, e ainda pelo cheiro do sulfeto de hidrogênio característico (Postgate *et al.*, 1984).

Esses micro-organismos são de fundamental importância nos ciclos biogeoquímicos do carbono e enxofre. Estima-se que cerca de 50% da matéria orgânica despejada em ambientes marinhos possa ser degradada pelas BRS (Gibson, 1990). O enxofre pode ser encontrado em uma variedade de estados de oxidação, sendo os mais significantes: -2 (sulfeto e enxofre orgânico reduzido), 0 (enxofre elementar) e +6 (sulfato). Agentes químicos ou biológicos contribuem para a transformação de um estado de oxidação do enxofre para outro. Os principais micro-organismos envolvidos no ciclo do enxofre são as Bactérias Redutoras de Sulfato e as Bactérias Oxidantes de Enxofre, um esquema resumindo o ciclo do enxofre e representado a participação dessas bactérias está representado na figura 3.3 (Tang *et al.*, 2009).

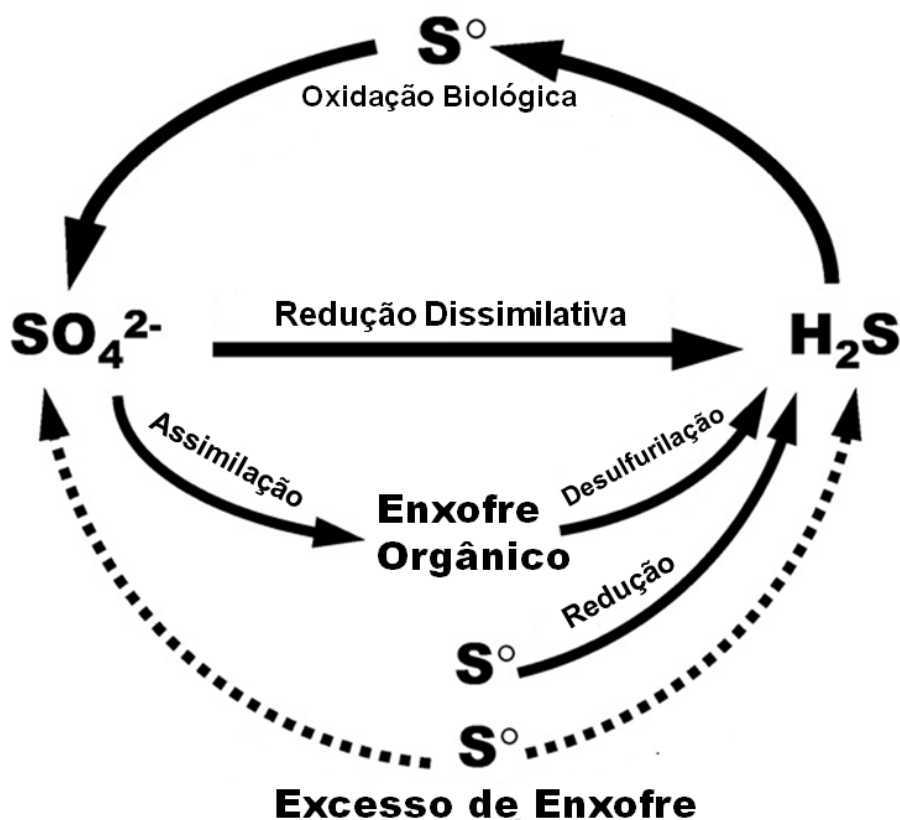


Figura 3.3. Representação esquemática do ciclo do enxofre. Extraído e adaptado de Tang *et al.* (2009).

O ciclo do enxofre consiste em reações de oxidação e redução dos compostos contendo enxofre. O sulfato quando reduzido, tem a função de atuar como aceptor de elétrons em vias metabólicas de alguns micro-organismos, como as BRS, sendo convertido a sulfeto. Já o sulfeto pode ser doador de elétrons para o metabolismo de micro-organismos fototróficos e quimiolitotróficos, como as Bactérias Oxidantes de Enxofre, sendo convertido a enxofre elementar ou sulfato (Tang *et al.*, 2009).

Em relação aos compostos orgânicos, em ambientes aeróbios, os micro-organismos heterótrofos são capazes de mineralizá-los a CO₂, já em ambientes anaeróbios, a mineralização da matéria orgânica é bem mais complexa e, muitas vezes requer a interação entre diferentes grupos de micro-organismos. Cada grupo microbiano realiza uma oxidação parcial da matéria orgânica, e seus produtos metabólicos são assimilados por outros grupos, até a completa oxidação do composto orgânico (Figura 3.4) (Muyzer *et al.*, 2008, Barbosa, 2009).

Os compostos de alto peso molecular como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos são hidrolisados a produtos de baixo peso molecular como ácidos orgânicos e alcoóis. Esses compostos podem ser fermentados em ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico). O processo final da oxidação dos compostos orgânicos é a degradação desses ácidos graxos. Em ambientes com concentração de sulfato suficiente, a degradação dos ácidos graxos é realizada pelo metabolismo das BRS, podendo ocasionar o acúmulo de acetato e H₂, esses compostos serão, por fim, degradados pelas metanogênicas e BRS acetoclásticas atuando em sintrofismo (Muyzer *et al.*, 2008; Gibson 1990; Postgate *et al.*, 1984). As relações mutualísticas entre as espécies de uma comunidade microbiana são primordiais para a manutenção da estrutura e diversidade funcional do ecossistema (McInerney *et al.*, 2008). Porém, em ambientes naturais, a variedade dos substratos orgânicos disponíveis e a diversidade de espécies presentes, tornam complexas as interações entre as espécies (Muyzer *et al.*, 2008).

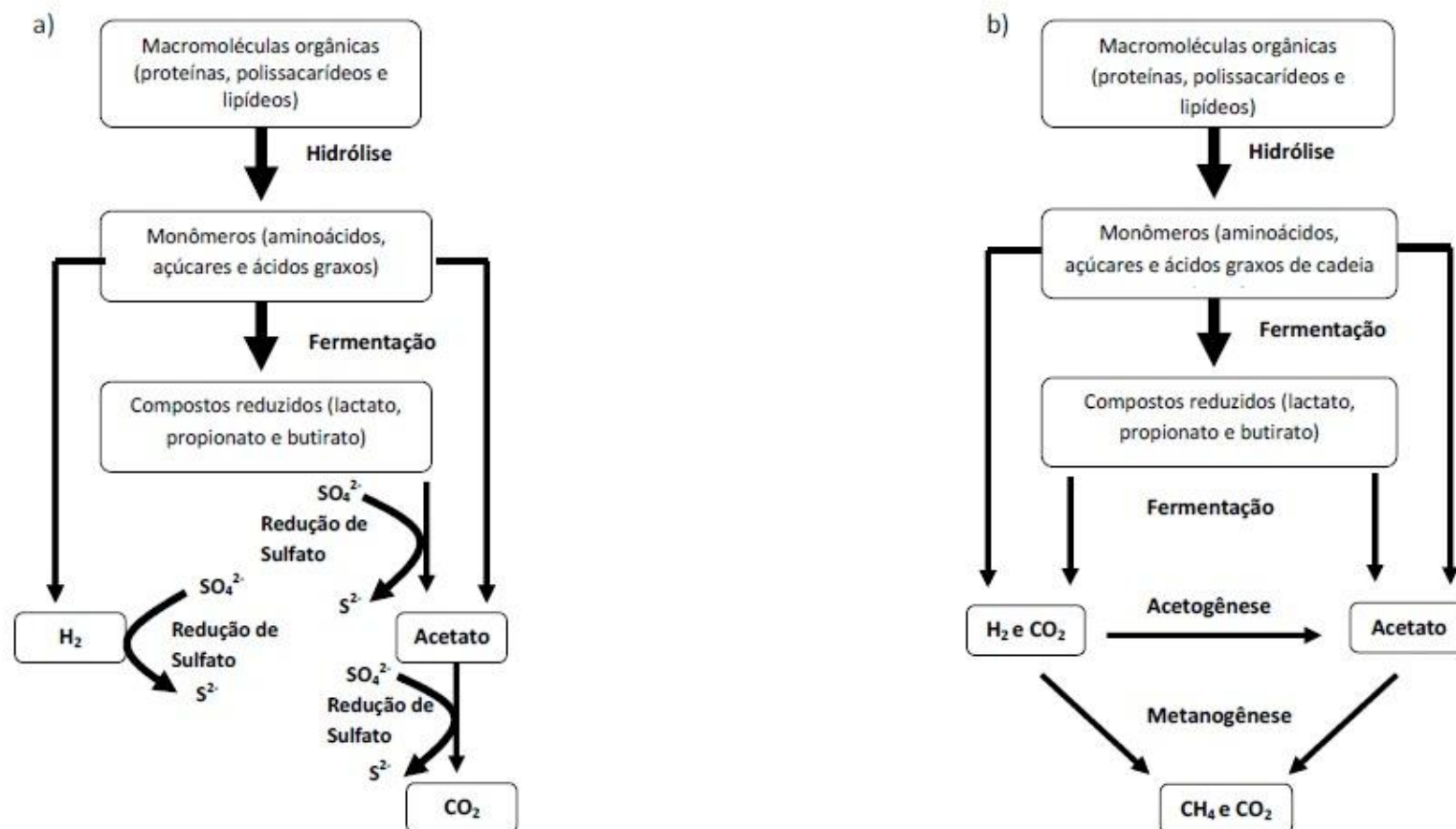


Figura 3.4. Vias de degradação microbiana de matéria orgânica em ambientes anóxicos na presença (a) e na ausência de sulfato (b). Extraído de Barbosa (2009).

O ambiente favorável ao crescimento das BRS, em geral, têm como características: condições moderadamente alcalinas (pH 7,0 – 7,8), mesofílicas (28 – 38° C) e ambientes redutores cujo os valores de Eh se encontrem na faixa de -150 a -300 mV (Madigan *et al.*, 2004). A atividade metabólica de BRS, porém, já foi observada em ambientes ácidos de drenagens ácidas de minas (Johnson *et al.*, 2002; Kusel *et al.*, 2001; Johnson, 1995), em ambientes alcalinos (Kjeldsen *et al.*, 2007; Pikuta *et al.*, 1997; Fry *et al.*, 1997), termofílicos (Domingues *et al.*, 2006; Jeanthon *et al.*, 2002; Elsgaard *et al.*, 1994) e psicrofílicos (Vandieken *et al.*, 2006; Knoblauch *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 1998).

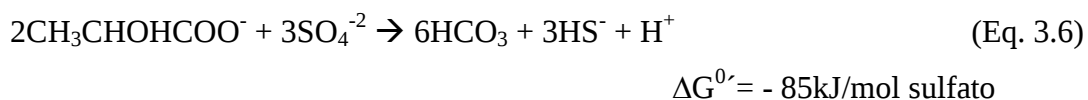
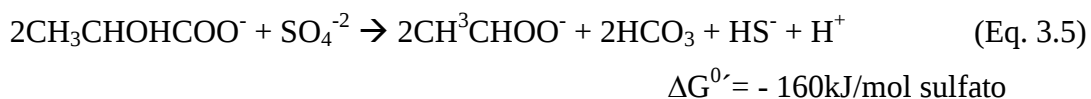
Como dito anteriormente, o potencial de oxi-redução (Eh) do ambiente é fator importante para o cultivo das BRS, sendo esse valor determinado pela natureza química do ambiente ou pela influência dos subprodutos da atividade metabólica das BRS. A própria produção de sulfeto proveniente do metabolismo das BRS já seria suficiente para atingir os valores de Eh necessários, porém a adição de agentes redutores ao meio de cultivo pode ser realizada utilizando: ditionato de sódio, ascorbato de sódio e tioglicolato de sódio (Gibson, 1990) contudo, o tioglicolato de sódio se utilizado em altas concentrações pode inibir o crescimento de algumas espécies de BRS (Madigan *et al.*, 2004)

As BRS têm considerável capacidade de utilizar diversos compostos como doadores de elétrons, como lactato, formato, piruvato, metanol, etanol, propanol, butanol (Gibson, 1990). As BRS podem também utilizar fontes alternativas e mais complexas de matéria orgânica e fonte de elétrons, como melaço de cana (Teclu *et al.*, 2009), resíduo da indústria de vinho – vinhaça (Martins *et al.*, 2009) e resíduo de indústria de produção de queijo (Costa e Duarte, 2005). Essas fontes alternativas de matéria orgânica para o cultivo de BRS são de grande interesse, principalmente econômico, uma vez que muitas delas são resíduos de algum tipo de processo industrial, sendo obtidas a baixos custos (Costa e Duarte, 2005). Além dos compostos orgânicos, o H₂ pode ser também utilizado pelas BRS como doador de elétrons. A escolha correta de um substrato orgânico é crucial para o sucesso no cultivo desses micro-organismos (Gibson, 1990). Como acceptor final de elétrons, além do sulfato, podem ser utilizados: tiosulfato, tetracionato, sulfito ou metabissulfito (Postgate *et al.*, 1984).

Os compostos orgânicos, quando utilizados como fonte de elétrons, ou seja, fonte de energia para o metabolismo, podem também atuar como fonte de carbono para a biossíntese celular. Os micro-organismos que necessitam, como fonte de energia e fonte de carbono, dos compostos orgânicos são considerados heterótrofos, e a grande maioria das BRS é heterotrófica. Já aquelas BRS que utilizam H₂ como fonte de energia podem utilizar

o CO₂ do meio como fonte de carbono, sendo consideradas, portanto, autótrofas (Madigan *et al.*, 2004)

A utilização de substratos orgânicos no metabolismo desses micro-organismos pode ser realizada de duas formas distintas. Com a sua oxidação completa ou incompleta. De acordo com isso, o lactato, um substrato amplamente utilizado, pode seguir duas vias de oxidação representadas pelas equações seguintes (Gibson, 1990):



A oxidação incompleta de compostos orgânicos distingue dois grupos fisiológicos: os oxidantes completos e incompletos. Os oxidantes completos são capazes de mineralizar os compostos orgânicos até CO₂, já o incompletos convertem a matéria orgânica até acetato. Essas distinções se referem a grupos fisiológicos e não sistemáticos (Martin *et al.*, 2006).

O metabolismo das BRS é dependente da redução de sulfato, e este processo inicia-se após a entrada do sulfato endógeno no interior da célula. Uma vez dentro da célula a redução do sulfato se dá pela ação da ATP sulfurilase que combina o sulfato e ATP produzindo adenosina fosfossulfato (APS), bem como pirofosfato, que pode ser clivado posteriormente a fosfato inorgânico. O APS é então rapidamente convertido em sulfito (SO₃⁻) pela enzima citoplasmática APS redutase (Cypionka 1987, 1989).

O sulfito pode ser reduzido à sulfeto por diferentes sulfito redutases. Dentre as enzimas mais conhecidas estão bissulfito redutase, desulfoviridina e desulforubina (Lee e Peck 1971). Essas enzimas são semelhantes, porém, a desulfoviridina apresenta uma coloração vermelho fluorescente, e por essa razão é utilizada em testes para diagnóstico de *Desulfovibrios* (Postgate *et al.*, 1984). Os intermediários da redução de sulfito a sulfeto são metabissulfito (S₂O₅⁻²), ditionito (S₂O₄⁻²), tritionato (S₃O₆⁻²) e tiosulfato (S₂O₃⁻²) (Gibson, 1990).

Desde a descoberta da redução dissimilatória do sulfato por BRS, elas têm sido descritas como micro-organismos anaeróbios obrigatórios, e apenas atingindo a condição de anaerobiose seria possível isolar essas bactérias (Postgate *et al.*, 1984). Porém, alguns estudos têm mostrado que as BRS são capazes de sobreviver na presença de O₂ (Sarti,

2007; Mongensen, 2005), podendo ser consideradas anaeróbias tolerantes. A capacidade da respiração aeróbica tem sido detectada em muitos gêneros de sulfato-redutoras (*Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium* e *Desulfococcus*) (Dilling e Cypionka, 1990). A capacidade de sobreviver a longos períodos de exposição ao oxigênio pode ser vista como uma adaptação para a dispersão em novos ambientes. Como exemplo, pode ser citada a presença de BRS em água de consumo, podendo sobreviver a aproximadamente 72 dias de aeração (Bade *apud* Barton e Hamilton, 2007). A presença de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, NADH oxidase e catalase, tem sido reportada em muitas espécies de *Desulfovibrio*, e seriam as responsáveis pela tolerância ao O₂ (Hatchikian *apud* Barton, 1995).

O sulfeto de hidrogênio é o principal produto no processo de redução dissimilativa de sulfato e este composto é tóxico para muitos micro-organismos, até mesmo as BRS apresentam certa sensibilidade a ele. Espécies do gênero *Desulfotomaculum* são sensíveis a concentrações de 4 a 7 µM.L⁻¹ (Widdel e Pfennig, 1977; Klemps *et al.*, 1985). A presença de H₂S no meio pode funcionar como uma estratégia para eliminar outros grupos microbianos, fazendo com que as BRS prevaleçam em determinado ambiente (Martin *et al.*, 2006). O sulfeto de hidrogênio é ainda um forte agente redutor e pode reagir quimicamente com oxianions presentes em solução, além disso, o H₂S produzido pelas BRS pode reduzir alguns metais (Cr(VI) → Cr(III); SeO₃⁻² → Se⁰) tornando-os menos tóxicos (Barton, 1995).

Os gêneros de BRS podem ser identificados levando-se em conta uma variedade de parâmetros: oxidação de uma fonte de carbono específica, formação de esporos, motilidade, coloração de Gram, morfologia, % mol de CG, tipo de flagelo, resistência a antibiótico e por fim as técnicas de biologia molecular utilizando rRNA (Postgate *et al.*, 1984; Madigan *et al.*, 2004).

O interesse biotecnológico nas BRS está no fato de o sulfeto, produzido pelo metabolismo desses micro-organismos, ser capaz de se ligar à cátions metálicos. Essa aplicação tem vantagens em relação às propriedades químicas dos sulfetos metálicos (Lens *et al.*, 2007). Os sulfetos metálicos, no geral, têm baixa solubilidade, portanto, eles podem ser precipitados e reutilizados. Algumas indústrias têm aplicado a imobilização de metais através da formação de sulfetos metálicos após a redução de sulfato. De acordo com o sistema THIOPAQ (Paques), o processo de redução de sulfato e oxidação do excesso de sulfeto foi desenvolvido para a remoção de metal pesado (Figura 3.5) O processo está em operação na Holanda para tratamento de efluente contendo Zinco. A redução de sulfato é

feita em um Reator tipo Gás-lift. O gás presente no reator, contendo principalmente H_2 (76%), é utilizado como doador de elétrons. O sulfeto de zinco que é precipitado com a biomassa é coletado e reutilizado. Mais de 95% de peso seco do lodo presente no reator é sulfeto de zinco (Muyzer *et al.*, 2008).

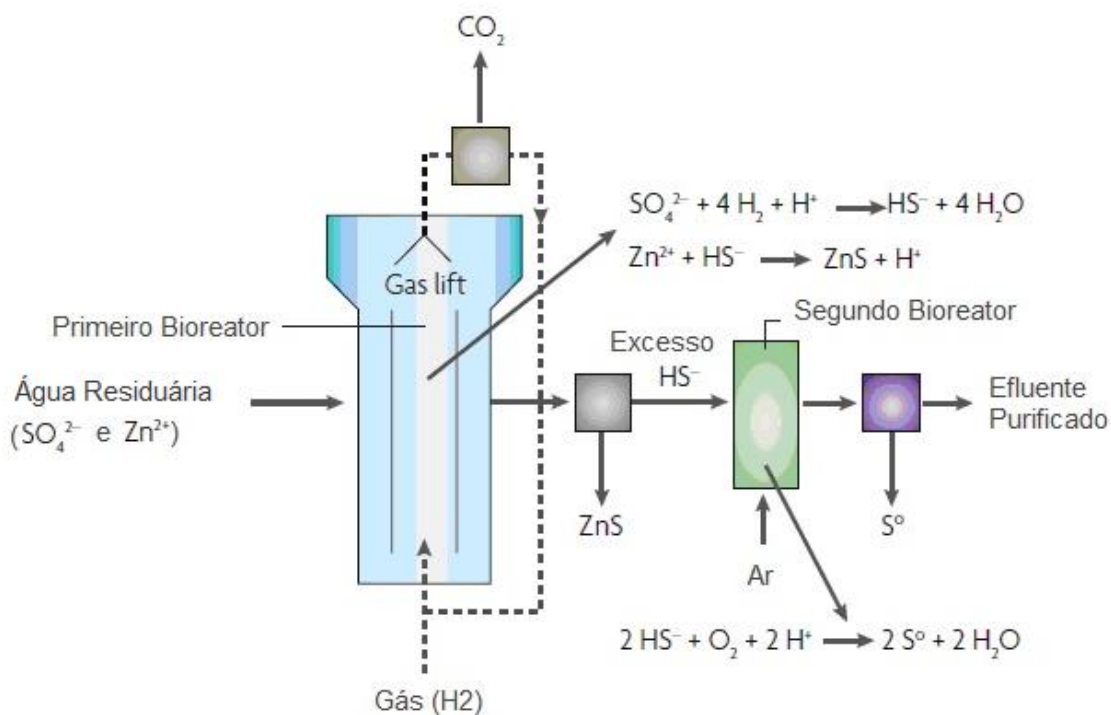


Figura 3.5. Esquema do processo de redução de sulfato e imobilização de zinco em sistema THIOPAQ (Paques). Extraído e adaptado de Muyzer *et al.* (2008).

Em alguns setores industriais a presença de BRS não é desejável. Um exemplo é o setor petroquímico, onde a corrosão da tubulação causada pelo H_2S produzido pelas bactérias representa grandes prejuízos na produção (Silva de Araújo, 2002).

As estratégias utilizadas para o controle da atividade das BRS incluem: (1) remoção do sulfato da água utilizada na injeção da tubulação, (2) aplicação de biocidas, como glutaraldeído e diaminas, (3) exposição da água a irradiações de microondas e ultrassom.

Portanto, é de suma importância o bom entendimento dos processos metabólicos que envolvem esse grupo bacteriano bem como suas consequências e modificações que realizam no ambiente em que vivem, para que a atividade das BRS seja favorecida ou não, dependendo do objetivo biotecnológico. Os estudos e pesquisas realizados em escala

laboratorial devem ser considerados, a fim de darem suporte à aplicação de sistemas em escala real que sejam viáveis e tornem possíveis as aplicações alcançadas em laboratório.

3.3.1 Relação DQO/sulfato

Muitas vezes, no processo biológico de redução de sulfato por BRS heterotróficas é preciso disponibilizar matéria orgânica, já que efluentes industriais normalmente apresentam baixa concentração de substratos orgânicos. As fontes de carbono utilizadas no metabolismo do sulfato variam de acordo com o gênero das BRS, sendo os mais utilizados os sais de ácidos graxos (acetato, propionato e butirato), sais de ácidos com 3 e 4 carbonos (lactato, piruvato e malato), e alcoóis (metanol, etanol e propanol) (Gibson, 1990).

Além da natureza do substrato orgânico utilizado, a relação entre a concentração de matéria orgânica do meio - expressa pela Demanda Química de Oxigênio (DQO) - e a concentração inicial de sulfato no sistema, também é um parâmetro que indica a eficiência do processo no tratamento do efluente. A eficiência da atividade das BRS na remoção de sulfato está relacionada com a razão DQO/sulfato (Barbosa *et al.*, 2009).

Velasco *et al.* (2008) mostraram que a razão DQO/sulfato pode ser utilizada como um parâmetro para o controle da produção de H_2S e consequentemente para a precipitação de metais. O estudo utilizou etanol como fonte de carbono, e este foi incompletamente oxidado à acetato pela cultura mista de BRS, em reator UASB. A concentração máxima de sulfeto dissolvido foi obtida em razão DQO/sulfato de 2,5, com a conversão de 94% de sulfato e 87% de etanol. Já na razão DQO/sulfato de 0,67; que de acordo com a estequiometria seria o valor que garantiria a completa oxidação do etanol a CO_2 ; foi obtido o menor valor de sulfeto dissolvido.

El Bayoumy *et al.* (1999) avaliaram a concentração do lactato, utilizado como fonte de carbono, em relação à concentração de sulfato em Reator Anaeróbio Fixo de Fluxo Ascendente - UAFFR. A maior produção de sulfeto foi obtida utilizando uma razão DQO/sulfato entre 1,5 e 2,25. Outros parâmetros também foram avaliados a fim de obter uma condição ideal de cultivo de BRS e consequente remoção de sulfato. A concentração ótima de nitrogênio total e fósforo foi determinada em 250 e 50 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Assim, foi possível obter nesse trabalho a relação DQO:N:P de 100:5:1, como condição ótima.

Grandes concentrações de substrato orgânico parecem reduzir a eficiência do processo biológico por favorecer a competição entre diferentes micro-organismos pelo

substrato disponível (Choi e Rim, 1991). Em ambientes anaeróbios que possuem um baixo valor de potencial redox, as BRS competem com outros micro-organismos anaeróbios, como Bactérias Fermentadoras (BF), Acetogênicas (BA) e Metanogênicas (BM) (Barton, 1995). Essa competição se dá pelos substratos comuns utilizados por esses grupos, principalmente H₂ e Acetato.

Chou *et al.* (2008) mostraram que a competição entre BRS e BM está relacionada com a relação DQO/sulfato. Utilizando acetato como substrato, os autores encontraram a razão 1,1 como sendo a máxima para prevalência das BRS em consórcio com BM.

3.4 Interações entre micro-organismos e os metais

Os micro-organismos são de fundamental importância na ciclagem dos nutrientes em solos e em ambientes aquáticos. A contaminação desses ambientes, seja por cargas poluidoras de origem industrial, agrícola ou doméstica, pode inibir ou desfavorecer o crescimento microbiano, interferindo de forma drástica nas condições desses ambientes (Madigan *et al.*, 2004).

Os resíduos industriais e domésticos podem conter altos teores de metais pesados. Esses metais, por sofrerem acúmulo no ambiente, representam um enorme risco não só a saúde humana, mas a todos os seres vivos. Muitos metais são essenciais para o metabolismo dos seres vivos, sendo utilizados em “concentrações traço”; quando absorvidos em alta quantidade, passam a exercer efeito tóxico nos organismos (Madigan *et al.*, 2004).

Os metais estão disponíveis no ambiente em diferentes estados oxidativos, o que será determinante para o nível de toxidez em um organismo. A especiação de metais em ambientes de água doce, assim como a sua concentração, transporte, transformação e destino; é controlada por fatores ambientais, como características biológicas, químicas e físicas do ecossistema e as propriedades dos compostos com os quais os metais interagem (Gadd, 2004). O pH do ambiente também é fator importante para o processo de ionização de compostos e elementos específicos (Lizama *et al.*, 2011).

As bactérias possuem uma versatilidade muito grande no que diz respeito aos processos metabólicos e os ambientes onde vivem. Esses micro-organismos são capazes de sobreviver em condições químicas e físicas extremas, sendo possível encontrá-los nos mais variados meios (Warren e Haak, 2001). Por serem capazes de utilizar outros compostos além do O₂ para o processo de respiração, as bactérias influenciam o comportamento de

elementos químicos; como moléculas orgânicas e os metais. Assim, elas podem ser consideradas como agentes primários das mudanças geoquímicas, devido ao seu alto potencial metabólico e grande capacidade de adaptação que lhe confere uma larga e abundante distribuição (Warren e Haak, 2001).

Os micro-organismos podem influenciar ativamente na partição dos metais entre as fases sólidas ou dissolvidas através do controle da formação ou dissolução de minerais, (Nealson e Stahl, 1997, Gadd 2004). A superfície das bactérias é análoga à superfície dos minerais, no que diz respeito à existência de grupos funcionais que atraem espécies catiônicas, como os metais (Fonseca, 2004). Cátions de metais podem se ligar a grupos sulfeto, por exemplo, presentes em aminoácidos, causando a inibição de enzimas. Ou seja, podem exercer toxicidade interferindo em íons fisiológicos: Cd^{2+} com Zn^{2+} ou Ca^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} com Fe^{2+} , Zn^{2+} com Mg ; inibindo a função apropriada para um cátion fisiológico (Fonseca, 2004).

Os processos biotecnológicos que visam à remoção de metais estão relacionados aos processos de mobilização ou imobilização dos mesmos. A mobilização de metais pode ocorrer por protonação, quelação, metilação e transformação química, e visa a solubilização do metal, podendo ser utilizada em matrizes sólidas, como solos, sedimentos e resíduos industriais. O processo de imobilização retira o poluente da fase solúvel para a fase insolúvel e pode ocorrer por precipitação de compostos orgânicos ou inorgânicos; ou ainda, por sorção, adsorção e absorção. As reações redox podem mobilizar ou imobilizar metais, dependendo da espécie envolvida (Gadd, 2004). É importante ressaltar que o emprego de micro-organismos na biorremediação de ambientes impactados por metais é viável e de suma importância, porém, os metais dificilmente serão totalmente removidos do ambiente, contudo, transformá-los em um estado de oxidação menos tóxico aos seres vivos, mobilizá-los, no caso de matrizes sólidas ou imobilizá-los, representa avanços importantes para a recuperação de áreas degradadas (Lizama *et al.*, 2011)

Como dito anteriormente, os metais representam um fator de estresse à comunidade microbiana presente no ambiente impactado, e podem ainda, inibir completamente as atividades metabólicas dos organismos. Para que esses micro-organismos sejam capazes de sobreviver a ambientes com condições diferentes das ideais, muitos possuem mecanismos genéticos que lhes garantem resistência a componentes que podem causar estresse. Nesse sentido, algumas bactérias possuem genes específicos que possibilitam que essas sobrevivam em ambientes contendo altas concentrações de metais ou metalóides, inclusive o arsênio (Liao *et al.*, 2011).

Esses mecanismos de resistência são muito importantes e podem ser determinantes no processo de sucessão que ocorre nos ambientes. Em bactérias, a alta resistência ao arsênio é relacionada com a presença do operon *ars*, este é composto por três a cinco genes (*arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* e *arsC*), os quais estão localizados em plasmídeos (Owolabi e Rosen, 1990) ou no cromossomo (Diorio *et al.*, 1995). Os genes *arsR* e *arsD* são reguladores, enquanto *arsA* e *arsB* são responsáveis por formar um fluxo transmembrana que exporta As^{3+} do citoplasma, reduzindo sua concentração intracelular (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). O gene *arsC* codifica a enzima As^{5+} redutase, que é responsável pela biotransformação de As^{5+} em As^{3+} . Algumas bactérias têm seus mecanismos de oxidação do As^{3+} ou redução do As^{5+} conhecidos, bem como a geração de energia envolvida nesses processos (Liao *et al.*, 2011).

Nas bactérias que utilizam os íons arsenato no processo de respiração anaeróbia, Bactérias Redutoras de Arsenato, o gene *arr* codifica a enzima As^{5+} redutase que reduz o As^{5+} a As^{3+} . As Bactérias Oxidantes de Arsenito possuem o gene *aox* que codifica a enzima As^{3+} oxidase, responsável pela oxidação do As^{3+} a As^{5+} (Lièvremonet *et al.*, 2009). Recentemente, outro gene que codifica uma As^{3+} oxidase foi identificado em *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1, um quimiolitotrófico que oxida arsenito e reduz nitrato simultaneamente (Zargar *et al.*, 2010). Muitos estudos mostraram o sucesso no uso de marcadores genéticos para o estudo dos mecanismos de transformação do arsênio, como; os genes *arsB* e *arsC* contidos no operon que garante a resistência ao metalóide (Achour *et al.*, 2007), o gene *arrA* na respiração dissimilatória do As^{5+} (Kulp *et al.*, 2007) e o gene *aoxB* para oxidação do As^{3+} (Hamamura *et al.*, 2009).

Compreender as relações e os mecanismos bioquímicos relacionados aos organismos presentes em ambientes impactados é de fundamental importância para a manutenção e equilíbrio desses ambientes, e ainda, tais estudos são necessários para o avanço biotecnológico.

4. Materiais e Métodos

4.1 Área de coleta

Uma porção de sedimento foi coletada da margem da Lagoa do Gambá, em Ouro Preto-MG, a fim de obter a cultura mista a ser utilizada nos ensaios.

A Lagoa do Gambá está localizada no centro de um loteamento na cidade de Ouro Preto, em Minas Gerais, a 20°43'51.11'' de latitude S e 43°30'0.63'' de longitude O (figura 4.1). Esta lagoa recebe grande quantidade de esgoto residencial e do escoamento pluvial de áreas periféricas. O sedimento foi analisado quanto à concentração de arsênio total por Espectrofotômetro de Emissão Atômica com Fonte Plasma, ICP-OES (Spectro / Modelo: Ciros CCD).



Figura 4.1. Vista da Lagoa do Gambá, Ouro Preto – MG.

4.2 Enriquecimento das amostras

O sedimento foi enriquecido em meio de cultura líquido Postgate C modificado (Cheung e Gu, 2003) (tabela 4.1), em pH 7,0; à 35°C, a fim de obter a cultura mista de BRS (amostra intitulada LG). Como fonte de carbono foi utilizado o lactato de sódio.

Em frascos de 50mL, 5mL de sedimento (10% v/v), foram adicionados a 45mL de meio líquido previamente esterilizado por calor úmido em autoclave (120°C; 1,5atm; 20min). Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e anel de alumínio. Em seguida,

foram 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.

As amostras foram repicadas por pelo menos três vezes seguidas, a fim de obter uma cultura bem adaptada às condições de cultivo, antes da realização dos ensaios.

Tabela 4.1. Composição do meio de cultura utilizado para enriquecimento da cultura mista de BRS.

Reagentes	Quantidade (g.L ⁻¹)
Lactato de sódio	0,8
Citrato de sódio	0,3
KH ₂ PO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ SO ₄	4,5
CaCl ₂	0,06
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0
Extrato de levedura	0,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Tioglicolato de Sódio	0,5
Ágar	0,5
EDTA	0,3

4.3 Caracterização do pó de penas

O pó de penas comercial utilizado como substrato orgânico foi gentilmente cedido por uma empresa de alimentos da região (figura 4.2). Trata-se de uma mistura de penas e vísceras trituradas, acrescida de sangue cozido (Scapim *et al.*, 2003). O material sólido, pulverizado, é constituído basicamente por proteínas estruturais e insolúveis, principalmente queratina. O teor bruto de proteínas do material é em torno de 80%, sendo os teores de aminoácidos, contendo grupamentos sulfeto em sua estrutura, de aproximadamente 0,67 e 3,68% para metionina e cisteína, respectivamente (Scapim *et al.*, 2003).



Figura 4.2. Pó de penas comercial. Mistura de penas, vísceras trituradas e sangue cozido.

O material foi separado quanto à distribuição granulométrica, sendo utilizada nos ensaios e nas análises posteriores, apenas a porção com granulometria inferior a 0,71mm. Para a caracterização da fração sólida do pó de penas foi avaliada a área superficial e volume de microporos, utilizando a técnica de BET do material “in natura”. Para a análise química da fração solúvel do material, o sobrenadante de uma suspensão aquosa contendo pó de penas - 2% (p/v) foi preparada para as análises posteriores. Essa suspensão foi esterilizada em autoclave (120°C; 1,0atm; 20min) a fim de promover uma melhor solubilização do material e mimetizar as condições observadas no preparo dos frascos para inóculo. A suspensão autoclavada foi filtrada em membrana de celulose (0,45 µm, Sartorius) e o filtrado foi analisado quanto a DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998), e ainda quanto aos teores de carbono orgânico total (TOC), realizada pelo método persulfato em equipamento HiperTOC analyzer (Thermo Scientific). Foram também analisadas as concentrações de glicose, proteínas e sulfato. A análise de glicose foi realizada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase, utilizando-se o kit Laborlab. A concentração de proteínas solúveis totais foi mensurada pelo método colorimétrico. Ambas as análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas, da Universidade Federal de Ouro Preto. A concentração de sulfato foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Kolmert *et al.* (2000). Foram analisados ainda os

elementos químicos solúveis presentes no filtrado, por meio de Espectrofotometria de Emissão Atômica com fonte Plasma (Spectro/Modelo – Círos CCD com Visão Radial).

Ainda para caracterização da fração solúvel, o pó de penas foi adicionado (2% p/v) ao meio de cultivo (Postgate C modificado) na presença do inóculo obtido de acordo com o item 4.2. Após 240 horas de incubação, a fração solúvel do meio contendo o pó de penas, mais o inóculo foi filtrada em membrana de celulose 0,45 µm (Sartorius) e avaliada quanto a concentração de ácidos orgânicos, que foi obtida utilizando Cromatografia de íons Metrohn; com coluna de ácidos orgânicos de cadeia curta, com eluente H₂SO₄ 0,001M. Utilizando essa análise, é possível obter a concentração dos ácidos orgânicos láctico, acético, propiônico, butírico, isovalérico e isobutírico; intermediários ao processo de respiração anaeróbia.

4.4 Avaliação do substrato orgânico na remoção de sulfato

Ensaio foram realizados a fim de verificar a relação entre o tipo de substrato orgânico utilizado para o cultivo das BRS e a atividade bacteriana, indicada pela remoção de sulfato. O pó de penas foi testado como um possível substrato orgânico utilizado para o cultivo de BRS. Dessa maneira, foram feitos testes contendo apenas o pó de penas como matéria orgânica (condição PP), pó de penas acrescido lactato de sódio (condição PL) e apenas o lactato de sódio (condição L), visto que o lactato de sódio é um substrato amplamente utilizado no cultivo de BRS.

O consumo biológico de sulfato foi demonstrado em termos de Eficiência de Remoção de Sulfato (ERS) que foi calculado como se segue:

$$ERS = [(S_{in} - S_f) / S_{in}] \times 100\% \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde S_{in} representa a concentração de sulfato inicial, e S_f a concentração de sulfato final.

4.4.1 Lactato como substrato orgânico

A cultura mista obtida de sedimento da Lagoa do Gambá, previamente enriquecida em meio de cultura Postgate C modificado, foi utilizada para os testes de remoção de sulfato utilizando apenas o lactato de sódio como substrato orgânico. Para este ensaio e os posteriores, o sulfato ferroso foi retirado da composição do meio de cultura, visto que a formação de um precipitado negro obtido através da reação com o sulfeto produzido

biologicamente, poderia interferir nas análises de densidade óptica e concentração de sulfato.

Para obter razões DQO/sulfato de 0,67; 1; 2 e 3, a concentração de lactato foi calculada de acordo com a demanda química teórica (DQO), que é obtida a partir da sua estequiometria de oxidação, e o valor de sulfato total do meio de cultura foi fixado em 2g.L^{-1} , como mostra a tabela 4.2.

Tabela 4.2. Concentração de lactato de sódio e sulfato total presente no meio de cultivo de acordo com as razões DQO/sulfato teóricas determinadas.

Razão DQO/sulfato	Lactato de sódio (g.L^{-1})	Sulfato total (g.L^{-1})
0,67	1,2	2,0
1,0	1,8	2,0
2,0	3,7	2,0
3,0	5,6	2,0

Frascos de vidro de 170mL de volume útil, contendo 142,5mL de meio de cultura, em pH 7,0 e previamente esterilizados em autoclave (120°C ; 1,0atm; 20min) acrescidos de 7,5mL de inóculo (5% v/v) foram utilizados para os ensaios em duplicata. Em condições semelhantes, foram utilizados dois frascos como controle, estes não continham o inóculo. Os frascos eram lacrados com tampa de borracha. O ensaio teve tempo de duração de 240 horas, sendo que alíquotas de aproximadamente 3mL eram retiradas, diariamente, para as análises de crescimento microbiano (Densidade Óptica), concentração residual de sulfato, valor de pH e potencial de oxi-redução (Eh).

4.4.2 Pó de penas como substrato orgânico

Para analisar a possível utilização do pó de penas comercial como um substrato orgânico para o cultivo de BRS foram realizados ensaios avaliando a remoção de sulfato em meio de cultura Postgate C Modificado, com e sem lactato de sódio, e concentrações variáveis de pó de penas.

Quando utilizado o lactato de sódio, a concentração empregada foi de $1,2\text{ g.L}^{-1}$, que é a menor concentração utilizada nos ensaios do item anterior (4.4.1). Outro ensaio avaliou a remoção de sulfato tendo apenas o pó de penas como fonte de matéria orgânica.

Frascos de vidro de 170mL contendo 142,5mL de meio de cultura Postgate C modificado, com e sem lactato, em pH 7,0 (previamente esterilizados em autoclave - 120°C; 1,0atm; 20min), 7,5 mL de inóculo (5% v/v) e 1%, 2%, 3% ou 4% (p/v) de pó de penas foram utilizados para os ensaios em duplicata. Como controle foram utilizados frascos nas mesmas condições (pó de penas com e sem lactato), não inoculados. O controle também foi realizado em duplicata, e a concentração de pó de penas era de 2% (p/v). Todos os frascos eram lacrados com tampa de borracha. Os experimentos tiveram duração de 240 horas. Diariamente, uma alíquota de aproximadamente 3mL era retirada para as análises da concentração de sulfato, Eh e pH. Nesses ensaios nos quais o pó de penas foi adicionado, não foi possível obter os valores de D.O, já que o pó de penas em suspensão interferiria nesse tipo de análise que leva em conta a turbidez do meio.

4.5 Relação entre substrato e remoção de As^{3+}

4.5.1 Enriquecimento da cultura mista de BRS contendo As^{3+}

As culturas mistas obtidas para os ensaios de remoção de sulfato, contendo: (1) lactato de sódio; (2) lactato de sódio e pó de penas; e (3) somente pó de penas como substrato orgânico, foram adaptadas ao meio de cultura Postgate C modificado contendo As^{3+} . Uma solução estoque foi preparada utilizando $NaAsO_2$, a concentração de As^{3+} nessa solução era de $1000mg.L^{-1}$. Depois de autoclavada (120°C; 1,0atm; 20min), a solução foi mantida estéril e acondicionada em geladeira. A adaptação da cultura foi iniciada utilizando $0,5mL.L^{-1}$ de As^{3+} . Após o crescimento microbiano, evidenciado pela formação de precipitado de cor negra (devido à precipitação de FeS), a cultura passou a ser cultivada em $1mg.L^{-1}$ de As^{3+} . O mesmo procedimento foi repetido, dobrando-se a concentração de As^{3+} a cada ciclo de três repiques, até obter uma cultura capaz de crescer e remover sulfato em uma concentração de $4mg.L^{-1}$ de As^{3+} . Essas culturas adaptadas foram utilizadas para os testes de remoção biológica de sulfato e As^{3+} . Assim, foram testadas três condições diferentes: lactato de sódio mais As^{3+} (condição LAs); lactato, pó de penas e As^{3+} (condição PLAs) e pó de penas mais As^{3+} (condição PPAs).

4.5.2 Lactato como substrato orgânico

A remoção de As^{3+} foi analisada em ensaios contendo o meio de cultura (Postgate C modificado) e inóculo previamente adaptado em uma concentração de 4mg.L^{-1} de As^{3+} .

As mesmas relações DQO/sulfato utilizadas no item 4.4.1 foram também utilizadas nos testes de remoção de As^{3+} . Ou seja, razões 0,67; 1; 2 e 3. Frascos de vidro de 600mL contendo 473mL de meio de cultura (Postgate C modificado), pH 7,0; previamente esterilizados em autoclave (120°C ; 1,0atm; 20min), 25mL (5%v/v) de inóculo e 2,1mL da solução estoque contendo As^{3+} foram utilizados para os ensaios em duplicata (figura 4.3). Os frascos eram lacrados com tampa de borracha. O ensaio teve tempo de duração de 240 horas, sendo que diariamente, uma alíquota de aproximadamente 13mL era retirada para as análises de crescimento microbiano, concentração de sulfato, valor de pH, potencial de oxi-redução (Eh) e concentração de arsênio. Como controle foi utilizado um frasco preparado nas mesmas condições, porém, não inoculado.



Figura 4.3. Frascos de vidro (600mL) utilizados para os testes de remoção de sulfato e arsênio contendo apenas lactato como substrato orgânico.

4.5.3 Pó de penas como substrato orgânico

A cultura mista utilizada nos ensaios de remoção biológica de sulfato, contendo o pó de penas com e sem lactato de sódio, foi previamente adaptada em meio de cultivo (Postgate C modificado) contendo As^{3+} (4mg.L^{-1}) para utilização nos ensaios de remoção de As^{3+} .

Dois ensaios diferentes foram realizados para avaliar a remoção de As^{3+} . No primeiro, foi utilizado apenas o pó de penas como substrato orgânico (condição PPAs) em diferentes concentrações; no segundo, além do pó de penas, foi utilizado também o lactato de sódio (condição PLAs). Neste último, a concentração de lactato era fixa ($1,2 \text{ g.L}^{-1}$), variando-se apenas a concentração do pó de penas.

Em ambos os ensaios foram utilizados frascos com volume útil de 600mL onde eram adicionados 473mL de meio de cultura Postgate C modificado (pH 7,0), previamente autoclavado (120°C ; $1,0\text{atm}$; 20min), 25mL de inóculo; 2,1mL de solução estoque contendo As^{3+} e concentrações variadas de pó de penas: 1%, 2%, 3% ou 4% (p/v) (figura 4.4). Um frasco contendo o mesmo volume de meio de cultura (com $1,2\text{g.L}^{-1}$ de lactato), solução estoque de As^{3+} , 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 240 horas de cultivo, alíquotas de 13mL eram retiradas a cada 24h para realização das análises de concentração de sulfato, pH, Eh, e concentração de As^{3+} . Todos os testes foram realizados em duplicata.



Figura 4.4. Frascos de vidro (600mL) utilizados nos testes de remoção de sulfato e As^{3+} contendo pó de penas.

A figura 4.5 representa os ensaios realizados em batelada na presença e ausência de As^{3+} , e esquematiza as condições de cultivo utilizadas em relação ao substrato orgânico utilizado apresentado nos itens anteriores.

4.6 Métodos Analíticos

Os parâmetros avaliados durante os experimentos foram: valor de pH, potencial de oxi-redução (Eh), concentração de sulfato, concentração de arsênio, e densidade ótica (somente para o cultivo contendo lactato).

O crescimento microbiano foi determinado pelo método indireto baseado na medida da turbidez do meio. O aumento do número de células bacterianas durante o tempo foi estimado pela densidade óptica (D.O). A variação na absorbância da amostra, analisada em comprimento de onda de 600nm, está relacionada com o aumento no número de células. Para a obtenção da Densidade Óptica foi coletada uma alíquota de 2mL de amostra que foi analisada em um espectrofotômetro uv/vis (Micronal – B582).

A concentração de sulfato foi estimada através do Método Turbidimétrico (Kolmert *et al.*, 2000). De acordo com esse método, o sulfato presente em solução é precipitado através da adição de cloreto de bário na presença de solução ácida, assim, a concentração de sulfato pode ser mensurada pela determinação da absorbância em 420nm em espectrofotômetro uv/visível (Micronal – B582).

Para a determinação da concentração de sulfato no meio, 1mL de amostra era diluída em balão de 10mL, em seguida essa solução era centrifugada em centrífuga (Thermo Multifuge X1R – rotor FIBERLite F155-8x50cy, 10000rpm, 15 min). Do sobrenadante eram retirados 1mL e transferidos para um tubo cônico contendo o mesmo volume de solução condicionante (tabela 4.3). Em seguida, o cloreto de bário, em excesso, era adicionado, sendo então a solução levada ao espectrofotômetro para leitura da absorbância em 420nm.

Tabela 1.3. Composição da solução condicionante utilizada para análise da concentração de sulfato.

Composição	
Cloreto de Sódio	150 g
Glicerol	126 g
Ácido Clorídrico	60 mL
Etanol (95%)	200 mL
Água destilada q.s.p 1000mL	

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^{3+} , era retirada uma alíquota de 10mL de amostra a qual era centrifugada (Centrífuga Thermo - Multifuge X1R; rotor FIBERLite F155-8x50cy; 10000rpm, 15min). Logo em seguida a amostra era filtrada em membrana de celulose 0,45 μm (Sartorius) e o filtrado acondicionado em frascos âmbar com volume de 10mL, acrescidas de ácido nítrico (50 μL) para preservação da amostra. A análise da concentração de As^{3+} foi realizada em Espectrofotômetro de Emissão Atômica com fonte Plasma (Spectro/Modelo – Ciro CCD com Visão Radial), pelo laboratório de Geoquímica Ambiental do Departamento de Geologia da UFOP. Utilizando-se esta técnica era possível determinar apenas a concentração de arsênio total, porém, como era introduzido apenas o As^{3+} nos meios de cultivo, e, além disso, os frascos eram mantidos em condições redutoras, foi admitido que a concentração de arsênio total representava a concentração de As^{3+} .

4.7 Atividade metabólica das BRS em condição semi-contínua

A atividade metabólica da cultura mista contendo BRS, utilizada nos itens anteriores, foi avaliada em condição semi-contínua. Os mesmos parâmetros analisados anteriormente, na condição de cultivo em batelada, foram avaliados: pH, Eh, concentração de sulfato e As^{3+} , em relação à diferentes concentrações de substrato orgânico: lactato de sódio e pó de penas.

Para o emprego da condição semi-contínua, um reator foi construído utilizando uma coluna de condensação, comumente utilizada em destiladores. A coluna com 80cm de altura e 4cm de diâmetro possui dimensões internas de 60cm de altura e 2cm de diâmetro (figura 4.6). A coluna interna continha o meio de cultura (Postgate C modificado) inoculado com a cultura obtida no item 4.2. Através da coluna externa era recirculada água destilada em uma temperatura de 32°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) para manutenção da temperatura no interior do reator. A água recirculante era mantida aquecida com a ajuda de um aquecedor de bancada (Fisatom) e a circulação da água era garantida por uma bomba peristáltica.

Para a construção do reator, foi acoplada uma seringa de 10mL à porção inferior e outra de mesmo volume à porção superior da coluna de condensação, de modo que o volume útil utilizado no reator (coluna interna) era de 120mL. Através das seringas era possível alimentar o reator e retirar alíquotas para a realização das análises de interesse.

Cerca de 10mL era introduzidos ao reator para a alimentação e o mesmo volume era retirado para a realização das análises rotineiras. A alimentação do reator era realizada na porção inferior, enquanto a retirada de alíquotas para análises se dava na porção superior, gerando assim, um fluxo ascendente do afluente.

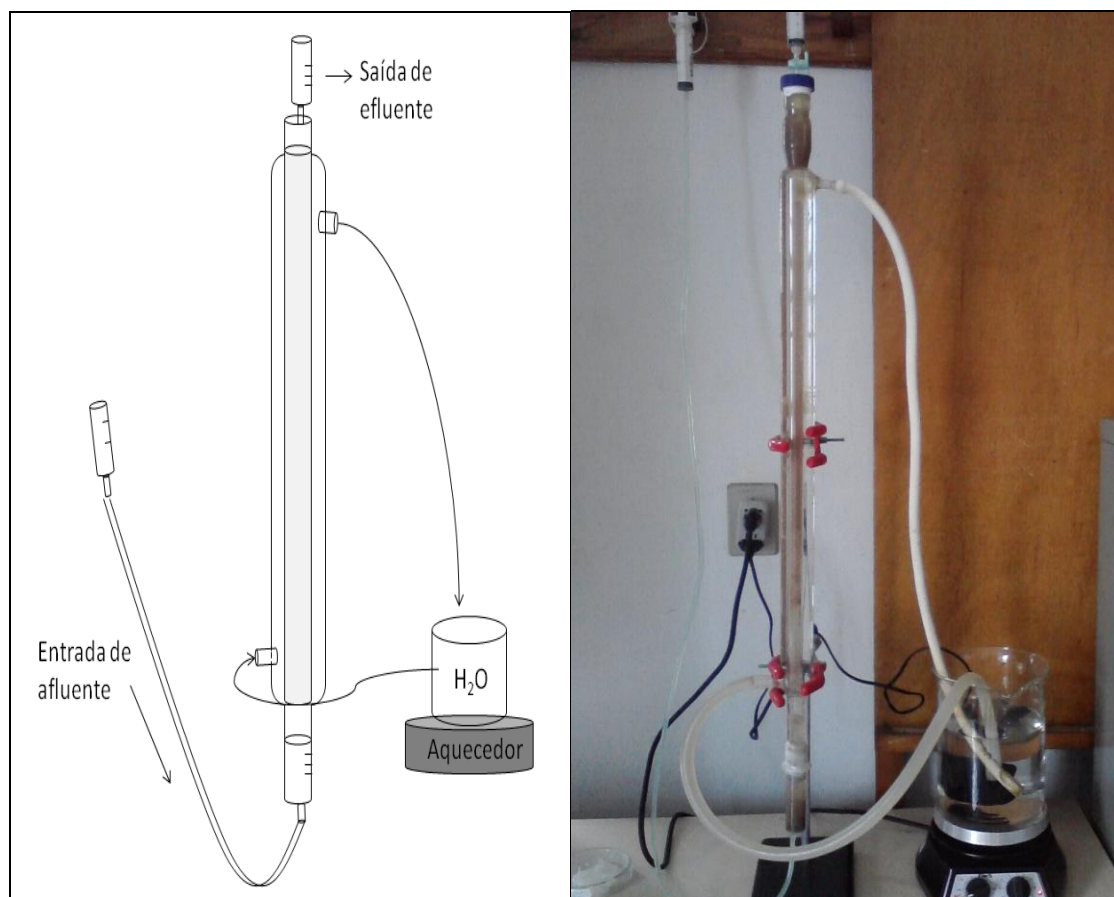


Figura 4.6. Esquema (esquerda) e foto (direita) representando o reator semi-contínuo.

O reator pode ser considerado semi-contínuo uma vez que a alimentação não ocorria de forma continuada, mas sim em ciclos, em dias alternados. Para a partida do reator, cerca de 120mL de meio Postgate C modificado foram previamente inoculados com a cultura de BRS e introduzido no reator. O meio de cultura continha pó de penas (2% p/v) e lactato de sódio ($1,2 \text{ g.L}^{-1}$) como substrato orgânico.

Durante 32 dias o reator foi mantido em fase de estabilização, para proliferação da biomassa, sendo que nesse período a alimentação e retirada de alíquota do reator ocorria a cada 7 dias. Decorrido o prazo de estabilização, o reator passou a ser avaliado em dias alternados. No período de 35 a 67 dias de operação, o afluente sintético (meio de cultura) sofreu acréscimo na concentração de lactato para $5,6 \text{ g.L}^{-1}$, correspondendo ao valor

utilizado para a razão DQO/sulfato 3, porém, o pó de penas deixou de ser introduzido nesse período.

A partir do 70º dia de operação, houve o início de perda do pó de penas que foi introduzido durante a fase de estabilização do reator. Assim, no período de 70 a 93 dias de operação, foi introduzido meio contendo lactato ($5,6\text{g.L}^{-1}$) acrescido de pó de penas (2% p/v). A perda de pó de penas ocorreu uma vez que este não estava imobilizado no interior do reator, e o próprio fluxo do afluente carregava o pó de penas que era perdido quando se retirava alíquotas do efluente. No 95º dia de operação, o meio introduzido no reator sofreu nova modificação, deixou de ser adicionado o pó de penas e adicionou-se arsênio³⁺ (4mg.L^{-1}).

Desde o período de estabilização do reator, o mesmo foi monitorado em relação ao valor de pH, Eh e concentração de sulfato, que foi apresentada como Eficiência de Remoção de Sulfato (ERS), onde a concentração de sulfato inicial do reator era subtraída à concentração final de sulfato de cada fase, definida na equação 4.1. A avaliação da concentração de As^{3+} remanescente só foi iniciada no 113º dia de operação, já que a alimentação do reator era realizada em ciclos e não continuamente. A tabela 4.4 representa de forma resumida as condições de operação do reator. Todos os parâmetros analisados no efluente do reator seguiram a metodologia descrita no item 4.6.

Tabela 4.4. Condições de operação do reator semi-contínuo em relação aos dias de operação.

Reator semi-contínuo		
Fase	Dias de Operação	Condição
1ª	1º-32º	Estabilização. Meio contendo lactato ($1,2\text{g.L}^{-1}$) e pó de penas (2% p/v)
2ª	35º-67º	Meio contendo apenas lactato ($5,6\text{g.L}^{-1}$)
3ª	70º-93º	Meio contendo lactato ($5,6\text{g.L}^{-1}$) e pó de penas (2% p/v)
4ª	95º-174º	Adição de As^{3+} (4mg.L^{-1}). Meio contendo apenas lactato ($5,6\text{g.L}^{-1}$)
5ª	176º-202º	Concentração de As^{3+} de 8mg.L^{-1} . Meio contendo lactato ($5,6\text{g.L}^{-1}$)

5. Resultados e discussão

5.1 Coleta e Enriquecimento das BRS

Barbosa (2009) realizou estudos com BRS coletadas também da Lagoa do Gambá, Ouro Preto (MG), obtendo remoções satisfatórias de sulfato e alguns metais pesados como níquel, cobre e manganês. Por este motivo, esse local foi escolhido para a coleta de sedimento que originaria o consórcio microbiano a ser utilizado no presente trabalho. O sedimento coletado na Lagoa do Gambá, e utilizado para o enriquecimento das culturas de BRS, foi avaliado quanto à concentração total de arsênio, não sendo encontrado tal metalóide no sedimento. Assim, os micro-organismos presentes nesse ambiente não estavam previamente adaptados ao contato com o elemento.

Ao realizar o enriquecimento da cultura, a presença de BRS pode ser indiretamente evidenciada pela formação de precipitado no meio. Esse precipitado de cor escura se deve à formação de sulfeto de ferro (FeS) resultante da reação química entre o ferro presente no meio e o H_2S produzido microbiologicamente. Com isso, o meio de cultura enegrecido foi usado como indicativo da presença de BRS. Antes de cada ensaio, as culturas foram adaptadas, através de sucessivos repiques, às condições testadas: presença de pó de penas, presença de lactato de sódio e de arsênio trivalente. A figura 5.1 mostra frascos contendo cultura de BRS com a formação de precipitado negro de sulfeto de ferro, característico do crescimento microbiano.



Figura 5.1. Amostra LG. Cultivo em meio líquido, a 35°C, pH 7,0. Presença (esquerda) e ausência (direita) de precipitação negro, característico do crescimento de BRS.

5.2 Caracterização do pó de penas

O pó de penas utilizado nos ensaios de remoção de sulfato e As^{3+} foi caracterizado, objetivando avaliar seu potencial para uso como substrato orgânico para o cultivo de BRS bem como sua influência no processo de imobilização de As^{3+} solúvel. A relação DQO/DBO indica o quanto o material seria biodegradável. O valor obtido, 1,14 (tabela 5.1), aponta para a biodegradabilidade do material de acordo com dados teóricos (Aziz e Tebbutt, 1980). Os compostos orgânicos presentes na fração líquida da suspensão, produzida de acordo com o item 4.3, e que estariam disponíveis para serem usados no processo de respiração anaeróbia pela cultura de BRS foram mensurados através da análise de TOC, revelando uma concentração de 2302mg.L^{-1} de carbono. Esses compostos orgânicos, muito provavelmente, são, em sua maioria, proteínas, uma vez que o material analisado (pó de penas) tem uma grande constituição protéica (Scapim *et al.*, 2003). A análise da concentração de proteínas solúveis e glicose foi realizada na mesma solução utilizada para a análise de TOC, apontando uma concentração de 23mg.L^{-1} de proteínas e 6mg.L^{-1} de glicose.

Foi ainda avaliada a concentração de sulfato solúvel a partir da suspensão contendo o pó de penas. O sulfato liberado por esse material poderia ser utilizado no processo metabólico das BRS. Porém, a concentração de sulfato obtida foi pequena, 84mg.L^{-1} , e pode ser considerada insuficiente para suprir o sulfato necessário para o cultivo de BRS, visto que os meios de cultura mais comumente utilizados contém concentrações bem maiores de sulfato, da ordem de 2 a 4 gramas (Postgate e Gal, 1973). Sendo assim, mesmo ao se utilizar o pó de penas no cultivo de BRS é necessário a adição de sulfato ao meio.

Os ácidos orgânicos encontrados após 240 horas de cultivo de BRS em meio contendo pó de penas foram lactato e acetato, porém em concentrações muito baixas, apenas $12,5$ e 4mg.L^{-1} , respectivamente. A ausência de ácidos orgânicos como propiônico, butírico, isovalérico e isobutírico, parece indicar que não houve uma utilização significativa dos compostos orgânicos presentes no pó de penas no processo de respiração pelas BRS.

Tabela 5.1. Caracterização físico-química do pó de penas quanto à fração solúvel e insolúvel.

Fração insolúvel		Fração solúvel					
		Composição química (mg.L ⁻¹)					
Granulometria	<24 mesh (0,71mm)	Sulfato	84	Cobre	0,013	Ferro	0,47
Densidade	1,242 g.cm ⁻³	DBO	6661	Fósforo	71,1	Enxofre total	340
Área superficial	0,787 m ² .g ⁻¹	DQO	7607	Potássio	163	Silício	3
Volume de microporos	0,00037 cm ³ .g ⁻¹	DQO/ DBO	1,14	Magnésio	36,65	Zinco	0,94
Área de microporos	1,038 m ² .g ⁻¹	TOC	2302	Manganês	0,67	Cálcio	15,6

Os principais elementos químicos presentes em solução aquosa contendo o pó de penas estão listados na tabela 5.1. Apesar de a grande maioria estar presente em baixas concentrações, esses dados podem indicar que o pó de penas poderia ser utilizado como uma fonte de nutrientes para o crescimento dos micro-organismos, uma vez que estão presentes elementos importantes aos processos metabólicos, como: cálcio, potássio, magnésio, fósforo e enxofre. Além disso, o alto teor de enxofre presente no material pode influenciar positivamente na imobilização de As, tal aspecto será discutido posteriormente no item 5.3.5.

Em relação à fração sólida do pó de penas, esta foi analisada pela técnica de BET, que fornece parâmetros como área superficial e volume de microporos do material. Esses parâmetros são importantes para materiais que serão utilizados como adsorventes, uma vez que a relação entre a área superficial do material e sua capacidade de adsorção são diretamente proporcionais enquanto o oposto ocorre com relação à sua granulometria. A área superficial obtida foi de 0,787 m².g⁻¹, e o volume de microporos observado foi de 0,00037 cm³.g⁻¹ (tabela 5.1). Apesar de possuir uma área superficial e volume de microporos bem inferior ao encontrado em outros materiais adsorventes, o pó de penas pode ser utilizado como material adsorvente para a remoção de As³⁺, o que foi comprovado por Teixeira e Ciminelli (2005), que obtiveram remoções de cerca de 170 µmolAs/g biomassa.

5.3 Relação entre o substrato orgânico e o metabolismo das BRS

5.3.1 Potencial de oxi-redução (Eh) e pH

O valor do potencial de oxi-redução (Eh) do meio é de extrema importância para o cultivo de BRS, uma vez que esse grupo microbiano requer um ambiente redutor para seu crescimento, o que significa valores de Eh em torno de -100 a -300mV (Postgate *et al.*, 1984). A própria produção de sulfeto gerada pelo metabolismo das BRS é responsável por manter baixo o Eh (Gibson, 1990), e esse, por sua vez, pode ser um bom indicativo da atividade metabólica das BRS. Assim, o Eh tem a tendência de diminuir com o passar do tempo, quando há a predominância de BRS em um cultivo microbiano. A figura 5.2 mostra os valores de Eh obtidos durante os cultivos em que foram utilizados substratos orgânicos diferentes, na presença e ausência de As^{3+} .

Tanto a utilização de lactato quanto de pó de penas, ou mesmo a mistura entre os dois, como substrato orgânico para o cultivo de BRS propiciou uma diminuição considerável do valor de Eh no meio. Indicando que ambos os substratos promovem um ambiente adequado ao crescimento desses micro-organismos em termos de condições redox. O mesmo efeito não foi observado para os frascos de controle abióticos. Assim, a diminuição do valor de Eh nas condições estudadas é totalmente dependente do metabolismo das BRS.

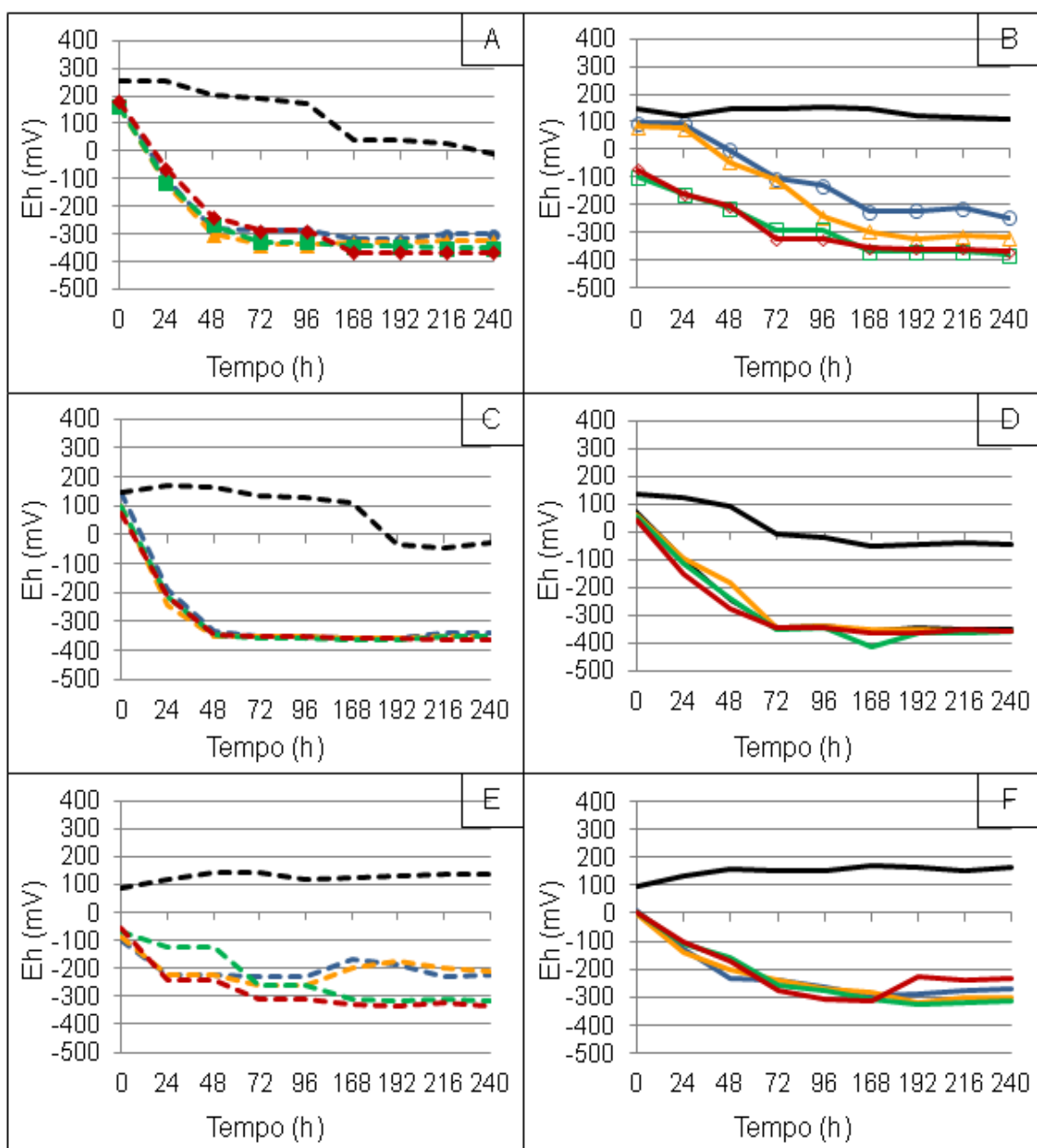


Figura 5.2. Valores de Eh em relação às diferentes condições avaliadas: A e B – Lactato, C e D – Lactato ($1,2\text{g.L}^{-1}$) e pó de penas (diferentes concentrações), E e F – Pó de penas (diferentes concentrações). Ausência (linha tracejada) e presença de As^{3+} (linha sólida). Para A e B: $\circ$ razão DQO/sulfato 0,67; Δ razão 1; $\square$ razão 2; $\diamond$ razão 3; linha preta: controle abiótico. Para C, D, E e F: azul: 1% de pó de penas, laranja: 2%, verde: 3%, vermelho: 4% e preto: controle abiótico.

No que diz respeito ao pH do meio de cultivo de BRS, é sabido que esses micro-organismos tem capacidade de crescer em uma ampla faixa de pH, porém os valores onde geralmente são obtidas as melhores remoções de sulfato são em valores próximos à neutralidade (Postgate *et al.*, 1984). Além disso, Barbosa (2009) ao utilizar uma cultura mista contendo BRS, que foi proveniente do mesmo ambiente que a cultura utilizada pelo

presente trabalho (Lagoa do Gambá), encontrou remoções de sulfato mais satisfatórias ao se utilizar meio de cultura em pH neutro (7,0) do que em pH ácido (5,5). Assim, foi utilizado o valor inicial de pH 7,0 nos ensaios; a fim de garantir um ambiente favorável à atividade metabólica desses micro-organismos.

A figura 5.3 apresenta os valores de pH obtidos, nas diferentes condições estudadas, em relação ao tempo de cultivo. Ambos os resultados, Eh e pH, foram obtidos à partir das médias das duplicatas. No decorrer dos ensaios, os valores de pH de todas as condições, apresentaram um decréscimo bem acentuado nas primeiras horas. Tal efeito foi mais marcante naquelas condições de cultivo que empregavam o pó de penas de galinha como fonte de nutrientes e material suporte, a acidificação do meio é diretamente proporcional à massa de material sólido empregado. Além disso, este fenômeno parece depender da participação dos micro-organismos visto que a redução de pH é menor nos frascos controle. Os baixos valores de pH muito provavelmente estão relacionados ao processo de respiração celular, onde a metabolização dos compostos orgânicos tem como produto intermediário os ácidos orgânicos de cadeia curta. Com o passar do tempo, entretanto, tais valores se aproximaram novamente do valor inicial, muito provavelmente, devido à presença de íons bicarbonato gerados pela degradação biológica do substrato orgânico (Kaksonen *et al.*, 2003), como pode ser observado em todas as condições de cultivo, exceto para os frascos de controle abióticos.

Ao se comparar as condições de cultivo estudadas, é possível perceber que a introdução de As^{3+} no sistema não foi prejudicial ao metabolismo das BRS, o que pode ser percebido pelos valores de pH e Eh que foram bem semelhantes tanto na presença quanto ausência do metalóide.

Em relação às concentrações de substrato orgânico utilizado nos testes, a variação ocorrida nesses ensaios não foi suficiente para interferir de forma substancial o comportamento do pH e Eh do sistema.

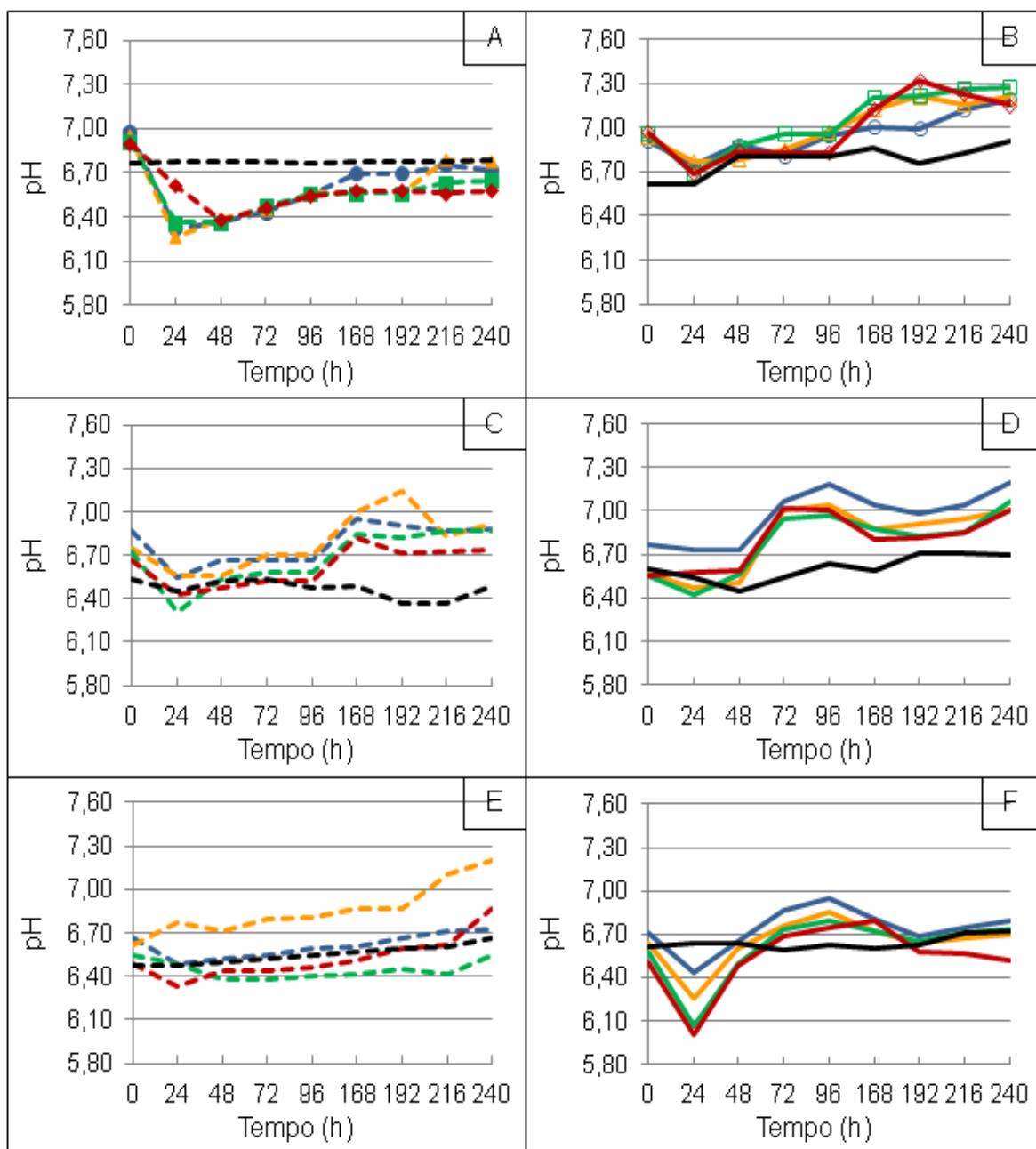


Figura 5.3. Valores de pH nas diferentes condições estudadas: A e B – Lactato, C e D – Lactato ($1,2\text{g.L}^{-1}$) e pó de penas, E e F – Pó de penas. Ausência (linha tracejada) e presença de As^{3+} (linha sólida). Para A e B: $\circ$ razão DQO/sulfato 0,67; Δ razão 1; $\square$ razão 2; $\diamond$ razão 3; linha preta: controle abiótico. Para C,D,E e F: azul: 1% de pó de penas, laranja: 2%, verde: 3%, vermelho: 4% e preto: controle abiótico.

5.3.2 Crescimento microbiano (Densidade Óptica)

O acompanhamento dos valores de D.O ao longo do cultivo foi realizado apenas nos cultivos contendo somente o lactato de sódio como substrato orgânico. Como essa análise depende da turbidez do meio, as amostras contendo pó de penas tinham sua turbidez afetada pelas partículas do pó em suspensão, havendo portanto, interferências na análise indireta do crescimento microbiano por meio da medida da turbidez do meio.

Assim, foram comparadas as condições contendo o lactato na presença/ausência de As^{3+} . Através da figura 5.4 (médias das duplicatas) é possível perceber que ambas as condições apresentaram valores máximos de produção de biomassa semelhantes, contudo, os picos relativos ao final da fase exponencial de crescimento apresentaram-se deslocados em função do tempo. Na ausência de As^{3+} a fase exponencial foi mais curta, sendo o crescimento microbiano mais acentuado que na presença do metaloide. No experimento que continha As^{3+} o crescimento microbiano mais lento indica que esse metaloide interfere no cultivo dos micro-organismos. Teclu *et al.* (2009) observaram comportamento semelhante; na presença de As^{3+} o crescimento celular das BRS foi ligeiramente afetado, ocorrendo um aumento na fase lag e um crescimento mais lento dos micro-organismos.

Em relação às razões DQO/sulfato, ambas as condições apresentaram o mesmo comportamento, sendo a maior relação (razão 3,0) aquela na qual se obteve maior crescimento microbiano. Diversos autores (Barbosa *et al.*, 2009; Velasco *et al.*, 2008; El Bayoumy *et al.*, 1999) reportam a importância da relação DQO/sulfato para o cultivo de BRS e como essa relação pode ser determinante para o processo de remoção de sulfato, uma vez que, ao se modificar esta relação, observa-se variação na densidade de células, principalmente em consórcios microbianos mistos. A relação DQO/sulfato é importante para assegurar a prevalência de BRS em um ambiente misto e é variável em relação ao consórcio utilizado, visto que culturas mistas contêm diversidade e riqueza distintas de micro-organismos (Chou *et al.*, 2008). O predomínio dos grupos microbianos determinado pela relação DQO/sulfato, se deve à competição entre BRS e Bactérias Metanogênicas pelos produtos intermediários do metabolismo do substrato orgânico (lactato) como acetato e H_2 (Oremland e Polcin, 1982).

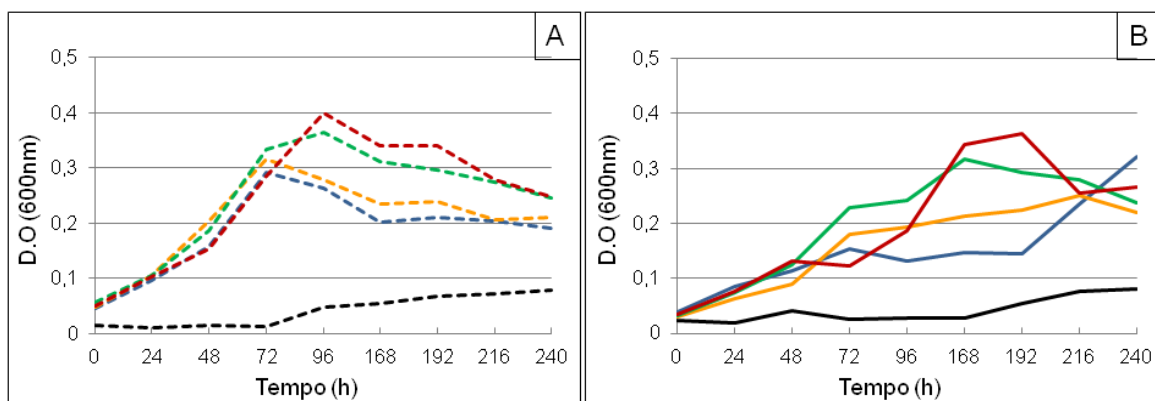


Figura 5.4. Densidade Óptica em meio contendo lactato de sódio, na ausência (A) e presença de As^{3+} (B). Azul – razão 0,67; laranja – 1; verde – 2; vermelho – 3 e preto – controle abiótico.

5.3.4 Consumo biológico de sulfato

O consumo de sulfato foi relacionado ao tipo de substrato orgânico utilizado (lactato e/ou pó de penas) e suas concentrações (razão DQO/sulfato ou porcentagem do pó de penas). A razão DQO/sulfato teórica, de 0,67 foi comparada com as razões 1,0; 2,0 e 3,0. A razão teórica é considerada ideal, porque nessa concentração todo o substrato orgânico é metabolizado pela célula a dióxido de carbono (pelos micro-organismos capazes de realizar a oxidação completa da matéria orgânica) via redução dissimilativa de sulfato, de acordo com a equação 5.1:



Em relação ao cultivo contendo apenas lactato de sódio, é nítida a influência da razão DQO/sulfato em relação ao consumo de sulfato (tabela 5.2). Cada razão obteve um consumo distinto, sendo a razão teórica a que promoveu a menor remoção de sulfato nas condições testadas. Alguns autores já mostraram que a razão DQO/sulfato considerada ideal (0,67) não é a mais eficiente para o processo de remoção de sulfato (Cao *et al.*, 2008; El Bayoumy *et al.*, 1999). Alguns grupos de BRS não são capazes de consumir a matéria orgânica completamente, ou seja, oxidá-la a CO_2 , assim, a razão 0,67 não representaria de fato a concentração de matéria orgânica necessária para todo o consumo de sulfato. A maior razão (3,0) obteve o maior consumo de sulfato, tanto na presença, quanto na ausência de As^{3+} , sendo 84,3% e 56,2%, respectivamente.

A presença de metais pesados ou metalóides em um cultivo microbiano são geralmente tóxicos para BRS porque são capazes de substituir íons essenciais que compõem a estrutura celular e bloquear grupos funcionais de moléculas importantes como enzimas, promovendo danos a integridade da membrana celular, desnaturação e inativação de enzimas celulares (Sani *et al.*, 2001), assim, a presença desses compostos podem afetar a atividade metabólica e, conseqüentemente, diminuir a eficiência de remoção de sulfato pelos micro-organismos (Martins *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2006). Um comportamento antagônico, contudo, foi observado nos testes de remoção de sulfato onde o lactato era utilizado como substrato orgânico. Nesses testes, como mostra a figura 5.5, a remoção de sulfato foi maior na presença do que na ausência de As^{3+} . Tal fato pode ser explicado pela diminuição da concentração de sulfeto presente no sistema, visto que este composto, em altas concentrações, pode inibir o metabolismo das BRS (Madigan *et al.*, 2004). O As^{3+} ao reagir com o sulfeto é precipitado, diminuindo suas concentrações na fração solúvel do meio, favorecendo a atividade metabólica das BRS. Na ausência do As^{3+} o sulfeto estaria presente em maior concentração na fração solúvel do meio do que na presença de As^{3+} . Nas concentrações empregadas neste trabalho, o sulfeto solúvel parece possuir maior efeito inibitório sobre as BRS do que os íons arsenicais trivalentes.

Outra hipótese para o maior consumo de sulfato na presença do As seria a pressão seletiva exercida por esse composto durante o crescimento microbiano. Na presença do metaloide os micro-organismos ali presentes teriam a necessidade de estarem mais ativos metabolicamente para conseguirem vencer esse estresse em sua condição de cultivo. Assim, o consumo de sulfato conseqüentemente seria maior.

Quando o lactato foi utilizado juntamente com o pó de penas, sua concentração era de $1,2g.L^{-1}$, essa era a menor concentração utilizada nas razões DQO/sulfato analisadas, escolhida pelo fato de disponibilizar pequenas concentrações de matéria orgânica para o metabolismo das BRS, forçando assim, que esses micro-organismos metabolizassem a matéria orgânica presente no pó de penas.

Nas condições onde o pó de penas estava presente, a remoção de sulfato não sofre variação em relação à concentração do pó de penas, ou seja, nas condições experimentais empregadas, pequenas variações na concentração desse material não são suficientes para que se observem alterações no processo de remoção biológica do sulfato. Esse comportamento foi percebido tanto na presença quanto na ausência de As^{3+} . Ao contrário do que foi observado na condição contendo apenas lactato (figura 5.5 A e B), nos frascos

contendo além do lactato, o pó de penas (figura 5.5 C e D) a remoção de sulfato foi baixa e semelhante tanto na presença quanto na ausência de As^{3+} .

Ao se utilizar apenas o pó de penas como substrato orgânico (figura 5.5 E e F), a remoção de sulfato foi ainda menor, inferior a 20%, tanto na presença quanto na ausência de As^{3+} . O inóculo utilizado nos ensaios, apesar de conter uma cultura mista de microorganismos, muito provavelmente contém poucos grupos microbianos além das BRS, uma vez que a produção de sulfeto gerado pelo metabolismo das mesmas pode inibir o crescimento de outros grupos bacterianos (Gibson, 1990). Assim, a ausência de grupos como bactérias fermentadoras e hidrolíticas pode ter sido crucial para a disponibilização de compostos orgânicos que pudessem ser utilizados no metabolismo das BRS. As BRS utilizam como fonte orgânica, em sua maioria, compostos orgânicos de cadeia curta, que podem ser gerados através da oxidação da matéria orgânica por outros grupos microbianos (Muyzer *et al.*, 2008). Ou seja, a matéria orgânica presente na solução contendo o pó de penas pode ser complexa e a participação de outros grupos microbianos, além das BRS, seria fundamental para a degradação dessa matéria orgânica.

Assim, é possível admitir que o pó de penas, utilizado como fonte de matéria orgânica nas condições aplicadas nesse trabalho, não é suficiente como fonte exclusiva de matéria orgânica para garantir o crescimento satisfatório das BRS e o processo metabólico de redução e remoção de sulfato.

Como evidenciado pela tabela 5.2, o pó de penas é um material interessante do ponto de vista nutricional para o cultivo de BRS, porém, sua utilização como única fonte de matéria orgânica requer estudos mais aprofundados. Seu uso pode ser mais interessante se aliado a outros compostos orgânicos já conhecidos, como o lactato de sódio. O baixo custo ao se empregar um resíduo como o pó de penas representa interesse econômico. A economia alcançada substituindo-se parte da matéria orgânica líquida (etanol ou lactato de sódio) usualmente empregada nos processos de tratamento de sulfato, por um material sólido e de baixo custo pode ser interessante para o setor industrial.

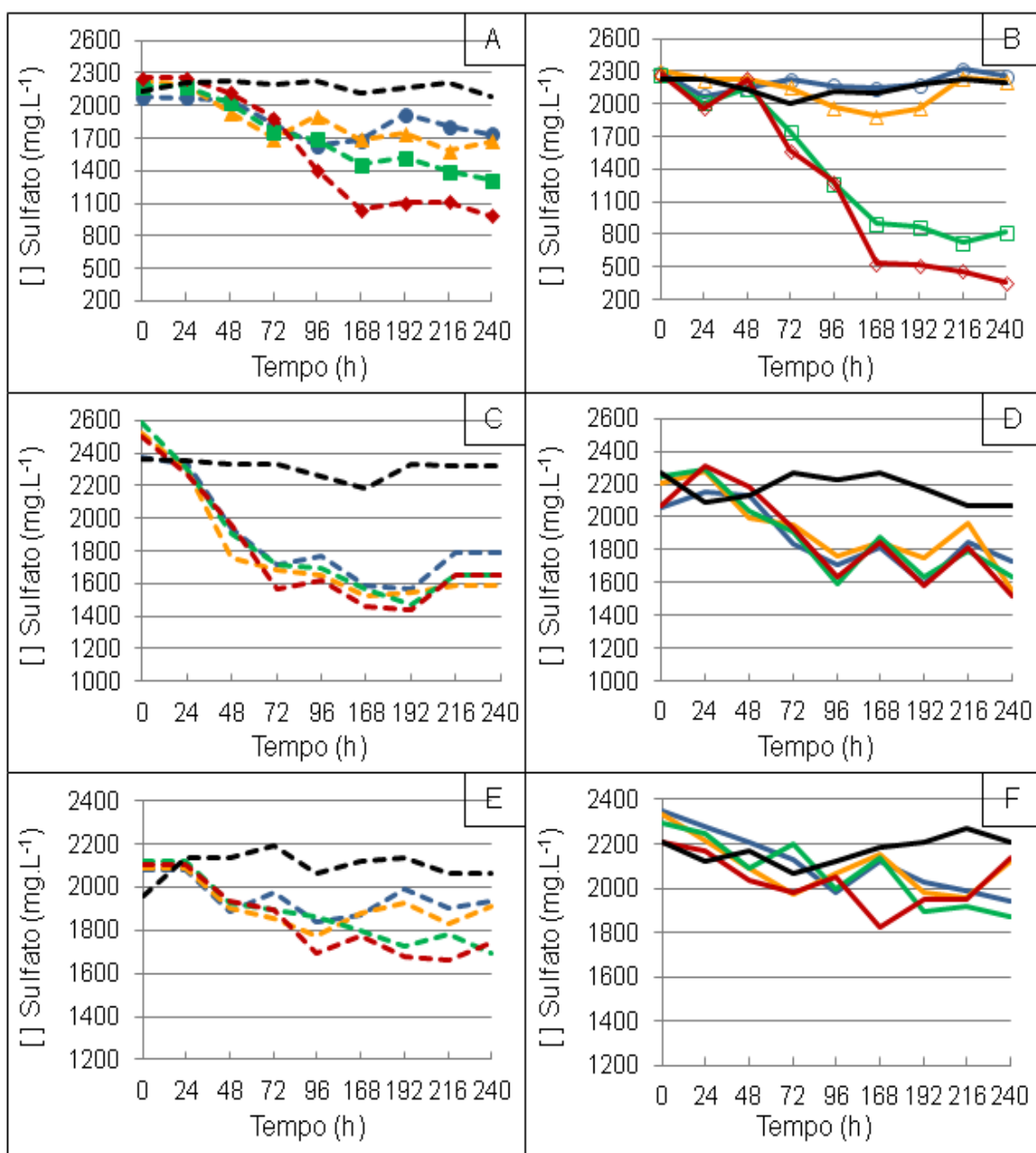


Figura 5.5. Consumo biológico de sulfato em relação às diferentes condições estudadas: A e B - Lactato, C e D – Lactato e pó de penas, E e F – Pó de penas. Ausência (linha tracejada) e presença de As³⁺ (linha contínua). Para A e B: ○ razão DQO/sulfato 0,67; △ razão 1; □ razão 2; ◇ razão 3; linha preta: controle abiótico. Para C,D,E e F: azul: 1% de pó de penas, laranja: 2%, verde: 3%, vermelho: 4% e preto: controle abiótico.

Tabela 5.2. Remoção biológica de sulfato e As^{3+} por BRS em relação ao tipo de substrato orgânico e sua concentração inicial.

*ERS: Eficiência da Remoção de Sulfato

Cultivos sem Arsênio			Cultivos com Arsênio				
Sulfato consumido (mg.L ⁻¹)		ERS* (%)	Sulfato consumido (mg.L ⁻¹)		ERS* (%)	As removido (mg.L ⁻¹)	As removido (%)
Condição L - Lactato			Condição LAs - Lactato + As ³⁺				
Razão 0,67			Controle	23	1,1	0,147	3,5
	343	16,5	Razão 0,67	29	1,3	1,69	38
			Razão 1	102	4,4	1,90	49,1
	548	24,7	Razão 2	1444	63,7	3,55	87,4
			Razão 3	1911	84,3	3,54	86,2
	862	39,7					
Razão 3	1267	56,2					
Condição PL – Pó de Penas + Lactato			Condição PLAs - Lactato + Pó de Penas + As ³⁺				
1%			Controle	72	3,2	0,182	5,5
	582	24,5	1%	327	15,9	3,80	91,7
			2%	647	29,4	3,53	87,3
	941	37,2	3%	612	27,2	3,45	80
			4%	559	27,0	3,11	70,3
	928	36					
	854	34					
Condição PP – Pó de Penas			Condição PPAs – Pó de Penas + As ³⁺				
1%			Controle	12	0,3	0,184	4,2
	141	6,8	1%	208	8,9	3,21	76,3
			2%	141	6,8	3,15	72,9
	172	8,2	3%	298	10,9	3,34	73,6
			4%	397	13,4	3,55	85
	423	20					
	361	17,1					

5.3.5 Imobilização de As^{3+}

O As^{3+} é um metalóide considerado tóxico para diversos organismos, e dependendo de sua concentração no meio, ele pode ser fator determinante para a inibição do metabolismo de micro-organismos (Lizama *et al*, 2011). A concentração analisada nesse estudo de 4mg.L^{-1} parece ser insuficiente para inibir a atividade metabólica das BRS. O cultivo de BRS empregado parece ser tolerante à presença do metalóide nessa concentração, uma vez que não houve prejuízos ao processo de redução do sulfato à sulfeto, processo este dependente da atividade metabólica das BRS. Para tratamentos biológicos que visem à remoção de metalóides como o As^{3+} , é de suma importância que os micro-organismos envolvidos no processo sejam capazes de, não somente tolerar sua presença, mas também, de permanecerem metabolicamente ativos. Sendo assim, é necessária, para qualquer tipo de tratamento onde serão utilizados organismos vivos, uma etapa de adaptação dos mesmos às condições a que serão submetidos posteriormente.

Na condição LAs as maiores remoções de As^{3+} estavam relacionadas às maiores remoções de sulfato e consequentemente às maiores razões DQO/sulfato. Nessa condição é possível perceber que quanto maior a remoção de sulfato, ou seja, produção de sulfeto, maior é a remoção de As^{3+} . Possivelmente nessa condição a remoção de As^{3+} estava associada à formação de sulfetos arsenicais insolúveis, resultantes da interação com o sulfeto biogênico produzido pelas BRS.

Conforme demonstrado na tabela 5.2, nas condições PLAs e PPAs, a remoção de sulfato não foi fortemente influenciada pela concentração de pó de penas, e a remoção de As^{3+} foi bem semelhante em todas as concentrações de pó de penas avaliadas. Por outro lado, quando se comparam as remoções de As obtidas na condição LAs (razão DQO/sulfato 0,67) com aquelas obtidas nas condições PLAs observa-se que a remoção de sulfato aumentou consideravelmente de 38% para aproximadamente 80%. A utilização do pó de penas nos cultivos contendo BRS não representou melhorias em relação à redução do sulfato (tabela 5.2), porém, foi determinante para a imobilização do As^{3+} . A concentração de As removido apresentado pela tabela 5.2 foi calculado à partir da concentração inicial, menos a concentração final, presente no meio líquido de cultivo.

A figura 5.6 mostra a remoção de As^{3+} em relação ao consumo biológico de sulfato. Esse perfil é mostrado apenas para as condições: LAs – razão 3; condição PLAs – 4% e condição PPAs – 4%. Nas condições PPAs e PLAs, a concentração de sulfato quase

não se altera ao longo do tempo de cultivo, enquanto que a concentração de As^{3+} é bastante diminuída, principalmente nas primeiras horas de cultivo. Nessas condições, é possível que outro mecanismo de imobilização do As^{3+} esteja presente, ao invés da precipitação como sulfeto metálico.

Na condição LAs é possível observar que à medida que houve a remoção de sulfato, o As^{3+} também teve sua concentração diminuída, sendo esses dois processos, portanto, relacionados. A menor concentração de As^{3+} presente em solução foi obtida nas últimas horas de ensaio, quando foram obtidas as menores concentrações de sulfato. A remoção de As^{3+} ocorreu de forma gradual na condição LAs, contudo o mesmo comportamento não ocorreu nas outras condições. Esses resultados indicam que, possivelmente, o processo de remoção de As^{3+} tenha ocorrido de forma distinta nas diferentes condições estudadas.

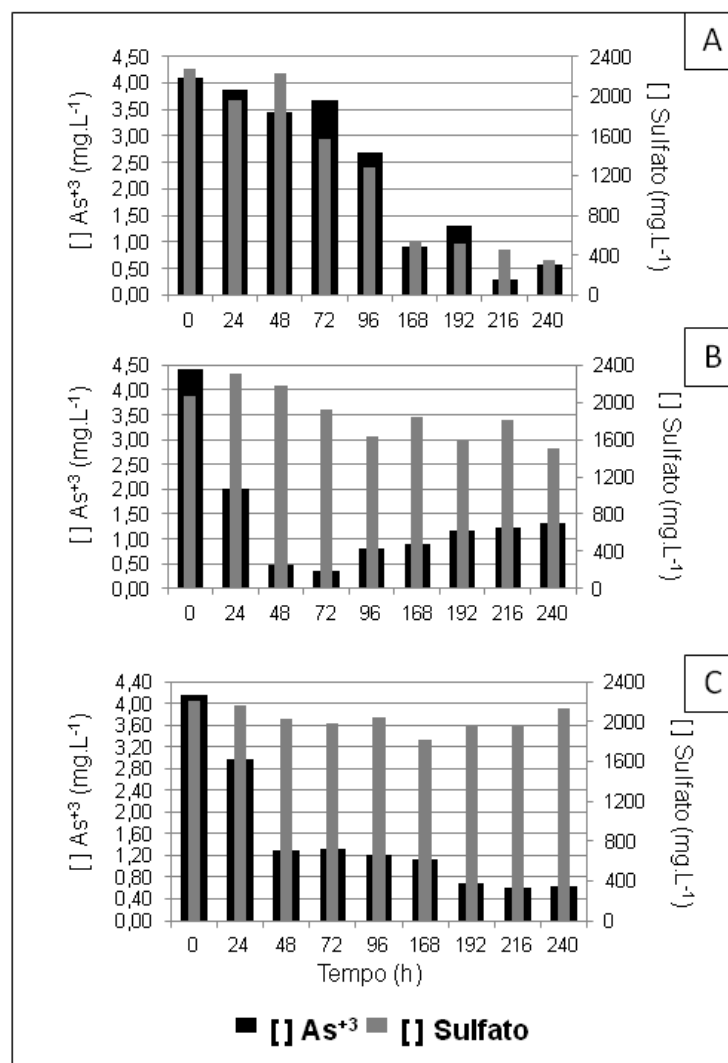


Figura 5.6. Remoção de arsênio em relação ao consumo de sulfato nas diferentes condições de cultivo, A: lactato (razão 3) e As^{3+} ; B: lactato (1,2 g.L⁻¹), pó de penas (4%) e As^{3+} ; C: pó de penas (4%) e As^{3+} .

Nos ensaios que visavam avaliar a remoção do As^{3+} , foram utilizados frascos controles, cultivados em condições semelhantes, porém sem a adição de inóculo (BRS). Os testes controles apresentaram remoção de As^{3+} insignificante em todas as condições (tabela 5.2), se comparada às remoções obtidas quando na presença de BRS, fato este que evidencia a importância dessas bactérias para o processo de imobilização de As^{3+} . Todavia, a figura 5.6 mostra claramente que o processo de imobilização de As^{3+} não está diretamente relacionado com a remoção de sulfato. Assim, possivelmente os processos envolvidos na imobilização do As^{3+} na presença do pó de penas sejam a precipitação – como sulfeto metálico; e a adsorção na superfície do material.

O pó de penas foi testado pela primeira vez por Teixeira e Ciminelli (2005), como um material biossorvente para o As^{3+} . A eficiência e a seletividade do material foram comprovadas, com capacidade máxima de $170 \mu\text{molAs}^{3+}/\text{g}$ biomassa, em pH 5,5.

A baixa remoção de As^{3+} nos testes controle pode estar associada ao potencial redox do meio. Teixeira e Ciminelli (2005) mostraram ser necessário o tratamento prévio do pó de penas com agentes redutores, para que as interações entre os grupos sulfidríla, presentes na superfície do pó de penas, e o As^{3+} ocorressem. Esse tratamento não foi realizado durante os testes desse trabalho, já que o próprio metabolismo das BRS forneceria o agente redutor necessário - o sulfeto. Quando utilizado o inóculo juntamente com o pó de penas, a remoção de As^{3+} é bem superior que quando utilizado o pó de penas sem inóculo (controle). Esse fato permite admitir que a maior parte da imobilização do As^{3+} obtida nas condições PPAs e PLAs é devida ao processo de adsorção ocorrido na superfície do pó de penas e não através de precipitação como sulfeto metálico.

Outro fato que vem corroborar com esta hipótese é o fato de que os processos de adsorção geralmente ocorrem de maneira rápida, sendo a superfície do material adsorvente saturada nas primeiras horas de contato com o adsorvato (Mantell, 1951). Esse perfil foi observado neste trabalho, nas condições PPAs e PLAs (figura 5.6), indicando mais uma vez a ocorrência de tal fenômeno.

A literatura aponta que as melhores remoções de As^{3+} quando associado à presença de enxofre, ocorrem em condições com baixos valores de pH, em torno de 2 e 5,5 (Lizama *et al*, 2011; Battaglia-Brunet *et al*, 2009, Teixeira e Ciminelli, 2005). Porém esses valores de pH não são ideais para o cultivo de BRS, sendo que nessas condições, a grande maioria dos gêneros de BRS tem sua atividade metabólica diminuída (Battaglia-Brunet *et al*, 2009; Gibson, 1990). O presente trabalho utilizou um valor de pH inicial de 7,0; por ser esse um valor adequado para garantir a atividade metabólica das BRS. Assim, as condições

de cultivo utilizadas neste trabalho não foram as ideais, em termos de pH, no que diz respeito ao processo de imobilização de As^{3+} , apesar de ainda ter sido possível obter remoções bem satisfatórias do metalóide. A adaptação das BRS em condições moderadamente acidófilas, em pH em torno de 5,5 por exemplo, poderiam resultar em remoções de As^{3+} mais satisfatórias.

O aumento considerável na remoção de As^{3+} observado nas condições em que há a presença de pó de penas (PPAs e PLAs), se comparado ao obtido na condição que não há a presença desse material (condição L), revela que o material em questão exerce influência na remoção do metalóide. Uma vez que a produção de sulfeto é bastante pequena nas condições PPAs e PLAs, é possível dizer que outro processo de imobilização do As^{3+} esteja ocorrendo simultaneamente com a precipitação, nessas condições. Os testes realizados no presente trabalho indicam que, possivelmente, a imobilização do As^{3+} ocorreu por precipitação química, ao reagir com o sulfeto, e por adsorção na superfície do pó de penas.

5.4 Atividade Metabólica das BRS em condição semi-contínua

5.4.1 Avaliação do potencial de oxi-redução (Eh) e pH do meio

A estabilização do reator foi realizada utilizando o meio de cultura contendo lactato e pó de penas como substrato orgânico, e o inóculo obtido no item 4.2, previamente adaptado a uma concentração de 4mg.L^{-1} de As^{3+} . Durante aproximadamente 32 dias o reator foi alimentado e houve a retirada de amostra a cada 7 dias. Durante as duas primeiras fases de operação do reator (aproximadamente 60 dias), tanto os valores de pH quanto de Eh oscilaram com frequência, durante esse período havia a aclimatização da biomassa, e o sistema ainda não havia alcançado a estabilidade. A figura 5.7 mostra a relação entre o pH e o Eh obtido durante a operação do reator.

Após a segunda fase, depois do 67º dia de operação, os valores de pH e Eh tornaram-se mais constantes. Desde o início dessa fase o Eh permaneceu baixo (em torno de -300 mV) indicativo de ambiente propício ao crescimento das BRS. Um ambiente redutor se deve, provavelmente, à produção de sulfeto gerada pelo metabolismo das BRS (Gibson, 1990; Madigan *et al.*, 2004). Por outro lado o pH continuou oscilante, mesmo na segunda fase de operação, variando entre 7,6 e 8,6, esses valores ligeiramente alcalinos, provavelmente se devem à produção de bicarbonato gerado pela degradação do substrato

orgânico pelas BRS (Kaksonen *et al.*, 2003). Tais valores, contudo, encontram-se dentro do esperado e de acordo com a legislação brasileira para lançamento de efluentes.

Durantes as fases 4 e 5, nas quais havia a presença de 4 e 8mg.L⁻¹ de As³⁺, respectivamente, os valores de Eh e pH não sofreram alterações, permanecendo com o mesmo comportamento obtido nas fases anteriores; indicando que a presença do metalóide, nessas concentrações, não estaria inibindo a atividade metabólicas das BRS presentes no reator semi-contínuo.

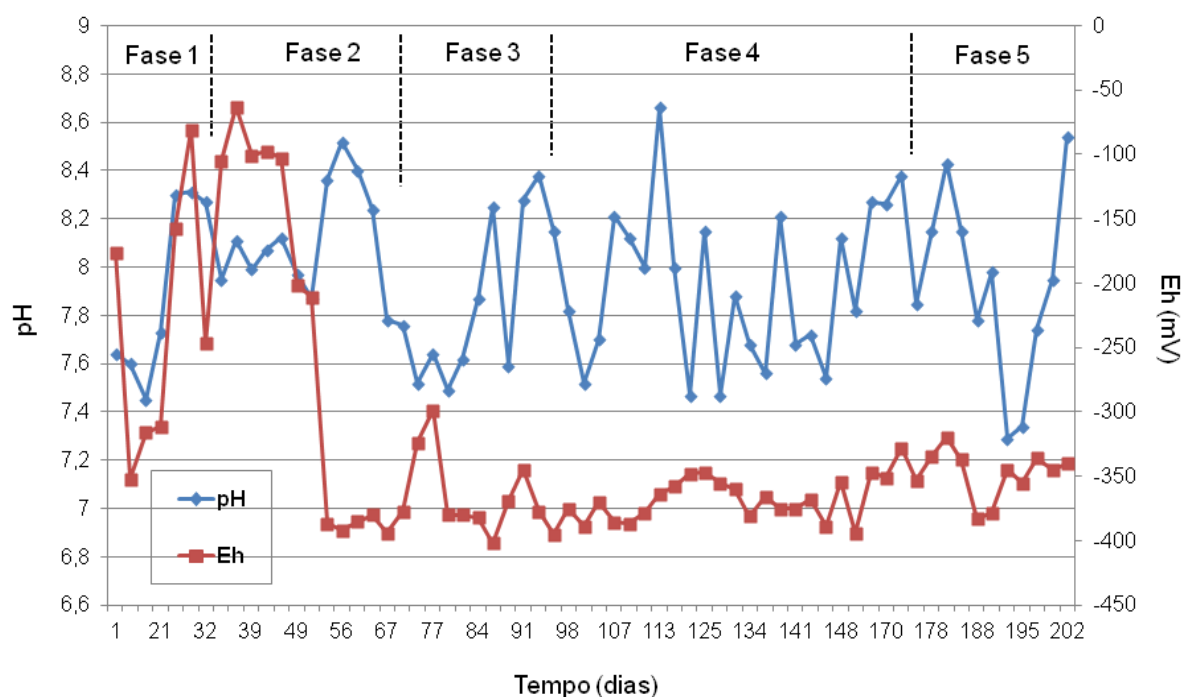


Figura 5.7. Relação entre os valores de pH e Eh ao longo da operação do reator semi-contínuo, nas diferentes condições estudadas.

5.4.2 Consumo de sulfato

Na fase de estabilização o consumo biológico de sulfato foi bem moderado, devido à aclimatização da biomassa no interior do reator e provavelmente devido à baixa disponibilidade de matéria orgânica, uma vez que a concentração de lactato empregada foi de apenas 1,2g.L⁻¹. Na condição em batelada, essa concentração de lactato juntamente com o pó de penas (condição PL) não promoveu remoções de sulfato muito satisfatórias. Assim, na segunda fase de operação do reator, o meio de cultura passou a conter a maior concentração de lactato testada em batelada, 5,6g.L⁻¹, porém, sem introdução de pó de

penas. Considerando-se a lenta dissolução do material sólido, o reator continha ainda o pó de penas remanescente da primeira fase de operação.

A tabela 5.3 mostra as porcentagens de remoção de sulfato nas diferentes fases de operação do reator. Para cálculo da porcentagem foi considerada a concentração de sulfato ao final de cada fase em relação à concentração de sulfato inicial do reator. Assim, na segunda fase de operação a concentração de sulfato teve um decréscimo mais acentuado que na primeira fase, sendo removido em torno de 56,1% ao final dessa fase, no 67º dia de operação. A partir do 70º dia de operação a alimentação ocorreu com meio contendo além do lactato ($5,6\text{g.L}^{-1}$), 2% (p/v) de pó de penas. Ao longo dessa fase a remoção biológica de sulfato foi ainda mais acentuada, em torno de 78,8 %. O aumento do consumo de sulfato alcançado nessa fase evidencia a importância da concentração do substrato orgânico fornecido para o metabolismo das BRS além de mostrar a melhora no processo de remoção de sulfato ao se introduzir o pó de penas.

A reintrodução de pó de penas no reator foi necessária pelo fato de ter ocorrido perda desse material como consequência das retiradas de alíquotas. Como o reator encontrava-se em fluxo ascendente de alimentação, o próprio fluxo carregava o material, que era perdido. Durante a montagem do reator não foi introduzido nenhum dispositivo que pudesse reter o pó de penas em seu interior, e ao longo do seu funcionamento foi percebido a importância deste. Uma alternativa seria a utilização de uma barreira física no interior do reator para a retenção do pó de penas, o que provavelmente aumentaria também a retenção celular, podendo aumentar a eficiência do reator (Silva *et al.*, 2006; Ory *et al.*, 2004).

Tabela 5.3. Eficiência na remoção de sulfato nas diferentes fases de operação do reator semi-contínuo.

Reator semi-contínuo				
Fase	Sulfato inicial (mg.L^{-1})	Sulfato final (mg.L^{-1})	ERS* (mg.L^{-1})	ERS* (%)
1ª	1902	1702	200	10,5
2ª	1902	835	1067	56,1
3ª	1902	403	1499	78,8
4ª	1902	296	1606	84,4
5ª	1902	3409	-	-

*ERS: Eficiência na Remoção de Sulfato.

Os testes realizados em condição semi-contínua permitem uma comparação com os dados obtidos na condição em batelada, realizada anteriormente. No reator não há a presença de *head space*, presente nos frascos em batelada, portanto, o experimento semi-contínua oferece uma condição de anaerobiose mais adequada que aquela obtida em batelada. Esse fato pode ter influenciado positivamente o processo de remoção de sulfato e explica os maiores consumos de sulfato observados durante a operação do reator se comparado aos testes em batelada.

A partir do 95º dia de operação, foi iniciada a introdução de As^{3+} (4mg.L^{-1}) ao meio de cultivo do reator. Nessa fase, o meio de cultura empregado não continha pó de penas, devido à capacidade deste material em adsorver As^{3+} (Teixeira e Ciminelli, 2005). O pó de penas deixou de ser utilizado nessa fase para que não houvesse uma remoção de As^{3+} antes mesmo da entrada do meio no reator, o que afetaria a avaliação de remoção do metalóide ocorrida no interior do reator. Durante os períodos de 113 a 134 dias de operação, a concentração de sulfato no efluente do reator foi ligeiramente mais alta que nos dias anteriores, o que pode ser explicado pela presença do metalóide. Durante esse curto período os micro-organismos ali presentes estavam se adaptando à nova condição com a presença do As^{3+} (figura 5.8). Após esse período a concentração de sulfato voltou a diminuir, sendo bem próxima à encontrada na fase de operação anterior, que não continha As^{3+} . No sistema semi-contínuo a presença de As^{3+} na concentração de 4mg.L^{-1} aparentemente, não alterou o metabolismo do consórcio microbiano presente no reator. O que difere da condição em batelada, visto que nessa condição, a presença de As^{3+} aumentou consideravelmente a eficiência de remoção do sulfato.

Contudo, com a introdução de 8mg.L^{-1} de As^{3+} no reator, fase 5, a concentração de sulfato aumentou abruptamente, indicando que a atividade metabólica das BRS foi comprometida (figura 5.8). Em contrapartida, os valores de Eh e pH obtidos durante essa fase, não sofreram grandes alterações. Ainda assim, parece que essa concentração de As^{3+} pode ser considerada prejudicial ao metabolismo do consórcio microbiano empregado. É necessária uma maior observação sobre a influência do As^{3+} nessa concentração no processo de remoção de sulfato, possivelmente depois de alguns dias de operação, os valores de sulfato voltem a cair, indicando um restabelecimento da atividade microbiana no reator, tal qual ocorreu durante a fase 4, com a concentração de As^{3+} de 4mg.L^{-1} .

Ao longo das fases de introdução de As^{3+} no reator houve a perda de pó de penas ao longo da retirada de amostra, portanto a influência desse material ficou comprometida nessas fases (4ª e 5ª).

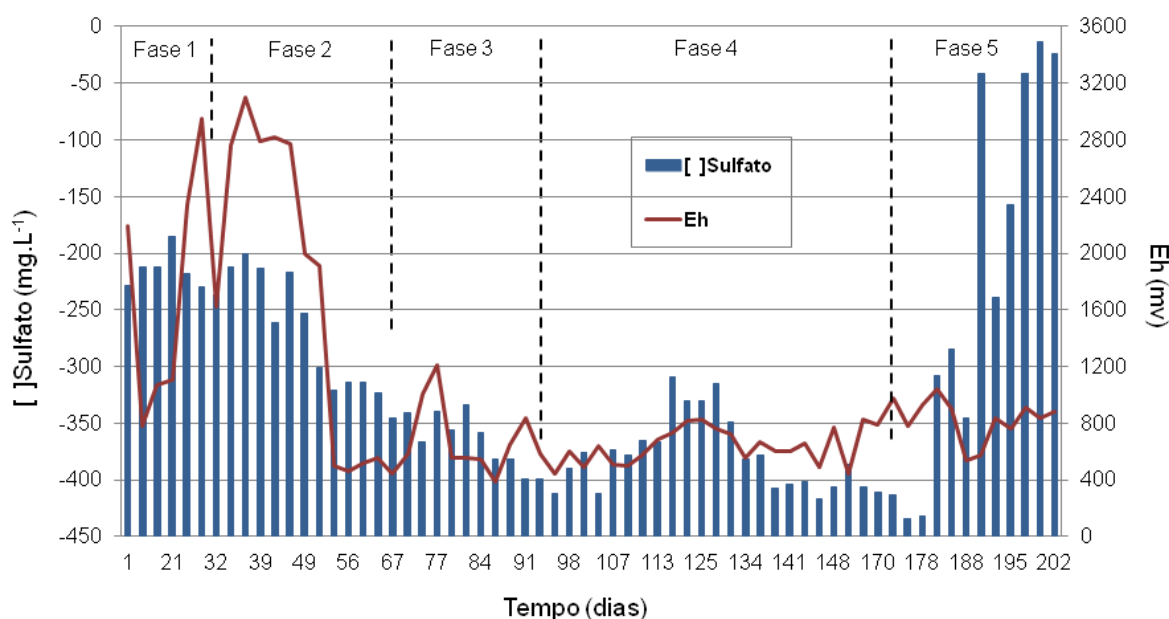


Figura 5.8. Relação entre a concentração de sulfato e os valores de Eh no efluente do reator semi-contínuo nas diferentes condições analisadas.

5.4.3 Imobilização do As³⁺

Do 95º até o 174º dia de operação (fase 4), o reator foi alimentado com o efluente sintético contendo As³⁺, inicialmente a concentração do metalóide era de 4mg.L⁻¹, ocorrendo uma remoção de aproximadamente 98% durante essa fase de operação, com concentração de As residual de 0,073mg.L⁻¹. Do 176º ao 202º a concentração de As introduzida no reator passou a ser de 8mg.L⁻¹, e durante essa fase (5ª fase) a remoção de As também foi da ordem de 98%, sendo o menor valor de As obtido no efluente de 0,062mg.L⁻¹, no ultimo dia de operação da 5ª fase. A figura 5.9 mostra a relação entre a remoção de As³⁺ e a concentração de sulfato no reator durante as fases 4 e 5. Devido ao caráter semi-contínuo do reator, onde não havia mistura completa do meio em seu interior (meio estratificado), a presença do metaloide não é detectada imediatamente à sua adição, mas sim após algumas coletas (figura 5.9). Além disso, não foi possível indicar a concentração de As³⁺ no efluente do reator em todos os dias de coleta, visto que a metodologia utilizada para a análise do As³⁺ (item 4.6) era capaz de detectar somente concentrações maiores que 0,0408mg.L⁻¹ e alguns pontos encontravam-se fora do limite de detecção, provavelmente abaixo do valor mínimo detectável. Sendo assim, pode-se considerar que quase todo o As presente foi removido da fase líquida. Esses pontos não

foram representados na figura 5.9, e a ausência desses dados limita as discussões sobre os mecanismos de remoção de As^{3+} no reator.

Diferentemente da condição batelada, na condição semi-contínua não é possível diferenciar claramente os processos de remoção de As por precipitação química na forma de sulfeto ou adsorção na superfície do pó de penas. Nessa fase a concentração de pó de penas no reator era bem pequena, visto que esse material estava sendo carregado juntamente com o efluente retirado do reator, portanto, é provável que a maior porcentagem da remoção de As^{3+} tenha ocorrido por precipitação química, entre o sulfeto e o As^{3+} .

De todo modo, as condições oferecidas pelo reator semi-contínuo, (pH, Eh, anaerobiose, substratos orgânicos) foram eficazes no processo de imobilização do As^{3+} , sendo este quase que completamente removido do sistema. O reator continua em operação e maiores concentrações de As^{3+} serão gradativamente adicionadas ao sistema, o que pode revelar mais detalhes sobre o processo de imobilização do metalóide ocorrido nesse sistema específico.

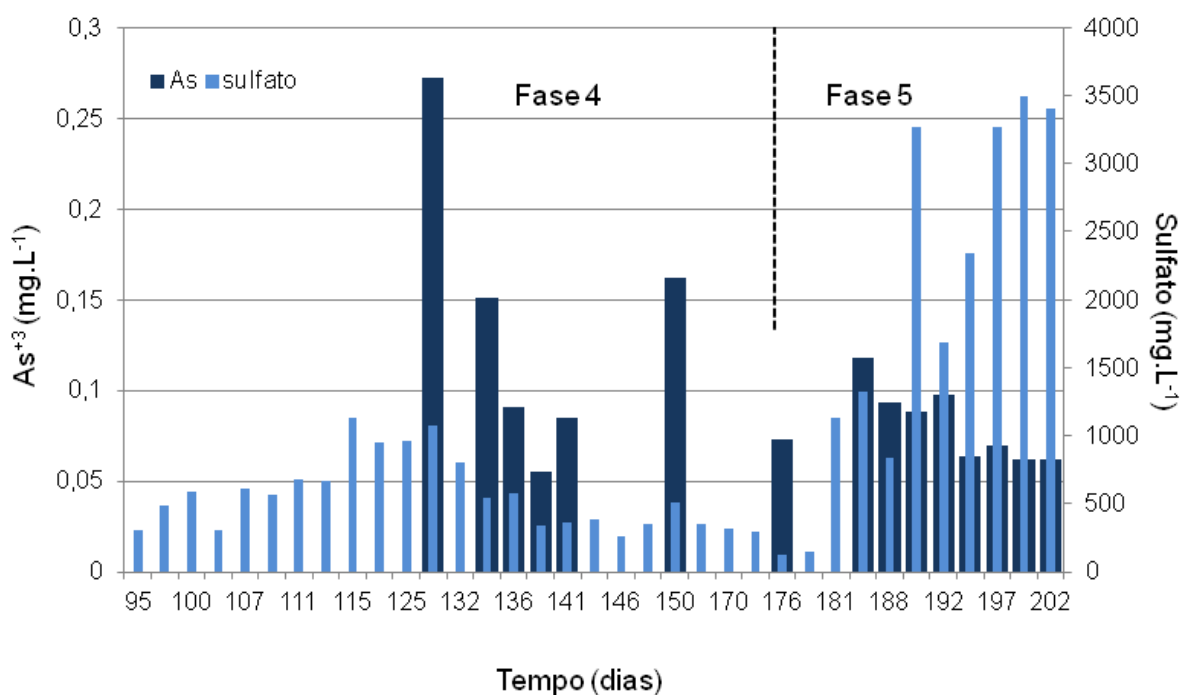


Figura 5.9. Relação entre a remoção de As^{3+} e concentração de sulfato durante as fases 4 e 5 de operação do reator semi-contínuo.

6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho, que relacionam o metabolismo microbiano das BRS ao uso de diferentes substratos orgânicos em diferentes concentrações, indicam que o pó de penas é um material de interesse biotecnológico e econômico para o cultivo de BRS, oferecendo nutrientes importantes ao metabolismo dos mesmos. A adição de pó de penas ao meio de cultivo contendo pequenas concentrações de lactato de sódio aumentou significativamente a redução de sulfato pelas BRS. Ao se utilizar, contudo, exclusivamente o pó de penas como substrato orgânico, os mesmos resultados não foram observados. Assim, o pó de penas pode ser utilizado no cultivo de BRS, porém, sua utilização concomitante a de outro substrato orgânico, como o lactato, seria mais interessante do ponto de vista da eficiência do processo.

Ao utilizar-se exclusivamente o lactato de sódio como fonte de matéria orgânica, observou-se que a remoção de As^{3+} foi diretamente proporcional à remoção de sulfato (produção de sulfeto), indicando que o metalóide foi removido por precipitação, como sulfeto metálico. Todavia, na presença do pó de penas, a remoção de As^{3+} independe da redução de sulfato e ocorreu, em maior parte, devido à adsorção do mesmo na superfície do material. A adição do pó de penas aumentou significativamente as porcentagens de remoção de As^{3+} , sendo que pequenas variações na sua concentração não foram suficientes para interferir nas remoções de As^{3+} . O pó de penas representa, portanto, um interessante material no processo de imobilização biológica do As^{3+} em pH neutro, ou próximo da neutralidade, em condições redutoras.

Os parâmetros analisados em sistema batelada ao serem comparados com o sistema semi-contínuo mostraram que comportamentos semelhantes ocorreram em ambas condições, indicando a possibilidade de extrapolar os dados aqui trabalhados para uma condição mais prática, como a construção de reatores em maior escala que possam tratar volumes maiores de efluente com maiores teores de arsênio. Dados como esses são de extrema importância para difundir os conhecimentos gerados dentro da academia deixando-os ao alcance de toda a sociedade, principalmente do setor minero-metalúrgico, grande interessado nos tratamentos de efluentes ricos em sulfato e metais.

7. Sugestões para trabalhos futuros

O presente trabalho foi importante para o início de uma discussão científica para o uso de um resíduo industrial ainda pouco explorado, o pó comercial de penas de galinha. Como visto anteriormente, esse material representa um potencial biotecnológico e econômico na utilização de tratamento de efluentes contendo sulfato e arsênio. Assim, algumas propostas de trabalho são sugeridas como:

- Avaliar mais detalhadamente os componentes do pó de penas, tanto da fração sólida quanto solúvel.
- Investigar mais detalhadamente a capacidade de adsorção do As^{3+} pelo pó de penas na presença de BRS, através de isothermas de adsorção. Além de testar a possibilidade de adsorver outros metais ou poluentes.
- Investigar a imobilização de As^{3+} em maiores concentrações.
- Adaptar consórcios microbianos contendo BRS em condições moderadamente acidófilas, e avaliar a remoção de As^{3+} por esses micro-organismos.
- Associar o pó de penas a outros substratos orgânicos e avaliar a remoção de sulfato por BRS.
- Utilizar reator de fluxo contínuo inoculado com BRS e acrescido de pó de penas para a remoção de sulfato e As^{3+} em maior escala. Além disso, otimizar as condições de operação do reator avaliando diferentes métodos para retenção da biomassa e do pó de penas.
- Identificar os micro-organismos presentes no consórcio microbiano.

8. Produção científica

MATOS, L.P, MIRANDA, R.R, GUEDES, K.A., COSTA, P.F, TEIXEIRA, M.C.

Avaliação da redução de sulfato por Bactérias Redutoras de Sulfato em meio com suportes sólidos. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2011.

COSTA, P. F., MATOS, L. P., MIRANDA, R. R., GUEDES, K. A., TEIXEIRA, M. C.

Avaliação do efeito da presença de suportes sólidos no crescimento de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em meio contendo arsênio. I Workshop on bioprocess for the mining industry and environment – BioMenvi. Brasil, Araraquara, 2011.

9. Referências Bibliográficas

ACHOUR, A.R., BAUDA, P., BILLARD, P. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol*, v. 158, p. 128–137, 2007.

APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater, 20.^a ed., Washington, D.C. (USA), American Public Health Association, p. 1325, 1998.

AZIZ, J. A., TEBBUTT, T. H. Y. Significance of COD, BOD and TOC correlations in kinetic models of biological oxidation. *Water Research*, v. 14, p. 319-324, 1980.

BADRUZZAMAN, M., WESTERHOFF, P., KNAPPE, D. R. U. Intraparticle diffusion and adsorption of arsenate onto granular ferric hydroxide (GFH). *Water Research*, v. 38, n. 18, p. 4002-4012, 2004.

BARBOSA, L. P., Cultivo de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e sua aplicação na bioremediação de efluentes ácidos contendo metais. 130 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), UFOP, Ouro Preto, 2009.

BARBOSA, L. P., BERTOLINO, S.M., FREITAS, P.C., OLIVEIRA, V.A., PINA, P.D., LEÃO, V.A., TEIXEIRA, M.C. Effects of different COD/sulfate ratios on the growth of metal tolerant sulfate reducing bacteria (SRB). *Advanced Material Research*, v. 71-73, p. 569-572, 2009.

BARTON, L., HAMILTON, W. A. *Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems*. Cambridge University Press, 2007.

BARTON, L. L. *Sulfate-reducing bacteria*. New York, 1995.

BATTAGLIA-BRUNET, F., MORIN, D., COULON, S., BURNOL, A., SCHEINOST, A. C., JOULIAN, C. Bioprecipitation of arsenic sulphide at low pH. *International Mine Water Conference*, Pretoria, South Africa, 2009.

BIOTEC. Disponível em: < <http://www.bioteq.ca/water-treatment/>> Acesso em Abril 2011.

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

BORBA, R. P. *O arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera*. Dissertação (Instituto de Geociências), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BRASIL. DECRETO Nº 24.643, de 10 de julho de 1934. Decreta o Código de Águas. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d24643.htm> acesso em Agosto de 2011.

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, 14 dez., 2011.

CABRERA, G., PEREZ, R., GÓMEZ, J.M., ÁBALOS, A., CANTERO, D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains. *Journal of Hazardous Materials*, v. 135, p. 40-46, 2006.

CAO, J., ZHANG, G., MAO, Z., FANG, Z., YANG, C. Precipitation of valuable metal from bioleaching solution by biogenic sulfides. *Journal of Minerals Engineering*, v. 135, p. 40-46, 2008.

CHEUNG, K. H., GU, J. D. Reduction of chromate (CrO₄²⁻) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*, v. 52, p. 1523-1529, 2003.

CHOI, E.; RIM, J. M. Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in Anaerobic treatment. *Water Science and Technology*, v. 23, n. 7-9, p. 1259-1264, 1991.

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. 8061-8067, 2008.

CYPIONKA, H. Uptake of sulfate, sulfite and thiosulfate by proton-anion symport in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Archives of Microbiology*, v. 148, p. 144-149, 1987.

CYPIONKA, H. Characterization of sulfate transport in *Desulfoibrio desulfuricans*. *Archives of Microbiology*, v. 152, p. 237-243, 1989.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº430, de 13 de maio de 2011. *Ministério do Meio Ambiente*, 8p.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Ministério do Meio Ambiente*, 23p.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL; CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DE MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º1, de 05 de mai. de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Belo Horizonte: COPAM, 2008.

COSTA, M. C., DUARTE, J. C. Bioremediation of Acid Mine Drainage using acidic soil and organic wastes for promoting Sulphate-Reducing Bacteria activity on a column reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 165, p. 325-345, 2005.

DILLING, W.; CYPIONKA, H. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Letters*, v. 71, n. 1-2, p. 123-127, 1990.

DIORIO, C., CAI, J., MARMOR, J., SHINDER, R., DUBOW, M.S. An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol*, v. 177, p. 2050–2056, 1995.

DOMINGUES, M. R., MORAES, E. M., VAZOLLER, R. F., VARESCHE, M. B. Analysis of microbial community in biofilms and planktonic cells of anaerobic thermophilic reactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, p. 1-9, 2006.

EL BAYOUMY, M. A., BEWTRA, J. K., ALI, H. I., BISWAS, N. Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. *Water Air and Soil Pollution*, v. 112, n. 1-2, p. 67-84, 1999.

ELSGAARD, L., D. PRIEUR, MUKWAYA, M. G., JORGENSEN, B. B. Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of lake Tanganyika, East-Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 1473-1480, 1994.

FONSECA, E., M. *Estudo da interação entre atividade bacteriana, metais pesados e matéria orgânica nos sedimentos da Baía de Guanabara – RJ*. Dissertação (Mestrado em Geologia e Geofísica Marinha), Universidade Federal Fluminense. Niterói, p. 115, 2004.

FRY, N. K., J. K. FREDRICKSON, FISHBAIN, S., WAGNER, M., STAHL, D. A. Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1498-1504, 1997.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, v. 122, p. 109– 119, 2004.

GIBSON, G. R. Physiology and ecology of the sulfate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, n. 6, p. 769-797, 1990.

GREENLEAF, J. E., LIN, J. C., SENGUPTA, A. K. Two novel applications of ion exchange fibers: Arsenic removal and chemical-free softening of hard water. *Environmental Progress*, v. 25, n. 4, p. 300-311, 2006.

GROUDEV, S., GEORGIEV, P., SPASOVA, I., NICOLOVA, M. Bioremediation of acid mine drainage in a uranium deposit. *Hydrometallurgy*, v. 94, p.93-99, 2008.

HAMAMURA, N., MACUR, R.E., KORF, S., ACKERMAN, G., TAYLOR, W.P., KOZUBAL, M., REYSENBACH, A.L., INSKEEP, W.P. Linking microbial oxidation of

arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environ. Microbiol.*, v. 11, p. 421–431, 2009.

HARRIS, G.B., KRAUSE, E. The disposal of arsenic from metallurgical processes: its status regarding ferric arsenate. Int. Symposium on 'Extractive Metallurgy of Nickel, Cobalt and Associated Metals', TMS Annual Meeting, Colorado, p. 1-18, 1993.

HENKEN, K.R., HUTCHISON, A. Arsenic chemistry. Henken, K.R. (Ed.), Arsenic Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 9–68, 2009.

JEANTHON, C., S. L'HARIDON, CUEFF, V., BANTA, A., REYSENBACH, A. L., PRIEUR, D. *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 765-772, 2002.

JOHNSON, D. B., DZIURLA, M. A., KOLMERT, A., HALLBERG, K. B. The microbiology of acid mine drainage: genesis and biotreatment. *South African Journal of Science*, v. 98, p. 249-255, 2002.

JOHNSON, D. B. Acidophilic Microbial Communities - Candidates for Bioremediation of Acidic Mine Effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 35, p. 41-58, 1995.

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.

KJELDSEN, K. U., KJELLERUP, B. V. Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district heating system. *Fems Microbiology Ecology*, v. 61, p. 384-397, 2007.

KLEMPES, R., CYPIONKA, H., WIDDEL, F., PFENNIG, N. Growth with hydrogen, and further physiological-characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Archives of Microbiology*, v. 143, p. 203-208, 1985.

KNOBLAUCH, C., SAHM, K., JORGENSEN, B. B. Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp nov., *Desulfofrigus fragile* sp nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp nov and *Desulfotalea arctica* sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 1631-1643, 1999.

- KOLMERT, A., WIKSTROM, 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. 179-184, 2000.
- KOSOLAPOV, D.B., KUSCHK, P., VAINSHTAIN, M.B., VATSOURINA, A.V., WIEBNER, A., KASTNER, M., MULLER, R.A. Microbial processes of heavy metal removal from carbon deficient effluents in constructed wetlands. *Eng. Life Sci*, v. 4, p. 403–411, 2004.
- KULP, T.R., HAN, S., SALTIKOV, C.W., LANOIL, B.D., ZARGAR, K., OREMLAND, R.S. Effects of imposed salinity gradients on dissimilatory arsenate reduction, sulfate reduction, and other microbial processes in sediments from two California soda lakes. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 73, p. 5130–5137, 2007.
- KUSEL, K. A., ROTH, U., TRINKWALTER, T., PEIFFER, S. Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. *Environmental and Experimental Botany*, v. 46, p. 213-223, 2001.
- 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, p. 4683-4699, 2011
- LEE, J.P., PECK, H.D. Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from *Desulfovibrio gigas* and its identification as desulfovibridin. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, v. 45, p. 583-589, 1971.
- LENS, P. N. L., VALLERO, M., ESPOSITO, R. *Sulphate- Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems* (eds Barton L. L. & Hamilton, W. A.). Cambridge Univ. Press, p.283–404, 2007.
- 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.
- LIEVREMONT, D., BERTIN, P. N., LETT, M. C. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Bioquimie*, p. 1229-1237, 2009.
- LIZAMA, K. A., FLETCHER, T. D., SUN, G. Removal processes for arsenic in constructed wetlands. *Chemosphere*, v. 84, p. 1032-1043, 2011.
- MACUR, R.E., JACKSON, C.R., BOTERO, L.M., McDERMOTT, T.R., INSKEEP, W.P. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environ. Sci. Technol*, v. 38, p. 104–111, 2004.

MADIGAN, M. T., MARTINKO J. M., PARKER, J. Microbiologia de Brock. São Paulo, Prentice Hall, 2004.

MANTELL, C. L. *Adsorption*. McGraw-Hill, Universidade de Michigan, p. 634, 1951.

MARTIN, D., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKEBRANDT, E. The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria. *Springer*. ed. 3, v. 2, p. 1156, 2006.

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, p.559–567, 2009.

McINERNEY, M.J., STRUCHTEMEYER, C.G., McINERNEY, M. J., STRUCHTEMEYER, C. G., SIEBER, J., MOUTTAKI, H., STAMS, A. J. M., SCHINK, B., ROHLIN, L., GUNSALUS, R. P. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1125, p. 58-72, 2008.

MICHALKE, K., WICKENHEISER, E.B., MEHRING, M., HIRNER, A.V., HENSEL, R. Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl. Environ. Microb.*, v. 66, p. 2791–2796, 2000.

MOGENSEN, G. L., KJELDSSEN, K. U., INGVORSEN, K. *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphatereducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe*, v. 11, p. 339-349, 2005.

MUKHERJEE, A., FRYAR, A.E., O'SHEA, B.M. Major occurrences of elevated arsenic in groundwater and other natural waters. Henken, K.R. (Ed.), *Arsenic Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 303–350, 2009.

MUKHOPADHYAY, R., ROSEN, B.P., PHUNG, L.T., SILVER, S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 26, p. 311–325, 2002.

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

NEALSON, K. H., STAHL, D. A. Microorganisms and biogeochemical cycles: What can we learn from layered microbial communities? Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals. *Mineralogical Soc. America*. v. 35, p. 5-34, 1997.

NECULITA, C.M., ZAGURY, G.J., BUSSIÈRE, B. Passive treatment of acid mine, drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* 36, 1–16, 2007.

NING, R. Y. Arsenic removal by reverse osmosis. *Desalination*, v. 143, p. 237-241, 2002.

OREMLAND, P.; POLCIN, S. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Applied and environmental microbiology*, v. 44, p.1270-1276, 1982.

ORY, I., ROMERO, L. E., CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 547-555, 2004.

OWOLABI, J.B., ROSEN, B.P. Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 2367–2371, 1990.

PIKUTA, E. V., LYSENKO, A. M., ZHILINA T. N. Distribution of *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* in soda lakes of Tuva. *Microbiology*, v.66, p. 216-221, 1997.

POSTGATE, J. R., KENT, H. M., ROBSON, R. L., CHESHYRE, J. A. The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of General Microbiology*, v. 130, p. 1597-1601, 1984.

POSTGATE, J. R., GAL, J. L. The physiology of sulphate-reducing bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, v. 10, p. 81-133, 1973.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F., Produção de sulfeto em reator tipo UASB e seu potencial de aplicação na remoção de metais pesados de efluentes. Rio de Janeiro, *Centro de Tecnologia Mineral - CTEM*, v.108, 2004.

SANI, R.K., PEYTON, B.M., BROWN, L. T. Copper-induced inhibition of growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Applied Environmental Microbiology*, v. 67, p. 4765–4772, 2001.

SARTI, E. L. *Influência do Oxigênio no crescimento de Arquéias Metanogênicas e Bactérias Redutoras de Sulfato em Reatores Anaeróbios em batelada*. (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SASS, H., BERCHTOLD, M., BRANKE, J., KONIG, H., CYPIONKA, H., BABENZIEN, H. D. Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 21, p. 212-219, 1998.

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, p. 91-98, 2003.

SILVA DE ARAÚJO, M. M. – *Estudo de Vias Biotecnológicas Aplicadas à Tecnologia de Petróleo*. Monografia, UFRN, Departamento de Engenharia Química, Programa de Recursos Humanos, Natal-RN, 2002.

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.

STOLLENWERK, K.G. Geochemical processes controlling transport of arsenic in groundwater: a review of adsorption. *Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence*, v. 67, 100, 2003.

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, 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, p. 4885-4893, 2008.

TECLU, D., TIVCHEVA, G., LAINGB, 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, p. 1157–1165, 2009.

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, p. 895-900, 2005

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

UPADHYAYA, G., JACKSON, J., CLANCY, T. M., HYUN, S. P., BROWN, J., HAYES, K. F., RASKIN, L. Simultaneous removal of nitrate and arsenic from drinking water sources utilizing a fixed-bed bioreactor system. *Water Research*, v. 44, n. 17, p. 4958-4969, 2010.

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.

VANDIEKEN, V., MUSSMANN, M., NIEMANN, H., JORGENSEN, B. B. *Desulfuromonas svalbardensis* sp nov and *Desulfuromusa ferrireducens* sp nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1133-1139, 2006.

VELASCO, A., RAMIREZ, M., VOLKE-SEPULVEDA, T., GONZALEZ-SANCHEZ, 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.

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.

VON SPERLING, M. Análise dos padrões brasileiros de qualidade de corpos d'água e de lançamento de efluentes líquidos. *Revista brasileira de recursos hídricos*. v. 3, p. 111-132, 1998.

WARREN, L. A., HAACK, E. A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments, *Earth-Science Reviews*, v. 54, p. 261-320, 2001.

WIDDEL, F., PFENNIG, N. A new anaerobic sporing acetate-oxidizing sulfate reducing bacterium, *Desulfotomaculum acetoxidans* (emend.). *Archives of Microbiology*, v. 112, p. 119-122, 1977.

WHO. ARSENIC IN DRINKING WATER. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic/en/> Acesso Dez 2009.

ZARGAR, K., HOEFT, S., OREMLAND, R., SALTIKOV, C.W. Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arxA*, in the haloalkaliphilic, arseniteoxidizing bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* strain MLHE-1. *J. Bacteriol.*, v. 192, p. 3755–3762, 2010.