

UFOP

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL -
PRÓ-ÁGUA**

“Redução do teor de sulfato e de metais em águas pela utilização de bactérias
redutoras de sulfato”

Autora: Silvia Nicolato Medírcio

Orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão

Co-orientador: Adão de Siqueira Ferreira

Dissertação apresentada ao
Pró-água, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia
Ambiental, como parte
integrante dos requisitos para
obtenção do título de mestre
em Engenharia Ambiental.

Ouro Preto, Dezembro de 2004

AGRADECIMENTOS

À professora de microbiologia do programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Doutora Maria Célia da Silva Lanna, por disponibilizar o laboratório de microbiologia da UFOP para realização dos ensaios desta tese;

Aos espíritos de luz que me protegem, guiam e inspiram;

Ao companheiro e aliado Pablo dos Santos Pina;

Ao orientador e amigo, prof. Dr Versiane Albis Leão;

Ao amigo e colaborador Adelson Dias Souza;

Aos amigos do NVMM;

À equipe de professores, técnicos, estagiários e alunos dos laboratórios de Microbiologia, Química, Biofísica e Bioquímica do ICEB;

À equipe de professores, técnicos, estagiários e alunos do laboratório de Biogeoquímica do DEGEO;

Ao corpo docente e discente do programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental;

À coordenação do programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental;

Aos professores Mônica Cristina Teixeira e Jorge Adílio Penna;

Muito obrigada.

RESUMO

Este projeto objetivou estudar a remoção de sulfato de soluções aquosas utilizando bactérias redutoras de sulfato (BRS). Na primeira etapa desta pesquisa, utilizou-se um reator anaeróbio de batelada preenchido com água residuária sintética contendo 4g/L de sulfato, em pH 7,5. Nesta etapa, foram estipulados os parâmetros mais relevantes para a identificação da atividade das BRS. Os estudos permitiram a confirmação da presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS); sendo os parâmetros usados para este fim: a dosagem de sulfato, o teste qualitativo de H₂S e as medidas de Eh e de pH. Numa segunda etapa, foram feitos o isolamento e a caracterização das BRS, paralelamente às pesquisas de meios de cultivo e aos ensaios de crescimento em pH ácido. Nesta etapa, foram encontrados dois tipos morfológicos de bactérias na amostra: cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-negativos; sendo as Gram-positivas mais resistentes à diminuição do pH e também menos exigentes quanto ao meio nutricional. Nos ensaios de caracterização, verificou-se que as BRS apresentaram tolerância ao oxigênio devido à presença da enzima catalase. Para permitir a realização de ensaios em ambiente não estéril, foi desenvolvido um meio sintético contendo nutrientes semelhantes aos encontrados no ambiente natural das BRS. Este meio foi denominado meio mínimo sendo composto, basicamente, por sais inorgânicos e acetato. Os ensaios de pH em meio tioglicolato 7,5% (v/v) e em meio mínimo foram realizados com o intuito de descobrir quais condições favoreceriam o crescimento das BRS e a redução de sulfato. Verificou-se que existe um pH ótimo, para cada meio de cultivo, no qual o uso de SO₄⁻² como aceptor de elétrons é favorecido. Observou-se que, nestes reatores anaeróbios de batelada, o consumo de sulfato é limitado, mesmo em condições iniciais ótimas. A biorredução de sulfato a ácido sulfídrico propiciou a precipitação do manganês e do cádmio. Verificou-se que a precipitação destes metais ocorria somente em reatores que continham leito de areia; devido à necessidade de formação de biofilme. A alcalinização do pH ocorreu simultaneamente à precipitação dos metais; enquanto o Eh do meio chegou a atingir -290mV (Ag/AgCl). Diagramas de EhxpH construídos para o sistema sugeriram que a precipitação do cádmio ocorreu pela formação de sulfeto enquanto a do manganês ocorreu pela formação de carbonato.

ABSTRACT

This work aimed at the studying of sulfate removal with sulfate reducing bacteria (SRB). Initially, a laboratory anaerobic reactor was filled with a synthetic wastewater made up of 4g/L sulfate. The pH was adjusted to 7.5. The results proved that sulfate-reduction bacteria are effective in raising pH and removing sulfate from this synthetic wastewater. The SRB activity was assessed by chemical and microbiological data: sulfate concentration in solution, redox potential and pH. The presence of hydrogen sulfide was detected in the aqueous phase by a qualitative test with lead salts. Different types of growth medium and pH were studied. A “minimum” medium was proposed to simulate the features of the SRB environment in nature. It was composed of inorganic salts and acetate as the sole source of organic carbon. Microbiological classification of SRB included isolation and characterization. During the isolation step, two morphotypes were observed: coccoid Gram-positive and rod Gram-negative SRB. Coccoids bacteria were the only morphotype able to growth in the minimum medium. These bacteria appeared to be more resistance to low pH and low nutrient concentrations than the rod form ones. The oxygen tolerance, observed during the experiments, was credited to the presence of the catalase enzyme. The growth of SRB under acidic conditions was carried out with two different media: tioglicolate 7,5% (v/v) and the minimum medium. The purpose of these experiments were to analyze: pH range in which the bacteria remain active, growth potential and efficiency of reducing up to 4g/L of sulfate. It was showed that the reduction of sulfate was limited in batch reactors. During the experiments with minimum medium containing either manganese or cadmium, results showed that a chemical precipitation processes occurred and that these processes accounted for the precipitation of the dissolved metals. Besides reduction and removal of sulfates, water alkalizing and the decrease of the redox potential were also ascribed to the SRB activity. However, the presence of a sand layer into the bioreactor was important for the biological process in laboratory scale. According to EhXpH diagram, constructed under the conditions of the study, it was suggested that the precipitation of cadmium and manganese occurred by reaction with sulfide and carbonate ions, respectively.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
II. RELEVÂNCIA DA PESQUISA	5
III. OBJETIVOS	
Geral	7
Específicos	7
IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
V. MATERIAIS E MÉTODOS	
1 - Amostra	29
2 - Estudos de Base:	
2.1 - Reator	29
2.2 – Solução Nutriente	32
2.3 - Meios de cultura	32
2.4 - Teste qualitativo de H ₂ S	34
2.5 - Contagem de bactérias	34
2.6 - Isolamento das BRS	34
2.7 - Ensaio de pH	35
2.8 - Dosagem de sulfato	35
2.9 - Análise quantitativa de H ₂ S	36
2.10 – Determinação de Eh e pH	36
2.11 - Teste da catalase	36
2.12 - Série bioquímica	37
3 - Aplicação dos Estudos de Base:	
3.1 - Preparação do meio mínimo com metal	37
3.2 - Ensaio no reator anaeróbio de batelada	38
3.3 - Ensaio em frascos âmbar, sem adição de areia	38
3.4 - Ensaio em frasco âmbar, com areia	39
3.5 - Ensaio em frascos âmbar de 100mL, com areia	39
3.6 - Diagramas EhxpH	39

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1. Primeira etapa dos ensaios no reator de bancada.	41
2. Isolamento e caracterização das BRS.	42
3. Meio mínimo e caracterização das BRS.	50
4. Reator anaeróbio de batelada.	55
5. Meios contendo manganês e cádmio em frascos de 100 mL.	60
VII. CONCLUSÃO	73
VIII. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	75
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte transversal do reator anaeróbio de batelada.	30
Figura 2 - Reator anaeróbio de batelada.	31
Figura 3 - Visão superior do reator anaeróbio de batelada.	31
Figura 4 - Crescimento das BRS em meio sólido formando filamentos; coletadas do biorreator anaeróbio de batelada.	42
Figura 5 - Isolados B.R., forma de cocos e coloração de Gram positiva.	44
Figura 6 - Isolados T.I., forma de bastonetes e coloração de Gram negativa.	45
Figura 7 - Crescimento da cultura mista (DO de 48 horas) e consumo médio de sulfato em função do pH, em meio tioglicolato 7,5% (v/v).	48
Figura 8 - Crescimento dos isolados T.I. (DO de 48 horas) e consumo médio de sulfato em função do pH, em meio tioglicolato 7,5% (v/v).	48
Figura 9 - Crescimento dos isolados B.R. (DO de 48 horas) e consumo médio de sulfato em função do pH, em meio tioglicolato 7,5% (v/v).	49
Figura 10 - Crescimento dos isolados B.R. em meio mínimo contendo solução de sulfato de sódio 5,74g/L, acetato de sódio 5,50g/L, nitrato de sódio 1g/L e fosfato de potássio dibásico 1g/L.	53
Figura 11 - Curva de crescimento do isolado B.R. (BRS Gram positiva) em meio mínimo (pH = 8,1).	54
Figura 12 - Concentração do manganês dissolvido na parte superior do reator (PSR) e na parte inferior (PIR) do mesmo. Água de um efluente industrial contendo, em média, 37,5mg/L de Mn.	56
Figura 13 - Concentração do manganês <i>versus</i> pH.	58
Figura 14 - Concentração do sulfato dissolvido. Água do efluente industrial contendo 7,7g/L de sulfato em pH 8,0.	60

Figura 15 - Avaliação do crescimento das BRS, em presença de manganês, feita por turbidimetria (DO) e por contagem direta em câmara de Neubauer.	64
Figura 16 - Avaliação do crescimento das BRS, em presença de cádmio, feita por turbidimetria (DO) e por contagem direta em câmara de Neubauer.	64
Figura 17 - Relação existente entre crescimento bacteriano e a precipitação do manganês.	65
Figura 18 - Relação existente entre crescimento bacteriano e a precipitação do cádmio.	66
Figura 19 - Crescimento bacteriano em presença de manganês e alcalinização do meio mínimo.	67
Figura 20 - Crescimento bacteriano em presença de cádmio e alcalinização do meio mínimo.	67
Figura 21 - Crescimento bacteriano, em presença de manganês, <i>versus</i> o consumo de sulfato.	69
Figura 22 - Crescimento bacteriano, em presença de cádmio, <i>versus</i> o consumo de sulfato.	69
Figura 23 - Diagrama de EhXpH para o manganês, a 25°C.	71
Figura 24 - Diagrama de EhXpH para o cádmio, a 25°C.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises químicas do início e do final da drenagem (Garcia, 2001).	13
Tabela 2: Composição química das camadas de água da barragem (Garcia, 2001).	13
Tabela 3 – Principais dados do reator tipo ABR (Vossoughi, 2003).	23
Tabela 4- Distribuição granulométrica da amostra de areia – Série Tyler.	30
Tabela 5 - Características importantes para classificação das bactérias redutoras de sulfato (Castro, 2000).	43
Tabela 6 – Resultados da caracterização dos isolados T.I. (Gram-negativas) e B.R. (Gram-positivas).	46
Tabela 7 – Crescimento das BRS e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.	47
Tabela 8 – Crescimento do isolado T.I. e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.	47
Tabela 9 – Crescimento dos isolados B.R. e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.	47
Tabela 10 – Crescimento dos isolados B.R. (BRS Gram positivas) e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.	53
Tabela 11 – Turbidez causada pelo crescimento das BRS em presença dos metais Cu, Mn e Zn.	62
Tabela 12 – Densidade óptica 600nm (DO_{600nm}) das BRS em presença dos metais Cd, Mn e Zn.	62
Tabela 13 – DO_{600nm} X Concentração de manganês, em função do tempo.	63

I. INTRODUÇÃO:

No Brasil, as atividades industriais, principalmente as relacionadas à exploração de minério para obtenção de metais, exercem grande importância econômica e social, com a geração de divisas externas e absorção de mão-de-obra. Entre os minérios de interesse, destacam-se os que apresentam em sua constituição os íons de ferro, cobre, alumínio e zinco. No entanto, a metalurgia extrativa, assim como, as atividades de lavra e de beneficiamento de minérios apresentam grande potencial de poluição do ar, do solo e dos aquíferos. Podem ser citadas como causas da poluição: a extração de metais, a formação de pilhas dos rejeitos industriais, etc.

Nos processos de remoção de metais contidos em efluentes, rejeitos e resíduos são adotadas diversas técnicas que envolvem a dissolução, a precipitação, a eletrólise, a extração por solventes orgânicos, o uso de resinas de troca iônica e de agentes quelantes. A maioria destas técnicas, isoladas ou em conjunto, têm sido usadas, preferencialmente, em condições de grande escala, quando as concentrações de metais nos efluentes são altas. Porém, quando as concentrações de metais são baixas, a utilização de microrganismos torna-se uma alternativa interessante, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (Fortin *et al.*, 2000; Gadd, 2002; Ghigliazza *et al.*, 2000). Diferentes microrganismos têm sido propostos para remoção de metais, principalmente, bactérias e fungos.

Particularmente, a mineração e metalurgia de minério sulfetado resultam na oxidação de enxofre e de ferro podendo levar à formação de água ácida com altas concentrações de sulfato e de metais pesados, como por exemplo, zinco, cádmio, chumbo, cobre. As técnicas, tradicionalmente, usadas para o tratamento dessas águas têm sido baseadas em tratamentos químicos (tratamentos ativos) através da neutralização da acidez e precipitação dos metais, normalmente, pela adição de cal (Ca(OH)_2). As desvantagens desses tipos de tratamentos estão relacionadas ao custo dos reagentes químicos e a produção de grande quantidade de resíduos, os quais devem ser dispostos em locais apropriados (Sengupta, 1993). Além disto, os tratamentos ativos, geralmente, não

reduzem a concentração de sulfato para os valores preconizados pela legislação vigente. Apesar da cal apresentar a propriedade de elevar o pH e de precipitar os metais das águas residuárias, o nível de sulfato estabiliza-se na faixa de 1400 a 1600mg/L que é justamente a faixa de solubilidade da gipsita (sulfato de cálcio dihidratado). Em vista disso, esforços têm sido feitos para desenvolver alternativas para o tratamento de águas contendo elevados teores de sulfato. O processo biológico de redução de sulfato têm sido estudado como uma opção de descontaminação dessas águas. O processo é baseado: na produção biológica de ácido sulfídrico por bactérias redutoras de sulfato (BRS) (equação 1); na precipitação dos metais pela formação de sulfetos metálicos (MeS) (equação 2); e, na neutralização da água, decorrente do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (equação 3) (Widdel, 1988). O símbolo Me representa os metais bivalentes Cu, Zn, Cd, Mn, Fe, Ni, etc., que encontram-se presentes em drenagens ácidas de minas (DAM). Os metais que formam íons com valência diferente de 2 também podem ser precipitados. A fórmula CH₂O representa a biomassa.



Uma das vantagens dos processos biológicos em relação aos processos químicos refere-se ao seu baixo custo. Outra vantagem, considerando o caso específico das BRS, seria que os sulfetos metálicos, gerados durante a redução de sulfato a sulfeto, formam um menor volume de lodo e são menos solúveis, isto é, mais estáveis, do que os hidróxidos produzidos pelo tratamento químico. Além disso, os metais sulfetados podem ser recuperados e reciclados. Porém, o tratamento biológico não substitui o tratamento químico, pois as BRS não sobrevivem em condições drásticas de pH e de concentração de metais encontradas nas águas ácidas, por exemplo. Ou seja, o processo biológico é adequado para uma etapa de polimento, após o tratamento químico.

As águas ácidas contendo metais, de modo geral, possuem relativamente baixas concentrações de substâncias orgânicas. Por esta razão, a adição de fontes de carbono como doadores de elétrons para a redução biológica de sulfato é necessária para promover a produção de H₂S. As bactérias redutoras de sulfatos podem utilizar vários substratos orgânicos de baixa massa molecular; por exemplo lactato, acetato, etanol, fumarato e outros. Algumas espécies de bactérias redutoras de sulfato oxidam os compostos orgânicos completamente, produzindo dióxido de carbono; enquanto que outras espécies oxidam compostos orgânicos de forma incompleta gerando acetato (Lens *et al.*, 1998; Burgess e Stuetz, 2002; Beyenal e Lewandowski, 2001; Ingvorsen *et al.*, 2003; Kaksonen *et al.*, 2003).

Como exemplos da utilização de microrganismos para o tratamento de efluentes podem ser citadas as estações de tratamento de esgoto (ETES). As ETES utilizam o processo passivo tanto aeróbio quanto anaeróbio, rotineiramente, no tratamento de esgotos domésticos. As BRS estão contidas na microfauna dos tanques anaeróbios destas estações, assim como, de ambientes naturais: brejos, lagoas, rios, oceanos, etc. Estas bactérias fazem parte do grupo de microrganismos do ciclo do enxofre sendo que a biorredução do sulfato é uma das muitas etapas de transformação deste elemento na natureza. Do ponto de vista da saúde pública, a presença de elevadas concentrações de sulfato nas águas é muito mais danosa que a presença das BRS, pois, além destas bactérias não serem patogênicas, a simples filtração da água seria suficiente para retê-las. O problema seria a produção de ácido sulfídrico que é um gás tóxico gerado a partir do metabolismo das BRS. Porém, este produto pode ser utilizado na precipitação de metais, ser oxidado a enxofre elementar ou mesmo retido com o uso de carvão ativado e/ou limalha de ferro.

Este é o primeiro projeto da linha de pesquisa “redução de sulfato com BRS” desenvolvido no Núcleo de Valorização de Materiais Minerais (NVMM) e visou estabelecer as condições ótimas para crescimento destas bactérias, bem como, realizar sua caracterização microbiológica e estudar a precipitação dos metais cádmio e manganês em reatores de batelada contendo soluções sintéticas. Estas bactérias são

responsáveis pela redução do sulfato a ácido sulfídrico, dentro do ciclo do enxofre, sendo encontradas em regiões anaeróbias ou microaeróbias, como brejos, leitos de rios, fundo do mar, minas subterrâneas etc. Sua resistência natural a condições adversas, aliada a sua maleabilidade nutricional, facilita o manuseio das BRS em laboratório e viabiliza sua aplicação em processos de tratamentos de águas residuárias.

II. RELEVÂNCIA DA PESQUISA:

A biotecnologia apresenta amplo potencial de aplicação junto ao setor mineral e metalúrgico brasileiro, podendo ser citados, como exemplos, a bioflotação, a biolixiviação, a biooxidação e o tratamento passivo de efluentes. A biorredução de sulfato, pelo uso de BRS, está incluída entre os processos biotecnológicos aplicados ao tratamento de efluentes (Von Sperling, 1996). Sendo o ácido sulfúrico um reagente barato e estável, este é, normalmente, a primeira opção em diversos processos onde faz-se necessário o uso de ácidos, como nas indústrias de produção de cobre e de níquel, nas linhas de galvanização de aços, na produção de ácido fosfórico, etc. Como resultado, os níveis de sulfato em águas residuárias, destas e de outras indústrias, são superiores aos permitidos para descarte no curso d'água receptor (250mg/L) (Resolução CONAMA nº20, 1986). Em função da ineficiência da tecnologia existente para a diminuição dos teores de sulfato (tratamentos ativos: precipitação com compostos de cálcio, alumínio, chumbo, bário, etc), faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias.

O tratamento de águas residuárias ricas em sulfato pode ser químico, fisico-químico ou biológico. Por questões ambientais e econômicas, os processos químicos e fisico-químicos são preteridos sempre que possível. O uso de BRS justifica-se, entre outras coisas, por: (1) poderem ser manuseadas em condições aeróbias, devido a sua tolerância ao oxigênio; (2) possuírem capacidade de utilização tanto do nitrato quanto do sulfato como aceptor final de elétrons, otimizando a desnitrificação; (3) sua capacidade de remoção de matéria orgânica; (4) liberarem H₂S em seu metabolismo, precipitando metais; e (5) reduzirem a produção de lodo (Lens *et al.*, 1998). O uso das BRS para redução de sulfato e precipitação de metais mostra-se como uma tecnologia viável, de baixo custo e que pode contribuir para a diminuição da poluição de cursos d'água. Além disto, o processo biotecnológico está em acordo com a proposta de “Desenvolvimento Sustentável”, uma vez que, a biorredução baseia-se no fenômeno natural de auto-depuração (Miranda, 2003; Braga, 2002).

O tratamento passivo de efluentes industriais, utilizando BRS em reatores anaeróbios, vem sendo aprimorado, em escala piloto (tanque de 25m³ e vazão de 2m³/h), na Companhia Mineira de Metais (CMM) do grupo Votorantim e tem apresentado bons resultados no que se refere à precipitação de metais. O zinco, por exemplo, passa de 500mg/L para 3mg/L após este tratamento. O objetivo do processo é enquadrar os metais pesados dentro dos níveis estipulados pela Resolução CONAMA nº20 de 1986. Um grupo de pesquisa do NVMM/UFOP tem acompanhado os trabalhos, não só nesta empresa, como em outras que apresentam elevadas concentrações de sulfato. A biotecnologia aplicada na mitigação de impactos ambientais da indústria tem sido tema de vários editais de instituições relacionadas à pesquisas no Brasil, como, por exemplo, o CNPq, indicando que o estudo das BRS é um tema em voga e promissor.

No caso brasileiro, a redução dos teores de sulfato acompanha a neutralização da acidez com a cal que é amplamente disponível e de baixo custo. A precipitação de sulfato com a cal, porém, não é eficiente a ponto de atingir os limites determinados pela Resolução CONAMA nº20 de 1986. O efluente deste processo precisa passar por uma etapa de polimento para adequação do sulfato. Existem, basicamente, duas opções para o polimento de efluentes ricos em sulfato que são: o tratamento químico (tratamento ativo) e o tratamento biológico (tratamento passivo). A precipitação química do sulfato é feita com metais pesados (Pb ou Ba) o que é claramente desaconselhável. O tratamento passivo, além de utilizar fontes biodegradáveis (esterco, soro de leite, bagaço de cana, etc) para alimentação do sistema, estas fontes também são amplamente disponível e de baixo custo. Desta forma, o tratamento biológico apresenta-se como uma alternativa, ambientalmente correta, para o tratamento do sulfato. Além disso, existem poucos trabalhos, no país, sobre o assunto e há a necessidade de se adaptar a tecnologia às condições tropicais.

III. OBJETIVOS:

*** Geral**

Este projeto tem como objetivo geral estudar a aplicação de bactérias redutoras de sulfato na remediação de águas com elevados teores de sulfato, pH moderadamente ácido e contendo metais (manganês e cádmio).

*** Específicos**

1. Isolar e caracterizar morfológica e bioquimicamente as BRS.
2. Estudar a redução do teor de sulfato livre em meios de cultura sintéticos.
3. Estudar a precipitação de metais na presença das BRS.
4. Estudar o efeito da variação do pH no crescimento das BRS.
5. Estudar o efeito da variação do pH na redução do sulfato.
6. Avaliar a redução de sulfato em condições reais (amostra de efluente industrial).

IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde 1960, com o Clube de Roma (Miranda, 2003), a disponibilidade de água doce no planeta tem feito parte das pautas de discussões de Conferências Internacionais e de Organizações não Governamentais (ONGs) ligadas ao meio ambiente. Este fato deve-se ao risco de escassez de água doce no planeta. Sendo a água um recurso natural fundamental à vida, não só sua quantidade como sua qualidade devem ser preservadas. Durante a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento, Rio-92, foi criado um programa de ação denominado Agenda 21 que “apresenta um roteiro detalhado de ações concretas a serem adotadas até o século XXI pelos governos, instituições das Nações Unidas, agências de desenvolvimento e setores independentes” para garantir, dentre outras coisas, a disponibilidade de água para as gerações futuras (Rebouças *et al.*, 2002; Braga, 2002). Além da Rio-92, outros acontecimentos como a criação do EMAS - “Eco Management and Audit Scheme” - em 1993, a edição da NBR ISO 14001, em outubro de 1996 e a priorização do CDM (Mecanismo de Desenvolvimento Limpo), em 1998, contribuíram para a caracterização da década de 90 como a fase da Gestão Ambiental. Já o século XXI pode ser caracterizado como a fase do Desenvolvimento Sustentável, sendo os principais temas de discussão a água, a energia, a saúde, a agricultura e a biodiversidade (Miranda, 2003).

É dentro deste contexto que as “ditas tecnologias limpas” vêm sendo desenvolvidas. Os objetivos principais desta nova linha tecnológica são: (1) produzir melhor a menores custos, utilizando materiais adequados, minimizando o consumo de energia, a geração de resíduos e o impacto ambiental; (2) oferecer produtos seguros e de alto desempenho. Baseando-se nestes princípios, os processos químicos de tratamento da água vêm sendo substituídos por processos biológicos (Johnson, 2001). Como exemplos podem ser citados: os reatores anaeróbios (Von Sperling, 1996), utilizados no tratamento de águas residuárias; e as Wetlands (Sengupta, 1993), utilizadas no tratamento de águas ácidas de minas. Tanto os reatores anaeróbios quanto as “Wetlands” foram espelhados em processos naturais de autodepuração das águas.

Quando se refere à disponibilidade de água em uma determinada região, não somente a sua quantidade como a sua qualidade devem ser avaliadas. No Brasil, em atendimento ao princípio constitucional de 1988, foi promulgada a Lei nº 9.433, em 9.1.97, que criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos e instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos cujos objetivos são: (1) assegurar a disponibilidade de água; (2) assegurar a utilização racional e integrada dos recursos; e (3) assegurar a prevenção e a defesa contra eventos hidrológicos críticos. Para garantir que os seus objetivos sejam alcançados, a Política Nacional de Recursos Hídricos faz uso de instrumentos como os Planos de Recursos Hídricos, o enquadramento dos corpos d' água em classes de uso (Resolução CONAMA nº 20, 1986), a outorga dos direitos de uso da água, a cobrança pelo uso da água e o Sistema de Informações sobre Recursos Hídricos (Braga, 2002; Miranda, 2003).

De um modo geral, a atividade industrial é responsável pela produção de diversos tipos de poluentes que contaminam os corpos d' água. As atividades de mineração e de metalurgia, por exemplo, apresentam elevado consumo de água nos seus processos e apesar do tratamento dado a estes efluentes industriais, uma parte dos poluentes ainda é liberada nos corpos receptores. Dentre os poluentes pode-se citar o sulfato. Segundo Lens *et al.* (1998), são várias as fontes de contaminação de água por sulfato. As indústrias podem liberar este ânion quando utilizam ácido sulfúrico em larga escala ou mesmo quando o insumo inclui alimentos ricos em sulfato, como é o caso das indústrias de alimentos que trabalham com processos fermentativos ou com frutos do mar. Outros exemplos, são as indústrias que utilizam compostos contendo enxofre, como o H₂S (curtumes, polpa de papel), o SO₃²⁻ (polpa de papel) ou o tiosulfato (alvejantes, fixadores fotográficos) que também contribuem para o aumento da concentração de sulfato no ambiente (Lens *et al.*, 1998).

Em se tratando de qualidade de água, muitos parâmetros são avaliados, dentre eles o pH, a concentração de sulfato e a presença de metais. Estes parâmetros podem atingir valores críticos quando determinados em águas provenientes de minerações com problemas de drenagens ácidas de minas (DAM) (Sengupta, 1993) ou mesmo em

indústrias que fazem uso de grande quantidade de ácido sulfúrico em seus processos de produção. Com o objetivo de reverter ou mesmo de evitar o problema das águas ácidas, várias pesquisas baseadas em tratamentos biológicos foram desenvolvidas nos últimos anos. Dentre as linhas desenvolvidas, o uso de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em reatores anaeróbios têm apresentado bons resultados.

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo de procariontes que atua em funções essenciais no ambiente anaeróbio. Este grupo de BRS pode ser subdividido em quatro sub-grupos de acordo com as análises de rRNA: Gram-negativo mesofílico; Gram-positivo formador de esporo; termofílico; e, arqueo-termofílico. Todos estes grupos têm como característica comum o uso do sulfato como acceptor final de elétrons (Castro *et al.*, 2000). Algumas características das BRS são utilizadas na classificação tradicional deste grupo, entre elas a morfologia celular, a motilidade, a temperatura ótima de crescimento, a oxidação completa ou incompleta do acetato, etc. A tolerância, em maior ou em menor grau, ao oxigênio e o metabolismo assimilatório ou dissimilatório do sulfato também devem ser avaliados durante a classificação das BRS (Castro *et al.*, 2000). A formação de biofilme, inerente a estas bactérias, tem sido aplicada a processos de tratamento de água (Okabe *et al.*, 2003; Lens *et al.*, 1998).

Os compostos de enxofre podem ser utilizados pelas BRS tanto durante o metabolismo assimilatório quanto dissimilatório. No metabolismo assimilatório, o microrganismo precisa reduzir o sulfato para que este seja incorporado aos grupos tiol (valência -2), por exemplo, dos aminoácidos cisteína, cistina e metionina. No metabolismo dissimilatório, por sua vez, a redução de sulfato está relacionada ao processo respiratório das BRS, onde este ânion é utilizado como acceptor final de elétrons. A redução do sulfato durante a respiração anaeróbia produz ácido sulfídrico que é liberado no ambiente (Grant, 1998).

As características dos microrganismos são importantes para o entendimento de seu comportamento no ambiente. Observa-se que as BRS Gram-positivas são encontradas, principalmente, na forma de cocos, apresentam grande tolerância ao oxigênio, podem utilizar vários tipos de doadores de elétrons (acetato, etanol, anilina, etc) e são

resistentes ao calor. Conseqüentemente, este sub-grupo é abundante em ecossistemas inóspitos para a maioria das outras BRS (Okabe *et al.*, 2003). Esta maior resistência das bactérias Gram-positivas pode estar relacionada a sua espessa camada de peptidoglicano na membrana celular. As bactérias são capazes de se adaptar às mais diversas condições ambientais, incluindo aquíferos ricos em metais dissolvidos (cobre, zinco, cádmio, ferro, chumbo, etc) e pobres em matéria orgânica (Esteves, 1998). A capacidade de adaptação destes microrganismos é uma das vantagens do uso da biorremediação em comparação ao tratamento químicos e físico-químicos.

Em se tratando da poluição associada aos processos minero-metalúrgicos, a drenagem ácida de mina (DAM) é uma de suas formas mais importantes, sendo esta caracterizada por apresentar elevada acidez ($\text{pH} < 3$), alta concentração de metais e de sulfatos ($> 3000 \text{mg/L}$) (Sengupta, 1993; Abrahão e Mello, 2003). Assim sendo, o tratamento da DAM visa alcalinizar, precipitar metais e reduzir o teor de sulfato da água.

Sabe-se que a água considerada classe especial ou classe 1 deve apresentar, entre outros parâmetros, pH entre **6 e 7**, de acordo com a Resolução CONAMA nº 20 de 1986. Este pH é mantido pelo equilíbrio entre os diversos processos naturais que ocorrem nos corpos d'água não poluídos. Entre estes processos podem ser citados os anaeróbios. (Esteves, 1998). As BRS fazem parte destes microrganismos que atuam em condições anaeróbias e contribuem para a manutenção do pH da água liberando CO_2 durante a redução do teor de sulfato. Parte do CO_2 produzido é liberado para atmosfera e parte permanece em solução aquosa na forma de bicarbonato (HCO_3^-). Este processo ocorre naturalmente em corpos d'água não poluídos, contudo, para ser utilizado em um processo de biorremediação de DAM é necessário adequar as condições do efluente às condições ambientais específicas que favorecem o crescimento das BRS.

De maneira geral, as BRS requerem um ambiente anaeróbio, com potencial redox menor que -100mV (Ag/AgCl) e pH maior que 5,5 (Garcia *et al.*, 2001); o que, normalmente, não é encontrado nas DAM. Porém, as condições presentes no sedimento permanente dos corpos d'água favorecem o seu crescimento (Esteves, 1998). A formação de micro-

ambientes em camadas de solo alagado pode justificar a presença de BRS em barragens de rejeito, por exemplo, onde as condições gerais são desfavoráveis. Isto pode ser verificado recolhendo-se água do interstício do sedimento que, normalmente, apresenta características químicas e microbiológicas distintas das encontradas na água da barragem. Outra condição ambiental que deve ser observada é a presença de metais. Em drenagens ácidas, a concentração de metais é elevada e alguns metais, como o cobre, são tóxicos para as BRS (Garcia *et al.* 2001).

O estudo das BRS, enquanto alternativa para o tratamento de efluentes ricos em sulfato, metais e com pH ácido, precisa focar o ambiente natural onde o problema aflorou. Isto porque, os microrganismos utilizados em uma planta de biorremediação devem estar adaptados às condições do meio. Com base nesta premissa, Garcia *et al.* (2001) desenvolveram um estudo cujo objetivo era tratar a DAM usando BRS coletadas do sedimento da barragem de rejeito na Espanha. Constatou-se que esta amostra de lodo, retirada de uma profundidade de 12m (condições anaeróbias), continha uma grande diversidade de BRS, entre outros microrganismos.

Estes mesmos autores (Garcia *et al.*, 2001) estudaram fenômenos naturais que ocorriam durante o percurso do rejeito numa mina de pirita; onde foi possível observar, entre outras coisas, as alterações químicas e microbiológicas desta drenagem, durante o seu curso. Este rejeito era produzido em um processo de flotação de minério sulfetado contendo cobre, zinco e chumbo. A composição do rejeito gerado na planta correspondia a uma polpa de pirita com 30% de sólidos. A polpa percorria 2,3Km, por gravidade, através de um canal a céu aberto, até chegar à barragem de rejeito. Foi feita uma caracterização química da fase aquosa despejada na barragem e, para isso, foram colhidas amostras no início e no final da drenagem. Verificou-se que havia grande diferença na concentração de metais em condições aeróbias (canal) e anaeróbias (sedimento da barragem). Garcia *et al.* (2001) deram continuação aos estudos desta barragem de rejeito de pirita. Os parâmetros analisados foram pH, Eh, concentração de sulfato, sulfito, cálcio, magnésio e dos metais Cu, Fe, Zn e Pb. Foi possível observar que, durante o percurso da polpa até a barragem, a água adquiria características de

drenagem ácida (condições aeróbias). A tabela 1 apresenta a composição química do efluente.

Tabela 1: Análises químicas do início e do final da drenagem (Garcia *et al.*, 2001).

Parâmetros	Início da drenagem	Final da drenagem
pH	10	3,5
Eh (mV, Ag/AgCl)	+10	+350
Sulfato (mg/L)	650	2000
Sulfito (mg/L)	120	3
Cu (mg/L)	0,2	0,8
Fe (mg/L)	2,0	55
Zn (mg/L)	2,0	50
Pb (mg/L)	0,2	6
Ca (mg/L)	450	450
Mg (mg/L)	20	55

Uma vez na barragem, ocorria a sedimentação do resíduo sólido e várias transformações químicas e microbiológicas. O resultado final era a formação de um lodo no sedimento da barragem e de duas camadas líquidas distintas em função do gradiente de oxigênio: uma zona anaeróbia, no fundo e uma zona aeróbia, na superfície (água ácida). Estas camadas apresentavam composições químicas bem diferentes. A água intersticial do sedimento desta barragem apresentava características semelhantes a água do início da drenagem enquanto a água superficial da mesma caracterizava-se como água ácida (tabela 2).

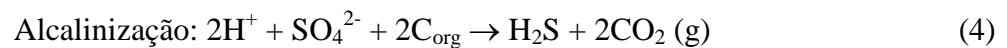
Tabela 2: Composição química das camadas de água da barragem (Garcia *et al.*, 2001).

Parâmetros	Água superficial da barragem	Água do sedimento da barragem
pH	3,5	7
Eh (mV, Ag/AgCl)	+350	-45
Sulfato (mg/L)	2000	500
Cu (mg/L)	0,8	0,6
Fe (mg/L)	55	5,0
Zn (mg/L)	50	0,3

Paralelamente à diversidade química, avaliou-se também a diversidade microbiológica. A análise da água superficial da barragem apresentou em torno de $1,1 \times 10^2$ a $7,0 \times 10^3$ NMP/g bactérias litoautotróficas, aeróbias, oxidantes de ferro e de enxofre; e $1,0 \times 10^3$ NMP/g bactérias heterotróficas de várias espécies (NMP = Número Mais Provável). Não foram encontradas BRS nas amostras de água superficial. Enquanto que a análise de água intersticial do lodo no sedimento da barragem apresentou BRS na faixa de $1,7 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^3$ NMP/g; bactérias litoautotróficas, na faixa de $2,5 \times 10^1$ a $9,5 \times 10^2$ NMP/g; e heterotróficas, $6,0 \times 10^1$ NMP/g. Com estas análises, foi possível observar que as BRS cresceram preferencialmente em condições anaeróbias e em locais contendo sólidos sedimentados (Fortin *et al.*, 2000; Sass *et al.*, 2002). Assim, o sedimento da barragem funcionou como um biorreator anaeróbio natural.

Estudos em laboratório foram realizados com o objetivo de fornecer dados sobre as condições ambientais que favoreceram o desenvolvimento das BRS na barragem de pirita (Garcia *et al.*, 2001). Nesta etapa, foram utilizados os seguintes meios nutricionais: Postgate's C; Ágar Nutriente; e meios 9K, sem ferro. Em meio Postgate's C, foram feitos três tipos de ensaios, utilizando as BRS, para avaliar: (1) a influência do pH no desenvolvimento destes microrganismos; (2) a precipitação de metais; (3) o consumo de sulfato. Nos ensaios de pH, o meio foi ajustado, com a adição de ácido sulfúrico diluído, para valores iguais a 4, 5 e 7. Nos ensaios de precipitação de metais, foram utilizadas duas culturas em pH's diferentes: a cultura Di, adaptada ao pH 5 e a cultura Ei não adaptada, com pH igual a 7. O meio de cultura Di apresentava 30mg/L de ferro e diferentes concentrações de Cu (25, 50, 100, 150 e 200mg/L), utilizando-se, para isso, o sulfato de cobre penta-hidratado. A concentração inicial de sulfato era de 9000mg/L e era analisada pelo método turbidimétrico, com BaCl_2 . O meio Postgate's C, com pH 7 e temperatura de 30°C, foi utilizado para isolar e enumerar (Número Mais Provável = NMP) as BRS. As bactérias das amostras de água superficial da barragem de rejeito foram isoladas e enumeradas utilizando-se os meios 9K sem ferro (Garcia *et al.*, 2001).

Ensaio utilizando o meio Postgate's C em três diferentes pH's: 4, 5 e 7, demonstraram que o pH ótimo para o crescimento da cultura mista de BRS estava entre 7 e 7,5 e que estas bactérias adaptavam-se a um pH igual a 5. Já em pH moderadamente ácido (pH=4), as BRS mistas apresentaram dificuldades de crescimento, apesar de terem demonstrado sinais de atividade como a diminuição do Eh e o aumento do pH do meio de cultivo. A elevação do pH está relacionada ao consumo de H⁺ e a produção de CO₂ durante o metabolismo destes microrganismos de acordo com a reação de alcalinização (4) (Garcia *et al.*, 2001). Outros estudos citam o pH 5,5 como ótimo para o crescimento das BRS que utilizam o lactato como fonte de carbono (Küsel *et al.*, 2001; Lens *et al.*, 1998) e o pH 3,3 como sendo o valor mais ácido que estes microrganismos suportam sem perder a capacidade de reduzir sulfato (Elliott *et al.*, 1998). Assim como, a diminuição do Eh e o aumento do pH, a precipitação de metais é uma consequência do metabolismo das BRS.



Foi observado (Garcia *et al.*, 2001) que tanto as culturas Ei (pH=7) quanto Di (pH=5) apresentaram bons resultados na precipitação de Cu, para concentrações iguais a 25, 50 e 100mg/L. A concentração de Cu ajustada para 150mg/L, nos meios Ei e Di, fez com que as BRS apresentassem uma cinética de crescimento extremamente baixa; enquanto que uma concentração de 200mg/L do mesmo metal levou a inibição total de crescimento destes microrganismos. Análises de difração de raios-X confirmam a precipitação dos metais. As formas mais estáveis de precipitação do Fe e do Cu foram, respectivamente, FeS e CuS (Garcia *et al.*, 2001).

A redução do sulfato é consequência da respiração das BRS que gera o H₂S por um processo dissimilatório (Grant, 1998; Widdel, 1988). As análises da concentração de sulfato demonstraram que em pH 7 houve consumo de 85% (9000mg/L para 1350mg/L) de sulfato em 27 dias, enquanto, em pH 5, o mesmo consumo ocorreu em 9 dias. Paralelamente à redução de sulfato, observou-se a alcalinização do pH para um valor

igual a 8,2 e a diminuição do Eh para -250mV (Garcia *et al.*, 2001). Estes resultados foram obtidos em um sistema contínuo.

Os resultados finais demonstraram que o uso das BRS em tratamento de drenagem ácida de mina era possível desde que fossem respeitadas as exigências ambientais específicas destes microrganismos (Garcia *et al.*, 2001). Isto significa que os fatores limitantes como pH, Eh, concentração de sulfato, de H_2S , de metais e de matéria orgânica devem ser avaliados e ajustados, quando possível, para favorecer o crescimento das BRS. Por outro lado, em ambientes naturais, as bactérias adaptadas são capazes de modificar o seu micro-ambiente tornando-o propício ao seu desenvolvimento.

Christensen *et al.* (1996), estudando a biorremediação de águas ácidas, em escala de bancada, simularam o efeito das BRS no tratamento destas águas usando reatores anaeróbios de batelada. O objetivo era o mesmo de Garcia *et al.* (2001), ou seja, estimular o crescimento das BRS, em seu ambiente natural, para que elas atuassem na remediação da drenagem ácida de mina. Os reatores utilizados nos ensaios eram cilindros de acrílico transparente contendo três camadas cada um: duas de sedimento, compostos de brita e de areia e uma camada superior de água de mina. A mistura de água usada para alimentar os reatores foi retirada de poços com 120m de profundidade, visto que, nesta condição, havia maior possibilidade de se encontrar BRS. O soro de leite de vaca foi usado como fonte de matéria orgânica em todos os reatores exceto no reator controle. A composição do soro foi relatada como sendo: 5g de lactose, 6g de proteína, 0,5g de gordura e 6g de cinzas por litro (Christensen, *et al.*, 1996).

Foram utilizados ao todo oito reatores: (1) W1 e W2 - “whey”; (2) WLD - “whey low dosage”; (3) WCM1 e WCM2 - “whey + cow manure”, eram supridos com 1250mL de soro mais estrume de vaca; (4) WSRB1 e WSRB2 - “whey + BRS”, foram inoculados com uma mistura de BRS (5×10^7 células/mL) e de bactérias fermentadoras (5×10^7 células/mL) crescidas em um meio composto de lactose e sais minerais. A quantidade de soro acrescentada em cada reator foi de 1250mL (5,7% v/v), com exceção do reator WLD que recebeu 50mL (0,2% v/v). A composição da fase aquosa foi previamente

analisada, em todos os reatores, segundo os seguintes aspectos: pH; concentração de sulfato; cálcio; magnésio; alumínio; ferro; cobre; zinco e manganês. Após a adição dos substratos e dos inóculos característicos de cada reator, os recipientes foram selados e incubados a 15°C, no escuro, durante 203 dias.

A princípio, todos os reatores continham oxigênio dissolvido em sua camada líquida, uma vez que, nenhum cuidado especial foi tomado durante o envase nos recipientes. As amostras retiradas dos reatores foram avaliadas segundo os parâmetros: Eh; pH; carbono orgânico total (COT); ácidos graxos voláteis; alcalinidade total e acidez total; número de bactérias (contagem direta em microscópio); concentração de metais dissolvidos, de sulfetos, de H₂S, de íons amônio, de nitrato e de fosfato.

Passada a fase de adaptação (fase lag), observou-se em todos os reatores, exceto no controle, o aumento de pH, a formação de biofilme, a diminuição do potencial redox e a precipitação de um resíduo escuro devido a formação dos sulfetos metálicos de cobre, zinco, ferro, etc. De um modo geral, o precipitado cinza aparecia primeiro na interface entre a camada de areia e a camada de brita e expandia-se, paulatinamente, para as camadas sólidas superiores, de forma que, com o passar do tempo, pôde ser observado a deposição de um filme escuro sob a parede dos reatores. Testes pontuais mostraram que a água intersticial da areia e da camada de brita eram alcalinizadas (p.ex. pH=5,9) prematuramente em relação a água superficial (pH em torno de 3,7). Mas, gradualmente, as diferenças entre as estratificações diminuíam até deixarem de existir. As alterações citadas acima ocorreram de forma mais pronunciadas nos reatores WSRB1, WSRB2, W1 e W2 (Christensen *et al.*, 1996).

No início dos ensaios, todos os reatores que continham 5,7% de soro de leite apresentaram, na água superficial, $2,0 \times 10^7$ a $3,4 \times 10^7$ bactérias por mL. Sendo que a forma predominante foi de cocos. Os recipientes inoculados com BRS (WSRB1 e WSRB2) continham $1,3 \times 10^6$ bactérias em forma de vibrio por mL, além das bactérias em forma de cocos. Ao longo do experimento, a contagem total, em média, manteve-se

em $2,5 \times 10^7$ células por mL, em todos os cilindros supridos com 1250mL de soro (Christensen *et al.*, 1996).

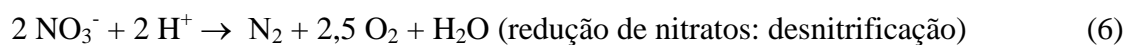
Analisando-se a presença de ácidos graxos voláteis e de sulfeto livre (40-150mg/L) no final dos ensaios concluiu-se que os reatores alimentados com 5,7% de soro continham carbono orgânico em excesso. A consequência disto foi o acúmulo de acetato que chegou a 37% do carbono orgânico total (COT) remanescente no reator W1. O acetato é produto da fermentação e da oxidação incompleta da matéria orgânica e é substrato da oxidação completa. Como a fermentação e a oxidação incompleta ocorrem preferencialmente à oxidação completa, o resultado é o acúmulo de acetato. As três vias metabólicas – fermentação, oxidação completa e incompleta - podem ser utilizadas por diferentes grupos de BRS (Lens *et al.*, 1998; Widdel, 1988). Porém, devido à abundância de substrato, as BRS responsáveis pelo final do processo de transformação da matéria orgânica (oxidação completa) tiveram seu crescimento inibido (Christensen *et al.*, 1996). Okabe *et al.* (2003) consideram a degradação de acetato como uma etapa limitante em condições anóxicas e sulfidogênicas, devido a maior sensibilidade das BRS que o utilizam.

Quando vários aceptores de elétrons estão disponíveis no meio, o sistema utiliza aquele que produz mais energia. E enquanto houver substâncias de maior liberação de energia, as inferiores não serão utilizadas. Assim sendo, pode-se dizer que a ordem decrescente de utilização dos aceptores, baseada na liberação de energia, é: oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}). E as principais reações para geração de energia que ocorrem em condições aeróbias, anóxicas e anaeróbias são (Von Sperling, 1996):

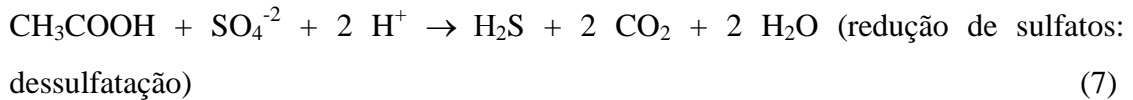
- Condições aeróbias:



- Condições anóxicas ($-50mV < Eh < 50mV$):



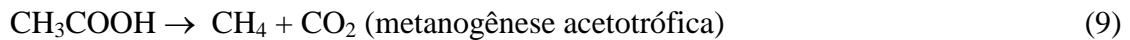
- Condições anaeróbias ($Eh < -50mV$):



- Condições anaeróbias:



- Condições anaeróbias:



Além do fator energético, a presença de H_2S livre em concentrações acima de 40mg/L começa a inibir a atividade das BRS responsáveis pela oxidação completa, dificultando ainda mais o consumo do acetato. Porém, a concentração de ácido sulfídrico considerada tóxica para as BRS depende das espécies presentes, do grau de adaptação das bactérias e da composição orgânica e inorgânica do meio (Burgess e Stuetz, 2002). Nos reatores WSRB1, WSRB2, W1 e W2 foram encontrados valores de sulfeto total na ordem de $6,4 \times 10^{-3}$ a $9,3 \times 10^{-3}$ mol/L, após 203 dias. Tais dosagens de sulfeto correspondiam a 614 e 893mg/L de sulfato, respectivamente, o que equivalia a 19-27% de consumo de sulfato, sendo que a concentração inicial deste ânion em todos os reatores era 3306mg SO_4^{-2} /L (Christensen *et al.*, 1996).

O maior problema do tratamento biológico de águas residuárias ricas em sulfato é a produção de gás sulfídrico pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), tanto em condições anaeróbias ($Eh < -50mV$) quanto anóxicas ($-50mV < Eh < 50mV$) (Von Sperling, 1996). Este gás pode causar falência do sistema de tratamento quando em concentrações maiores que 150mg/L, devido a sua toxicidade. Esta varia de reator para reator dependendo da temperatura, do processo adotado (contínuo, batelada, etc), da alimentação (substratos utilizados: acetato, lactato, propionato, etanol, etc), do pH (toxicidade diminui em pH alcalino), do lodo (o lodo granular requer concentrações de sulfeto superiores a 90mg/L para inibir 50% das bactérias metanogênicas, enquanto o lodo suspenso requer 50mg/L) e da resistência bacteriana.

Por outro lado, em águas contaminadas com metais, a presença de H₂S é vantajosa. Isto porque, os sulfetos formam compostos de baixa solubilidade com os metais provocando a precipitação dos mesmos. Christensen *et al.* (1996) observaram em seus reatores a precipitação de alguns metais, entre eles: o cobre, o ferro, o alumínio, o zinco e o manganês. O cobre foi o primeiro metal a precipitar, devido a formação do sulfeto de cobre (CuS) que era altamente insolúvel nas condições encontradas na água intersticial dos reatores. Com a alcalinização do meio, o ferro poderia ter sido precipitado na forma de FeCO₃ ou de FeS considerando-se apenas o pH; porém, verificou-se que a forma predominante era FeS. A precipitação do alumínio deu-se pela formação de óxido ou hidróxido deste metal. O zinco e o manganês foram precipitados na forma de sulfetos (Christensen *et al.*, 1996).

A inoculação extra de BRS nos reatores WSRB1 e WSRB2 encurtou a fase lag e permitiu a precipitação rápida dos metais, comparativamente aos outros cilindros. Em contraste, o uso de esterco de vaca apresentou resultados negativos que não foram esclarecidos (Christensen *et al.*, 1996). Tuppurainen *et al.* (2002) utilizaram o esterco de vaca anaerobicamente digerido como inóculo para um reator contínuo do tipo “upflow” e obtiveram precipitação de zinco (98% de 3,84g) e redução de sulfato (30-40%, na maioria dos experimentos). A diferença primordial entre os dois processos que utilizaram o esterco de vaca foi o meio de cultivo. Christensen *et al.* (1996) utilizaram um meio rico em matéria orgânica - composição do soro de leite: 5g de lactose, 6g de proteína, 0,5g de gordura e 6g de cinzas por litro; a quantidade de soro acrescentada em cada reator foi de 1250mL - o que propiciou o crescimento de vários tipos de microrganismos presentes no esterco, inclusive microrganismos que competem com as BRS; enquanto Tuppurainen *et al.* (2002) utilizaram um meio sintético composto basicamente por sais inorgânicos e glicose (2000mg/L), com uma elevada concentração de sulfato (2300mg/L), favorecendo a seleção das BRS.

Christensen *et al.* (1996) verificaram que a presença de areia no fundo dos cilindros era de vital importância para o tratamento das águas ácidas pelas BRS. Pois, foi na água

intersticial da areia que ocorreram as primeiras alterações químicas, como o aumento do pH e a precipitação do cobre. Num primeiro momento, verificou-se, também na água intersticial da areia, o aumento da concentração iônica de ferro e de manganês devido à dissolução redutiva dos óxidos e hidróxidos destes metais. Outro indício da importância da areia para o desenvolvimento das BRS foi a deposição prematura de um precipitado cinza na interface entre a areia e a brita. A explicação para este fenômeno foi relacionada à necessidade das BRS se fixarem em superfícies sólidas. Estas bactérias formaram biofilmes sobre a areia e a brita favorecendo a tolerância ao oxigênio e à presença do cobre em solução (Christensen *et al.*, 1996).

Outros parâmetros avaliados foram as concentrações de fosfato, de nitrato e de amônio, durante o processo. Com relação ao fosfato e ao amônio, observou-se que, apesar da concentração de ambos ter diminuído em todos os recipientes contendo soro, suas concentrações permaneceram relativamente elevadas ao final do experimento. Por outro lado, o nitrato apresentou concentrações inferiores a 0,1mg/L, durante todo o período de incubação (Christensen *et al.*, 1996). Esta redução de nitrato pode estar associada ao crescimento das BRS ou a desnitrificação do meio.

A escolha do processo de tratamento de água residuária rica em sulfato depende do objetivo do tratamento, que pode ser: remover a matéria orgânica, remover o sulfato, remover metais ou remover os três. A eficiência na redução do sulfato está relacionada com a razão DQO/SO_4^{-2} (DQO =Demanda Química de Oxigênio) e com o pH. Em geral, águas residuárias com $DQO/sulfato$ maior que 10 favorecem a remoção de matéria orgânica (metanogênese). Em águas residuárias com valores de DQO/SO_4^{-2} inferiores a 10, prevalece a competição por substrato entre as bactérias metanogênicas e as BRS. Teoricamente, águas residuárias com uma razão DQO/SO_4^{-2} igual ou maior que 0,67 contêm doadores de elétrons suficientes para que as BRS removam todo o sulfato do meio. Isto porque, a matéria orgânica doa 8 elétrons para cada molécula de sulfato e apenas 4 elétrons para cada molécula de oxigênio. Desta forma, pode se dizer que 2 mol de O_2 recebem a mesma quantidade de elétrons que 1 mol de SO_4^{-2} . Isto equivale a

0,67g de O₂ por grama de SO₄²⁻, resultando na razão DQO/SO₄²⁻ igual a 0,67 (Lens *et al.*, 1998).

É interessante observar que, para se obter uma razão DQO/SO₄²⁻ igual a 0,67mg/mg, são necessários 1200mg de DQO para redução de 1800mg de sulfato. A acidez beneficia a eliminação do sulfato de duas maneiras: (1) fornecendo o hidrogênio que será consumido durante o processo de redução de sulfato, o que, conseqüentemente, aumenta a produção de H₂S(g); e (2) propiciando a pré-acidificação do meio para valores em torno de 5,0 a 6,5, o que favorece o metabolismo das BRS em detrimento da metanogênese (Lens *et al.*, 1998; Von Sperling, 1996; Bhattacharya *et al.*, 1995; Vossoughi *et al.*, 2003). A digestão anaeróbia em dois estágios: acidogênica (para eliminação de sulfato) e metanogênica (para degradação de matéria orgânica), tem sido aplicada em vários tipos de reatores, incluindo “upflow filters (reator anaeróbio de fluxo ascendente com filtro), UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) e fluidized bed reactors (reatores anaeróbios de leito fluidizado)” (Lens *et al.*, 1998).

Vossoughi *et al.* (2003), utilizando um reator anaeróbio contínuo do tipo ABR “anaerobic baffled reactor”, estudaram a influência da alteração da razão DQO/SO₄²⁻ (mg O₂/mg SO₄²⁻) no consumo de sulfato e de matéria orgânica. Neste experimento, avaliou-se também a interação das BRS com as bactérias acidogênicas e metanogênicas. O reator era composto de cinco compartimentos, sendo que cada um comportava um volume de 2L de uma solução sintética contendo melaço como fonte de carbono, uréia (0,007 g/g DQO) como fonte de nitrogênio e K₂HPO₄ (0,0006 g/g DQO) como fonte de fosfato. A concentração da DQO foi ajustada, ao longo do processo, para 3000mg/L (valor este que foi mantido constante até o final do mesmo) e a de sulfato iniciava com valor zero (parâmetro inicial de controle), e era aumentada até ajustar-se aos valores pré-determinados de 150, 180, 350 e 500mg/L, com o acréscimo de sulfato de sódio. A temperatura do sistema foi mantida em 35°C e o tempo de retenção hidráulica (HRT) foi de um dia.

A concentração inicial de lodo inoculado no reator foi de 20g/L MLSS “mixed liquor suspended solids”, ou seja, uma suspensão contendo 20g/L de uma mistura de bactérias e outros sólidos suspensos. A amostra de lodo em questão foi proveniente de uma planta de tratamento de água de uma indústria de papel. O tempo de partida do reator foi de uma semana após a qual determinou-se um ponto zero, referente ao começo das análises, e o processo ocorreu continuamente. O ponto zero teve início com uma carga de 1,02Kg DQO/(m³ dia) e 0,09Kg SO₄²⁻/(m³ dia), o que equivale a uma razão inicial DQO/SO₄²⁻ de 11. Posteriormente, esta razão DQO/SO₄²⁻ foi aumentada para 12 - 1,80Kg DQO/m³ e 0,15Kg SO₄²⁻/m³ - e depois para 16,7, onde ajustou-se a DQO afluente para 3,00Kg DQO/(m³ dia) (tabela 3) (Vossoughi *et al.*, 2003).

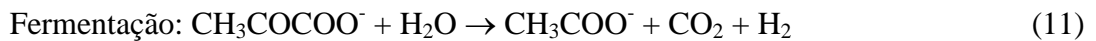
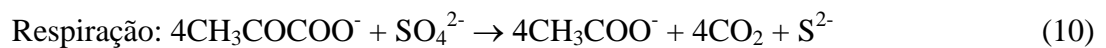
Tabela 3 – Principais parâmetros estudados por Vossoughi *et al.*, 2003:

Parâmetros	Partida	Período 1	P 2	P 3	P 4	P 5
Razão DQO/SO ₄ ²⁻	12-16,7	16,7	15	12	8,6	6
DQO afluente (mg/L)	1800-3000	3000	3000	3000	3000	3000
DQO efluente (mg/L)	480	440	480	480	410	430
SO ₄ ²⁻ afluente (mg/L)	150-180	180	200	250	350	500
SO ₄ ²⁻ efluente (mg/L)	20	20	13	19	16	16
Remoção de matéria orgânica no efluente (DQOmg/L)	83	85	84	84	86	86
Tempo de retenção hidráulica (h)	40-24	24	24	24	24	24
Alcalinidade do efluente, bicarbonato (mg/L)	1380	1400	1450	1500	1800	1950
pH (1ºcompartimento-5ºcomp.)	6-7,1	6-7,1	6-7,2	6-7,2	6-7,2	6-7,2
Sólidos suspensos (MLSS) no efluente (mg/L)	40	43	45	52	57	65
Carga orgânica padrão, Kg DQO/(m ³ .dia)	1,02-3	3	3	3	3	3

No final do processo, ou seja, após 115 dias de operação a razão DQO/SO₄²⁻ apresentou um valor igual a 6, sendo a concentração de sulfato mantida em 500mg/L. Neste período, pôde ser observado um pequeno aumento na remoção de matéria orgânica (de 83% para 86%) devido às BRS (Vossoughi *et al.*, 2003). Isto porque, as BRS têm o seu

crescimento favorecido pelo aumento da concentração de sulfato no meio e são capazes de competir por substrato (matéria orgânica) com as bactérias metanogênicas, aumentando o consumo do mesmo (Lens *et al.*, 1998; Von Sperling, 1996; Bhattacharya *et al.*, 1995; Vossoughi *et al.*, 2003).

Há situações em que as BRS utilizam a fonte de carbono orgânico por duas vias metabólicas diferentes (Vossoughi *et al.*, 2003). Isto ocorre, por exemplo, com as *Desulfovibrio desulfuricans* que usam o piruvato ($\text{CH}_3\text{COCOO}^-$) tanto na respiração (reação 10) quanto na fermentação (reação 11), reforçando a tese de que as BRS são capazes de competir por substrato com as bactérias metanogênicas (Lens *et al.*, 1998; Von Sperling, 1996; Bhattacharya *et al.*, 1995; Vossoughi *et al.*, 2003).



No final do processo, Vossoughi *et al.* (2003) observaram também a alcalinização da solução, devido à redução de sulfato. A alcalinização demonstra, também, a estabilidade operacional do sistema. A remoção do sulfato afluente ocorreu de maneira significativa (65%) no primeiro compartimento do reator que continha microrganismos acidogênicos e apresentava um pH em torno de 6. Isto porque, as BRS e as bactérias acidogênicas coexistem em simbiose (Vossoughi *et al.*, 2003). Estas últimas degradam a matéria orgânica complexa em substâncias simples (acetato, piruvato, etc) que são utilizadas pelas BRS como fonte de carbono. A acidez provocada pela fermentação também favorece a redução do sulfato a sulfeto (Garcia *et al.*, 2001).

Estudos mostram que, tanto em ambientes naturais quanto em reatores anaeróbios, as BRS e as bactérias produtoras de metano (BPM) competem entre si pelo substrato (Lens *et al.*, 1998). Bhattacharya *et al.* (1995), utilizando o acetato como única fonte de carbono para ambos os tipos de bactérias (BRS e BPM), relacionaram a competição entre elas à razão acetato/sulfato e ao potencial redox em um sistema anaeróbio

contínuo e em série. Para realização desta pesquisa, foram utilizadas três culturas-estoque: cultura I, contendo bactérias produtoras de metano (BPM); cultura II, contendo BRS e BPM; e cultura III, contendo apenas BRS. As culturas-estoque eram compostas por um meio rico em sais inorgânicos acrescido de 10mg/L de cisteína e 3000mg/L de bicarbonato. A temperatura de incubação era de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, com tempo de retenção de 50 dias e uma carga de acetato de 500mg/L.dia para todas as culturas-estoque (Bhattacharya *et al.*, 1995).

Os meios, porém, diferiam entre si no que se refere à razão acetato/ SO_4^{2-} , que apresentava valores iguais a 20 na cultura I, 5 na cultura II e 0,5 na cultura III. A cultura III tinha como peculiaridade: a inserção de 2×10^{-3} mol/L de ácido sulfônico 2 bromoetano (BESA) que é inibidor das BPM. As culturas puras foram utilizadas para ensaios cinéticos - como o estudo das curvas de consumo de acetato usadas para determinar os valores de k (constante de velocidade, 1/d) e k_s (coeficiente de velocidade média de Monod, mg/L) - e para o cálculo dos coeficientes de crescimento das BRS (0,0602mg de célula/ mg de acetato) e das BPM (0,0346mg de célula/ mg de acetato). As equações cinéticas de Monod, para velocidade de utilização de substrato (12a) e para crescimento da biomassa (12b), apresentam-se abaixo (Vossoughi *et al.*, 2003):

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{kSX}{(k_s + S)} \quad (12a)$$

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{YkSX}{(k_s + S)} - bX \quad (12b)$$

Onde:

k = constante de velocidade, 1/d

k_s = coeficiente de velocidade média de Monod, mg/L

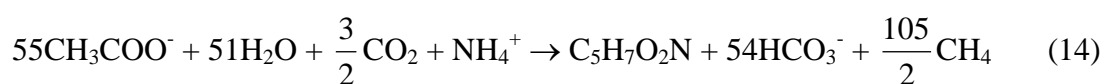
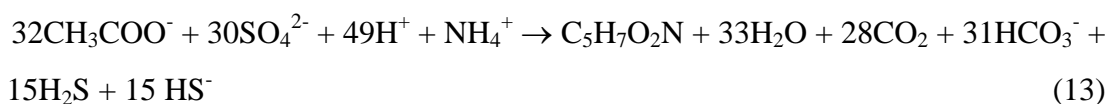
S = concentração de substrato, mg/L

X = concentração da biomassa, mg/L

Y = coeficiente de crescimento, mg de células/ mg de acetato

b = coeficiente de decaimento, 1/d.

Fazendo uso do modelo de Monod para avaliar a constante (k) de degradação de acetato e o coeficiente de velocidade média de Monod (k_s), verificou-se que seus valores eram menores para as BRS ($k=2,4/d$; $k_s=102\text{mg acetato/L}$) quando comparados aos obtidos para as BPM ($k=3,2/d$; $k_s=116\text{mg acetato/L}$), o que significa que as BRS têm maior afinidade pelo acetato que as BPM. Desta forma, quando a razão acetato/ SO_4^{2-} apresenta valores próximos aos valores estequiométricos da reação 13 - acetato/ $\text{SO}_4^{2-}=0,66\text{g/g}$ - o consumo de sulfato é favorecido. As equações estequiométricas utilizadas para avaliar a metabolização do acetato pelas BRS (13) e pelas BPM (14) foram (Vossoughi *et al.*, 2003):



A fórmula $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ representa a biomassa resultante do processo. Após os modelamentos cinéticos e o cálculo estequiométrico do consumo de acetato pelas BRS e pelas BPM, foram feitos os ensaios para avaliar a influência da razão acetato/ SO_4^{2-} na competição entre estas bactérias, acompanhando-se, para isso, a relação entre o consumo de sulfato, a produção de H_2S e o consumo de acetato. A cultura II (mista) foi inoculada em dois sistemas, um em batelada, “serum bottles”, e outro contínuo, o “chemostat”, ambos utilizando os mesmos três valores para razão acetato/ SO_4^{2-} que foram: 0,66, 2,0 e 3,33mg/mg (Bhattacharya *et al.*, 1995).

O sistema “serum bottles” apresentava duas concentrações de acetato: (1) 250mg/L com razões de acetato/ SO_4^{2-} iguais a 0,66, 2,0 e 3,33mg/mg e (2) 100mg/L com as mesmas razões acetato/ SO_4^{2-} . A porcentagem de acetato consumida pelas BRS era calculada com base nas concentrações medidas de sulfato e acetato (equação 13). Considerava-se que o restante de acetato era utilizado pelas BPM. No sistema “chemostat”, três reatores de 2L, com tempo de retenção de 10 dias, foram usados para determinar o efeito das três

razões de acetato/SO₄²⁻ na competição entre BRS e BPM. Cada “chemostat” continha 1,5L da cultura II. Para valores de acetato/SO₄²⁻ iguais a 0,67mg/mg, o consumo de acetato pelas BRS atingiu seu ponto máximo tanto em “serum bottles” (40%) quanto em “chemostat” (71%) (Bhattacharya *et al.*, 1995).

Quando o valor da razão acetato/SO₄²⁻ aumentava para 3,33 o consumo de acetato pelas BRS era de apenas 15% em “serum bottles” e 4% em “chemostat”. Isto equívale a dizer que, por terem maior afinidade pelo acetato, as bactérias redutoras de sulfato prevalecem em ambientes com baixa concentração deste. Em condições naturais, a concentração de acetato tende a ser baixa o suficiente para favorecer a utilização deste substrato pelas redutoras de sulfato (Bhattacharya *et al.*, 1995).

Outro fator que influencia na competição entre as BRS e as BPM é o potencial redox. Por serem tolerantes ao oxigênio, as sulfato redutoras não necessitam de um ambiente redutor tão extremo quanto as BPM (Eh=-380mV). Esta tolerância deve-se a presença das enzimas superóxido dismutase, catalase e NADH oxidase que evitam danos celulares em condições aeróbias ou anóxicas (Bhattacharya *et al.*, 1995; Cypionka *et al.*, 1985). O estudo do potencial redox, enquanto fator determinante na competição entre BRS e BPM, baseou-se na utilização da cultura-estoque II (cultura mista) em duas condições distintas: -75mV e -175mV (Bhattacharya *et al.*, 1995).

Após os ensaios, observou-se que as BRS aumentavam o seu consumo tanto de acetato (19% para 35%) quanto o de sulfato (208mg/L para 345mg/L) quando o potencial redox (Eh) aumentava de -175mV para -75mV. Provavelmente, este fato deve-se mais à inibição das BPM em condições pouco redutoras do que propriamente pela maior atividade das BRS neste potencial redox (-75mV). Esta conclusão baseia-se em estudos anteriores que relatam valores de -100mV a -200mV (Ag/AgCl) como sendo uma faixa ótima de Eh para as BRS (Garcia *et al.*, 2001; Esteves, 1998). No final do estudo do potencial redox, observou-se, ainda, que a concentração total de sulfetos dissolvidos era de 80mg/L para -75mV e de 125mg/L para -175 mV, em um pH de 7,5 ± 0,3. Isto significa que os sulfetos são mais estáveis em condições mais redutoras (-175mV).

Considerando todos os estudos aqui relatados, pode-se concluir que vários fatores influenciam o metabolismo das BRS, entre eles: (1) o processo – contínuo ou em batelada; (2) a quantidade e a qualidade da matéria orgânica; (3) o pH; (4) a presença de suporte sólido para a formação de biofilme; (5) a concentração de H₂S; (6) a presença de outros aceptores de elétrons juntamente com o sulfato; e (7) o Eh. Tratando-se, especificamente, da redução do sulfato, pode-se dizer que esta está relacionada com a razão DQO/SO₄⁻² (DQO=Demanda Química de Oxigênio), com o pH e com o processo. A utilização das BRS para redução de sulfato requer um sistema contínuo, enquanto que para precipitação de metais pode ser usado um sistema em batelada. Porém, o uso da biorredução em um sistema de tratamento em larga escala requer o conhecimento prévio de questões de ordem prática, como exemplos: a composição química da água a ser tratada; as vazões do afluente e do efluente; da vazão do corpo d'água receptor; a cinética do processo; entre outros.

V. MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Amostra

A amostra de água utilizada foi proveniente do grupo de pesquisa do professor José Luiz Cortina da Universidade Técnica da Catalunha, que gentilmente a cedeu. Aproximadamente 250mL de água, contendo BRS, possibilitaram o início da pesquisa.

2 - Estudos de Base:

2.1 - Reator

O reator anaeróbio de batelada (Elliott *et al.*, 1998; Von Sperling, 1996; Christensen *et al.*, 1996) consistiu de um cilindro de PVC de 49cm de altura e 15cm de diâmetro, fechado na extremidade inferior e contendo uma tampa móvel na parte superior. Foi feito um orifício para saída de gás (H_2S , CO_2). A estrutura dispõe ainda de uma torneira localizada na parte inferior do reator (figura 1). O volume total foi igual a 7,75L e o volume útil 4,75L. A parte interna do reator encontra-se dividida em: (1) camada suporte, contendo esferas de vidro, de diâmetro médio de 1cm; (2) placa vazada de PVC; (3) duas camadas de fibra de vidro; (4) camada de areia de volume igual a 1,5L; (5) camada líquida contendo meio líquido.

Retirando-se a tampa do reator foram coletadas amostras da parte superior do mesmo com auxílio de uma pipeta de 50ml. As coletas de amostras da parte inferior do reator eram efetuadas pela torneira.

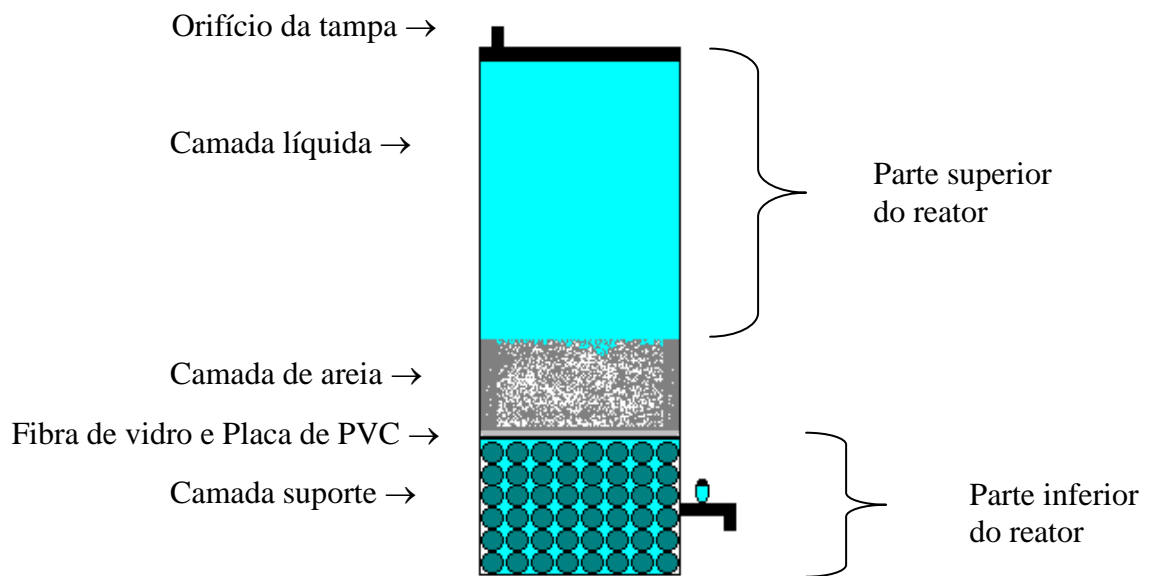


Figura 1 – Corte transversal do reator anaeróbico de batelada

Foi feita análise granulométrica da areia usando as peneiras da série Tyler. Para isto, foram pesados inicialmente 200g da mesma. O resultado obtido encontra-se na tabela 4:

Tabela 4- Distribuição granulométrica da amostra de areia – Série Tyler

Abertura (mm)	Massa retida (g)	% Retida
+1,20	0,00	-
-1,20 +0,85	0,04	0,02
-0,85 +0,71	0,30	0,15
-0,71 +0,42	6,49	3,24
-0,42 +0,30	53,30	26,65
-0,30 +0,21	82,60	41,3
-0,21 +0,15	46,83	23,42
-0,15 +0,10	8,71	4,36
-0,10 +0,053	1,65	0,82
-0,053	0,06	0,03
Total	199,98	99,99

Foi utilizado um termostato para estabilizar a temperatura da camada líquida em 33°C. Este termostato fazia circular água quente em uma serpentina ao redor do reator. Esta

serpentina possuía uma camada de isolamento térmico facilitando a manutenção e o controle da temperatura interna do reator (figuras 2 e 3).



Figura 2 – Reator anaeróbico de batelada.



Figura 3 – Visão superior do reator anaeróbico de batelada.

2.2 – Solução nutriente

O meio líquido utilizado no reator era composto por sulfato de sódio 5,74g/L e acetato de sódio 5,50g/L dissolvidos em água de torneira. Esta solução foi a base para preparação dos diferentes meios de cultivo utilizados no presente trabalho.

2.3 - Meios de cultura

A padronização do inóculo foi feita pela densidade óptica (DO) em 600nm (espectrofotômetro UV-Visível) estipulada em $0,09 \pm 0,01$ de absorvância, o que equiivale a um número mais provável (NMP) de bactérias próximo a 10^7 ufc/mL (unidade formadora de colônia por mL). Todos os meios de cultura e os materiais utilizados nos procedimentos foram autoclavados.

O meio fluido de tioglicolato é um meio rico em matéria orgânica, normalmente usado para crescimento de bactérias anaeróbias. Sua composição em g/L é:

Peptona de caseína.....	15,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
D-Glucose.....	5,5g
Cloreto de sódio.....	2,5g
L-Cistina.....	0,5g
Tioglicolato de sódio.....	0,5g
Ágar.....	1,0g
Resazurina certificada.....	0,001g

pH a 25°C: 7,0

O extrato de levedura é fonte de vitamina B, proteínas, combinações fosfóricas e cinzas favorecendo o crescimento de leveduras. A peptona de caseína contém nitrogênio orgânico (15%) e vitaminas. O tioglicolato de sódio e a resazurina são substâncias que favorecem o caráter redutor do meio (Pelczar, 1996).

Foram utilizados 30g do meio fluido de tioglicolato em pó para preparar 1L de solução. Após o preparo da solução, o meio era autoclavado e então utilizado. No estudo em questão, este meio foi usado em várias proporções diferentes, de acordo com o objetivo do ensaio.

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram:

- a) Meio tioglicolato 7,5% (v/v): solução de sulfato de sódio 5,74g/L e acetato de sódio 5,50g/L + 7,5% de meio fluido tioglicolato (v/v). Usado nos ensaios para verificação do efeito do pH no crescimento bacteriano.
- b) Meio tioglicolato 2% (v/v): solução de sulfato de sódio 5,74g/L e acetato de sódio 5,50g/L + 2% de meio fluido tioglicolato (v/v). Usado para padronizar o inóculo.
- c) Meio sólido: 50% da solução de sulfato de sódio 5,74g/L e acetato de sódio 5,50g/L + 50% de meio fluido tioglicolato (v/v) + 1,5% de ágar (m/v). Usado na identificação, contagem e manutenção de colônias;
- d) Meio mínimo: solução de sulfato de sódio 5,74g/L, acetato de sódio 5,50g/L, nitrato de sódio 1g/L e fosfato de potássio dibásico 1g/L. Simula condições encontradas em sedimentos permanentes (anaeróbios) de corpos d'água (Esteves, 1998).

O meio tioglicolato 2,0% (v/v) foi usado para crescimento de inóculo, em 24 horas. Isto porque, nestas condições, o crescimento bacteriano enquadrava-se no padrão de DO pré-estabelecido para inóculo. O meio tioglicolato 7,5% (v/v) foi usado como padrão para ensaios de pH por permitir um crescimento rápido das BRS e por apresentar uma DO de 24 horas superior a 0,200 de absorvância.

2.4 - Teste qualitativo de H₂S

O teste qualitativo de H₂S consistiu em colocar um papel de acetato de chumbo (Otto Bier, 1966) no orifício da parte superior do reator, de modo que o gás, ao sair, passe pelo papel. O papel de acetato de chumbo 0,2% é feito utilizando papel de filtro embebido em solução de acetato de chumbo 0,2%, secado à temperatura ambiente. Após a secagem, a presença de cor enegrecida no papel (PbS) é considerada como resultado positivo para H₂S.

2.5 - Contagem de bactérias

O crescimento bacteriano foi avaliado por: contagem direta em câmara de Neubauer, leitura de densidade óptica de 600nm em espectrofotômetro e número mais provável (NMP). O método de contagem direta fornece o número aproximado de bactérias por mL de meio de cultivo, enquanto a DO apenas detecta o aumento da turbidez do meio pela presença de sólidos suspensos, dando uma estimativa do crescimento bacteriano. O número mais provável (NMP) foi determinado após diluições seriadas, seguidas de inoculação em meio sólido. No presente trabalho, após incubação de 24 horas, a 33°C, em câmara de anaerobiose, contava-se as colônias da placa que continham de 30 a 300 colônias e multiplicava-se o valor encontrado pelo fator de diluição (Soares *et al.*, 1987); encontrando, assim, o número mais provável de bactérias por mL.

2.6 - Isolamento das BRS

Para o isolamento das BRS, 200µL de uma diluição 1×10^7 da amostra de água em estudo foram inoculados em um meio sólido contendo: 50% da solução de sulfato de sódio (5,74g/L) e acetato de sódio (5,50g/L), 50% de meio fluido tioglicolato (v/v) e 1,5% de ágar (m/v). Neste meio, identificou-se dois tipos diferentes de colônias: transparentes-irregulares (T.I.) e brancas-redondas (B.R.). A coloração de Gram foi utilizada para identificação dos tipos morfológicos destas colônias.

2.7 - Ensaio de pH

O efeito do pH sobre o crescimento bacteriano foi estudado utilizando o meio mínimo e o meio tioglicolato 7,5% (v/v) com o objetivo de avaliar o comportamento das BRS em condições ácidas. Para isto, preparava-se 5L de cada um dos meios de cultivo, dos quais retiravam-se alíquotas de 100mL. Estas alíquotas eram transferidas para erlenmeyers de 250mL e tinham o pH ajustado com padrões de ácido sulfúrico, cujas concentrações eram de 1:250 (v/v) e 1:50 (v/v). Após a alteração do pH, os meios eram autoclavados. O meio tioglicolato 7,5% (v/v) apresentou um pH original igual a 6,9. A faixa de pH trabalhada, para este meio, foi de 6,9 a 5,1, sendo os valores intermediários: (a) 6,6; (b) 6,3; (c) 6,1; (d) 5,9; (e) 5,7; (f) 5,5; e (g) 5,3. O meio mínimo foi naturalmente mais alcalino, apresentando um pH igual a 8,1. Para este meio, os valores de pH estudados foram: (a) 8,1; (b) 6,6; (c) 6,4; (d) 6,2; (e) 5,9; (f) 5,6; e (g) 5,3. Para cada um destes pH's, foram utilizados quatro frascos de 20mL, sendo que um era inoculado com 200µL de cultura mista, um com 200µL de isolado T.I, o terceiro com 200µL de isolado B.R. e o quarto era o controle negativo (não inoculado). As DO's dos inóculos estavam em torno de 0,08 de absorvância. Após 48 horas de incubação a 33°C, as DO's dos meios utilizados nos ensaios de pH eram lidas em espectrofotômetro. Os meios inoculados que apresentavam crescimento eram repetidos em triplicata. Os que não apresentavam crescimento, após 48 horas, eram incubados por até um mês antes de serem considerados inadequados para o crescimento das BRS.

2.8 - Dosagem de sulfato

O método utilizado para dosagem de sulfato foi o de precipitação com cloreto de bário, seguido de leitura em turbidímetro (Clesceri *et al.*, 1998). O consumo de sulfato das amostras inoculadas com BRS foi determinado pela diferença entre a concentração de sulfato dissolvido no branco (mesmo meio de cultura das amostras, porém não inoculado) e as concentrações de sulfato dissolvido encontradas nas amostras. A porcentagem de consumo de sulfato foi determinada a partir da média de consumo de sulfato das amostras, que foram preparadas em triplicata, para cada pH, nos meios

mínimo e 7,5% de tioglicolato (v/v). O desvio padrão e o coeficiente de variação do método turbidimétrico para amostras com uma concentração média de 7,45mg de SO_4^{-2} /mL são, respectivamente, de 0,13mg/L e 1,7%. Duas amostras, com a mesma concentração de sulfato (7,45mg de SO_4^{-2} /mL), apresentam, neste método, uma recuperação de 85% e 91%.

2.9 - Análise quantitativa de H_2S

A análise quantitativa de H_2S foi feita utilizando o Método Iodométrico (Clesceri *et al.*, 1998). O objetivo desta dosagem foi estimar a quantidade de H_2S do reator anaeróbio de batelada durante a fase “estável” do processo, ou seja, após o término da fase log. A presença deste gás era inquestionável devido ao cheiro característico do mesmo. A quantificação foi feita em triplicata e com uma diferença de 15 dias de um teste para o outro.

2.10 – Determinação de Eh e pH

As medidas de Eh e pH foram realizadas utilizando o aparelho HI 9622 microcomputer pHmeter, Hanna instruments. Sendo o eletrodo de referência do tipo Ag/AgCl para as medidas de Eh.

2.11 - Teste da catalase

Catalase é a enzima que catalisa a reação:



O teste da catalase consiste em colocar em uma lâmina de vidro uma gota de água oxigenada 10 volumes em contato com um raspado de colônia. Para obter o raspado de colônia basta utilizar uma alça de platina. Quando o resultado é positivo, ocorre liberação de bolhas de oxigênio.

2.12 - Série bioquímica

Uma série de tubos contendo tipos diferentes de meios de cultura foi inoculada com auxílio de uma alça de platina. Após incubação por 48 horas, a 33°C, verificou-se as alterações de cor, turbidez e/ou produção de gás nos tubos. Os meios utilizados foram o citrato, a lactose, a glicose e a uréia. O citrato, a lactose e a glicose são fontes de carbono e a uréia é fonte de nitrogênio. O consumo de citrato é considerado positivo quando o meio passa de verde para azul. Lactose e Glicose positivas passam de vermelho para amarelo. E no caso da glicose, ainda pode ser verificada a produção ou não de gás. O meio contendo uréia, quando positivo, muda de amarelo para vermelho.

3 - Aplicação dos Estudos de Base:

3.1 - Preparação do meio mínimo com metal

Para evitar a precipitação dos metais dissolvidos em meio mínimo, foi necessário fazer modificações tanto na composição do meio original, tanto na forma de preparo. O K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico) foi substituído pelo KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico). Soluções de acetato na concentração de 4g/L, em água destilada, apresentam pH em torno de 8,0, o qual teve que ser corrigido para 6,0 com adição de ácido sulfúrico concentrado. O objetivo desta acidificação foi evitar a precipitação instantânea dos metais durante a mistura de sais. Verificou-se que, mesmo em pH 6,0, o aquecimento do meio mínimo contendo os metais dissolvidos causava a precipitação dos mesmos. Por isso, os sais metálicos $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$ e $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ eram dissolvidos em volumes de água destilada em torno de 1/20 do volume final do meio, de modo que para 1100mL de solução utilizava-se 55mL de água destilada para dissolver cada sal. O metal dissolvido e o meio mínimo eram autoclavados separadamente. A mistura do sal metálico com o meio mínimo era realizada após o resfriamento. Como resultado, tinha-se quatro misturas distintas, denominadas Mn, Cu, Zn e Cd de acordo com o sal metálico de origem. No caso do Cu^{+2} e do Zn^{+2} , a concentração conseguida para ambos os metais, em pH 6,0,

foi de 4,0mg/L. O Mn^{+2} e o Cd^{+2} apresentavam concentrações iniciais de 19,9 mg/L e 19,5 mg/L, respectivamente. As análises dos metais foram feitas em espectrofotômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer, modelo Aanalyst 100.

3.2 - Ensaios no reator anaeróbio de batelada

Nos ensaios realizados no reator, utilizou-se uma água de efluente de indústria metalúrgica com 7,7g/L de sulfato, 37,5 mg/L de manganês, pH inicial 8,0 e rica em matéria orgânica. A matéria orgânica era proveniente da presença de esterco de vaca, feno, serragem e bagaço de cana utilizados no processo de tratamento passivo industrial. Em laboratório, antes de serem feitas as análises de sulfato, manganês e pH, a amostra de água industrial foi autoclavada e filtrada para retirar os sólidos suspensos e evitar possíveis contaminações por microrganismos. A filtração foi realizada em etapas, utilizando primeiro um papel de filtro quantitativo faixa azul (JP42 Quanty) e, posteriormente, em membrana de celulose de 0,22 μ m. Antes de ser adicionada ao reator, a água ainda teve o seu pH ajustado para 6,6. Para um volume de água igual a 4,75L, que representa o volume útil do reator, foi utilizado 50mL de inóculo de BRS contendo 10^7 células/mL (NMP).

3.3 - Ensaios em frascos âmbar, sem adição de areia

Foram realizados dois tipos de ensaio: um utilizando, separadamente, os metais manganês (20mg/L) e cádmio (20mg/L) em meio tioglicolato 2% (v/v) e pH igual a 5,5; e outro usando os mesmos metais, também separadamente, em meio mínimo, sem o meio tioglicolato e com pH 6,2. Em ambos os casos, os meios foram envasados em frascos de vidro âmbar de 1L de modo que o líquido ocupasse 98% do volume disponível de cada frasco. Todo o material utilizado era autoclavado. Os meios contendo manganês e cádmio, com ou sem tioglicolato, eram inoculados com 2mL de BRS, 10^7 células/mL (NMP). O objetivo era verificar se, nestas condições, as BRS eram capazes de crescer e de precipitar os metais. Quatro frascos estéreis de 100mL com

tampa foram utilizados para armazenar os meios sem inóculo, ou seja, os controles negativos.

3.4 - Ensaio em frasco âmbar, com areia

O procedimento utilizado foi semelhante ao dos ensaios descritos no ítem 3.3. Porém, foram adicionados 200g de areia no frasco de 1L e 20g no frasco de 100mL antes de completá-los com meio mínimo contendo manganês (20mg/L).

3.5 - Ensaios em frascos âmbar de 100mL, com areia

Foram também realizados ensaios em frascos de vidro de 100mL, com tampa. Pois, nestes frascos, os experimentos apresentavam os primeiros resultados com um tempo de incubação de 5 dias, enquanto que nos frascos de 1000mL os mesmos eram obtidos após um mês de incubação. Foram utilizados, ao todo, oito frascos: quatro frascos de 100mL para ensaios com o manganês e quatro frascos para ensaios com o cádmio; sendo que, dos quatro, um era usado como controle negativo e os outros três eram inoculados com 200µL de BRS. Os inóculos de BRS continham $4,2 \times 10^7$ células/mL (contagem direta em câmara de Neubauer). Aproximadamente 20g de areia foram envasadas em cada frasco de 100mL. O volume destes frascos foi preenchido com os meios até completar 98% do total. As concentrações de manganês e de cádmio eram de 20mg/L em meio mínimo. Foram preparados 500mL de meio para cada metal e o pH inicial destes meios foi ajustado, com ácido sulfúrico concentrado, para 6,2. As condições de trabalho não eram estéreis.

3.6 - Diagramas EhxpH

Os diagramas foram construídos utilizando o programa HSC chemistry versão 4.1. Os dados termodinâmicos foram calculados para os sulfatos e carbonatos a partir das constantes de equilíbrio do programa NIST *critically selected stability constants of metals complexes versão 7.0*. O valor das constantes de equilíbrio, escolhido para as

reações, era o que correspondia ao valor da força iônica mais próximo ao calculado para o meio mínimo ($I=0,17$). Outros dados termodinâmicos foram provenientes do programa HSC.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Primeira etapa dos ensaios no reator de batelada

Esta etapa objetivava confirmar a presença de BRS na amostra, através do acompanhamento dos parâmetros de atividade das mesmas, assim como, testar a eficiência do recipiente utilizado como reator. Dentre os parâmetros de atividade das BRS foram avaliados o Eh, o pH, a concentração de sulfato e a produção de H₂S (g). Verificou-se que condições redutoras (Eh = -150mV a -290mV) e pH ácido favorecem a liberação de H₂S (g) para atmosfera. De acordo com o sistema S-H₂O (Silva e Leão, 1999), o H₂S é a forma predominante em pH<7 e Eh<0. O cheiro deste gás começa a ser percebido em pH próximo a 6,5 e com a acidificação do meio a intensidade aumenta. O teste qualitativo de H₂S, usando “papel de chumbo”, confirmou a volatilização do H₂S, em pH ácido. A presença de ácido sulfídrico é indicativo de redução de sulfato pelas BRS. Com relação ao sulfato, verificou-se que sua redução no reator, em pH 7,2, foi de aproximadamente 20%, em 10 dias e houve alcalinização do meio, uma vez que, o pH aumentou de 7,2 para 7,8.

O biorreator, numa primeira etapa de ensaios, funcionou como simulador de uma condição hipotética onde a “água residuária”, ou seja, o meio sintético pobre em nutrientes, continha elevados teores de sulfato (4g/L), Eh igual a -150mV, pH 7,5 e temperatura de 33°C. Esta simulação permitiu a constatação de que a amostra continha BRS, além de fornecer dados preliminares sobre estas bactérias. A estrutura do reator facilitou a coleta de amostras para dosagem de sulfato, que é o principal parâmetro químico de avaliação destes microrganismos, ou seja, para serem classificadas como BRS, é necessário que haja redução de sulfato no meio. Verificou-se que as amostras retiradas da parte inferior do reator eram límpidas apesar da turbidez da camada superior. A camada de areia, juntamente, com a malha de fibra de vidro funcionaram como um filtro retendo os sólidos suspensos. Comparando-se a granulometria da areia com o tamanho médio das BRS (1,5 µm), especulou-se que estes microrganismos eram retidos por formarem filamentos (cadeias lineares). Este fato foi confirmado ao repicar,

em meio sólido, 200µL de uma amostra líquida (turva), retirada próxima a camada de areia da parte superior do reator. As colônias cresceram em forma de filamentos (figura 4).



Figura 4 – Crescimento das BRS em meio sólido formando filamentos; coletadas do biorreator anaeróbio de batelada.

2. Isolamento e caracterização das BRS

As BRS formam um grupo de procariontes muito diversificado, podendo ser dividido em quatro subgrupos, de acordo com a sequência de 16S - rRNA: (1) BRS Gram-negativas mesófilas; (2) BRS Gram-positivas formadoras de esporos; (3) BRS termófilas; e, (4) Arqueobactérias termófilas. Uma característica inerente ao grupo é a capacidade de utilizar o sulfato como acceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbia (Castro *et al.*, 2000). Para uma classificação tradicional, várias características fisiológicas são avaliadas, entre elas: a morfologia celular, a motilidade, a oxidação completa ou incompleta do acetato, etc (tabela 5). A classificação das BRS do presente trabalho foi baseada na classificação de Castro *et al.* (2000).

Tabela 5 - Características importantes para classificação das bactérias redutoras de sulfato (Castro *et al.*, 2000).

	Formato	Oxidação de Acetato	Temperatura de crescimento (°C)	Motilidade
BRS Gram-negativa mesófila				
<i>Desulfobulbus</i>	Limão-bastão	incompleta	25-40	-/+
<i>Desulfomicrobium</i>	Oval-bastão	incompleta	25-40	+/-
<i>Desulfomonas</i>	Bastão	incompleta	30-40	-
<i>Desulfovibrio</i>	Espiral-vírgula	incompleta	25-40	+
<i>Desulfobacter</i>	Oval-bastão	completa	20-33	+/-
<i>Desulfobacterium</i>	Oval-bastão	completa	20-35	+/-
<i>Desulfococcus</i>	Esférico-limão	completa	28-35	-/+
<i>Desulfomonile</i>	Bastão	completa	37	-
<i>Desulfonema</i>	Filamento	completa	28-32	Planar
<i>Desulfosarcina</i>	Bastão ovalados ou cocos, agrupados	completa	33	+/-
BRS Gram-positiva formadora de esporo				
<i>Desulfotomaculum</i>	Bastão reto a curvado	incompleta/ completa	Maioria 25-40, algumas 40-65	+
BRS termófila				
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Vírgula-bastão	incompleta	65-70	-/+
Arqueobactéria redutora de sulfato				
<i>Archaeoglobus</i>	Coco	incompleta	64-92	+/-

Segundo Castro *et al.* (2000), as BRS Gram-negativas podem ser subdivididas em duas famílias: Desulfovibrionaceae e Desulfobacteriaceae. A primeira família inclui os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*. A família Desulfobacteriaceae inclui os gêneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*,

Desulfosarcina, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfobotulus* e *Desulfoarculus*. O principal gênero que compõe as BRS Gram-positivas formadoras de esporos é o *Desulfotomaculum*, sendo que algumas espécies deste gênero são termófilas. As bactérias deste gênero apresentam formato de bastão, porém os esporos têm a forma de cocos. A presença de subgrupos de BRS Gram positivas e Gram negativas foi relatada por Okabe *et al.* (2003), por Castro *et al.* (2000), por Widdel (1988), entre outros. A tolerância ao oxigênio, em maior ou em menor grau, é relatada em todos os subgrupos das BRS, que são classificadas como anaeróbias (Fareleira *et al.*, 2003; Dilling e Cypionka, 1990; Cypionka *et al.*, 1985).

O isolamento das BRS foi feito em meio sólido e apresentou dois tipos de colônias, uma transparente e irregular (isolado T.I) e outra branca e redonda (isolado B.R). A realização da Coloração de Gram demonstrou a presença de cocos Gram positivos (B.R.).(figura 5) e de bastonetes Gram negativos (T.I.) (figura 6).

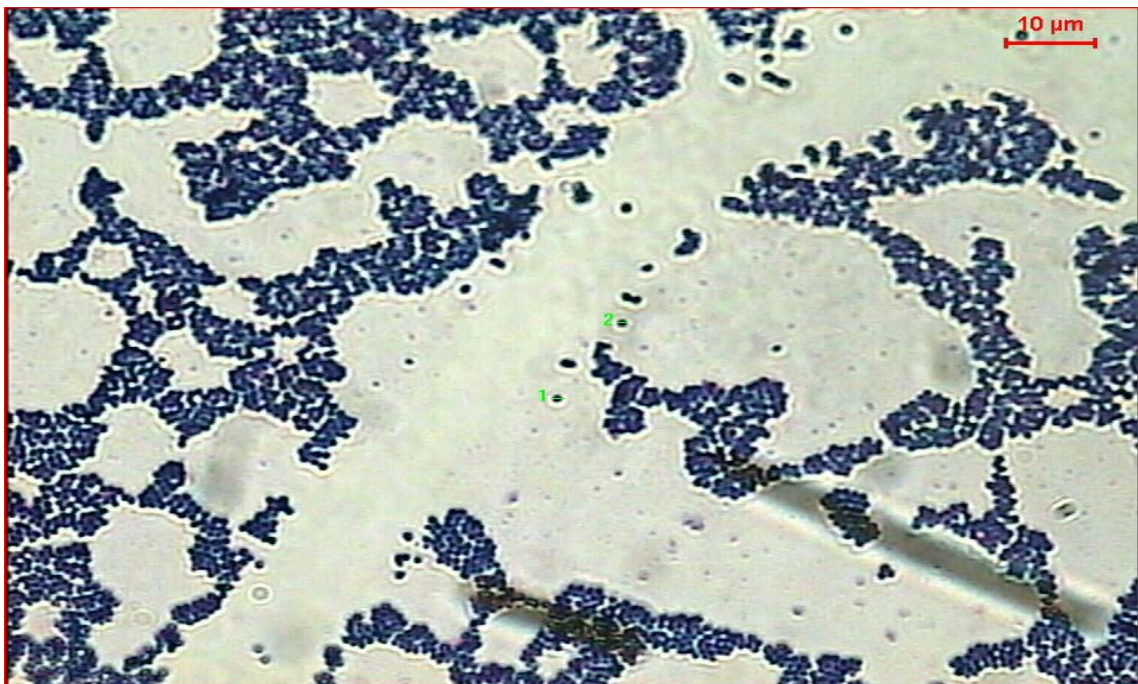


Figura 5 – Isolados B.R., forma de cocos e coloração de Gram positiva.

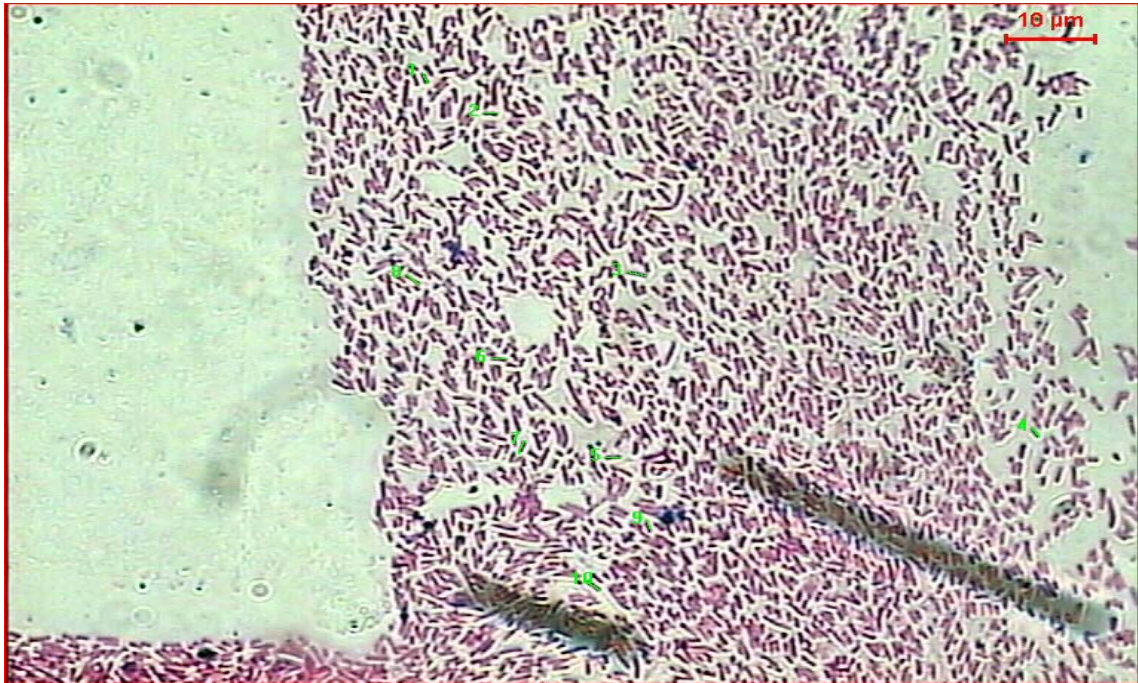


Figura 6 - Isolados T.I., forma de bastonetes e coloração de Gram negativa.

Após o isolamento, foi feita a caracterização, usando meios líquidos contendo sulfato e testes bioquímicos. Tanto os bastonetes quanto os cocos foram submetidos a testes da série bioquímica de utilização do citrato, da lactose e da glicose como fontes de carbono, e da uréia como fonte de nitrogênio; teste de motilidade em meio SIM e, ainda, ao teste da catalase. Os bastonetes Gram negativos (isolados T.I.) e os cocos Gram positivos (isolados B.R.) foram capazes de utilizar as três fontes de carbono e não se mostraram capazes de utilizar a uréia como fonte de nitrogênio. Ambas as amostras responderam negativamente ao teste de motilidade e positivamente quanto à presença de catalase. É interessante notar que o fato dos isolados possuírem a enzima ativa catalase lhes confere tolerância ao oxigênio, possibilitando, assim o seu cultivo em sistemas com baixa pressão de O_2 dispensando a necessidade da construção de reatores estritamente anaeróbia. Os ensaios em meio líquido contendo sulfato confirmaram que as bactérias isoladas utilizaram o sulfato como acceptor final de elétrons e produzindo ácido sulfídrico como produto final. A emissão de H_2S foi facilmente percebida em vista do odor característico deste gás.

Ensaio realizados com os isolados B.R. e T.I. confirmaram a presença da catalase em ambos os casos, justificando a tolerância ao oxigênio. O uso de citrato, lactose e glicose pelas BRS, Gram positivas e Gram negativas, confirma a capacidade de utilização de vários tipos de doadores de elétrons (tabela 6). As bactérias Gram-positivas da amostra cresceram em meio mínimo, o que indica que estas BRS foram capazes de utilizar o acetato como única fonte de carbono, ou seja, realizaram oxidação completa do acetato a CO₂. Entretanto, as BRS Gram-negativas não cresceram neste meio. A identificação destes microrganismos requer uma etapa de seqüenciamento genético que será objetivo de trabalhos futuros.

Tabela 6 – Resultados da caracterização morfológica e bioquímica dos isolados T.I. (Gram-negativas) e B.R. (Gram-positivas) da amostra.

Formato	Oxidação de acetato	Temperatura de crescimento (°C)	Motilidade em meio SIM	Citrato	Lactose	Glicose	Uréia	Catalase	Sulfato
Bastão (T.I.)	incompleta	33	negativa	+	+	+	-	+	+
Cocos (B.R.)	completa	33	negativa	+	+	+	-	+	+

Dando seqüência à etapa de caracterização dos isolados T.I. e B.R., foi estudado o efeito do pH no crescimento destes microrganismos, utilizando, para isto, o meio tioglicolato 7,5% (v/v). Com estes ensaios foi possível demonstrar que a eficiência da redução de sulfato está intimamente ligada ao pH. Os meios moderadamente ácidos apresentaram maior consumo de sulfato do que os meios com pH próximo à neutralidade; apesar do crescimento das bactérias ter diminuído (tabelas 7, 8 e 9). É importante observar nas figuras 7, 8 e 9: (1) a relação entre as DO's médias de 48 horas, da cultura mista e dos isolados T.I e B.R; e (2) as porcentagens médias de consumo de sulfato nos respectivos pH's.

Tabela 7 – Crescimento das BRS e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.

pH	DO 48h da cultura mista	Consumo médio de sulfato em g/L
6,9	0,96	0,00
6,1	0,60	0,27
5,9	0,33	0,40
5,7	0,11	0,04
5,3	0,00	0,00

Condições: Inóculo de cultura mista em meio tioglicolato 7.5% (v/v).

Tabela 8 – Crescimento do isolado T.I. e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.

pH	DO 48h do isolado T.I.	Consumo médio de sulfato em g/L
6,9	0,92	0,00
6,1	0,50	0,27
5,9	0,34	0,53
5,7	0,12	0,05
5,3	0,00	0,00

Condições: Inóculo do isolado T.I. em meio tioglicolato 7.5% (v/v).

Tabela 9 – Crescimento dos isolados B.R. e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.

pH	DO 48h do isolado B.R.	Consumo médio de sulfato em g/L
6,9	0,70	0,13
6,1	0,55	0,27
5,9	0,24	0,53
5,7	0,16	0,09
5,3	0,00	0,00

Condições: Inóculo do isolado B.R. em meio tioglicolato 7.5% (v/v).

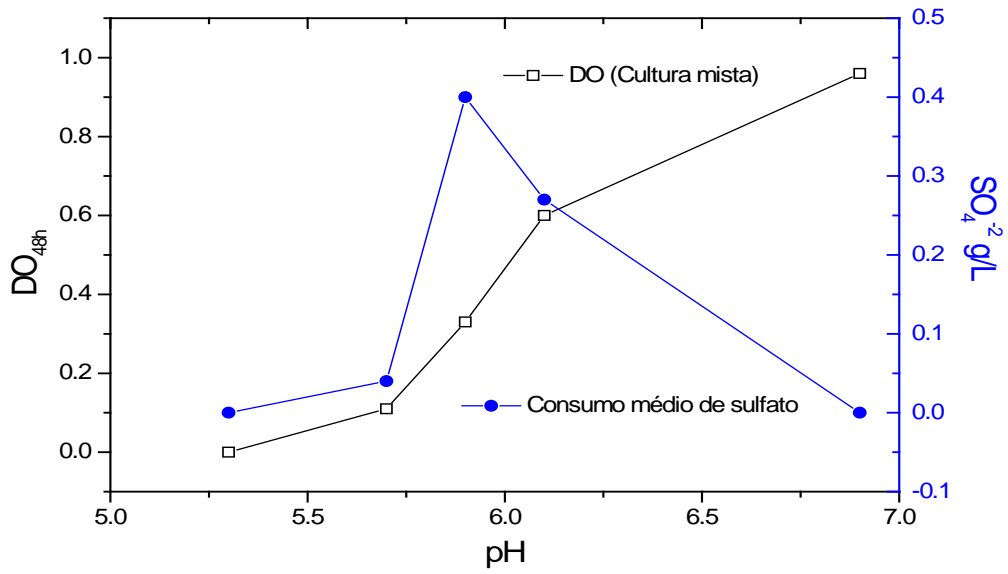


Figura 7 - Crescimento da cultura mista (DO de 48 horas) e consumo médio de sulfato em função do pH, em meio tioglicolato 7,5% (v/v).

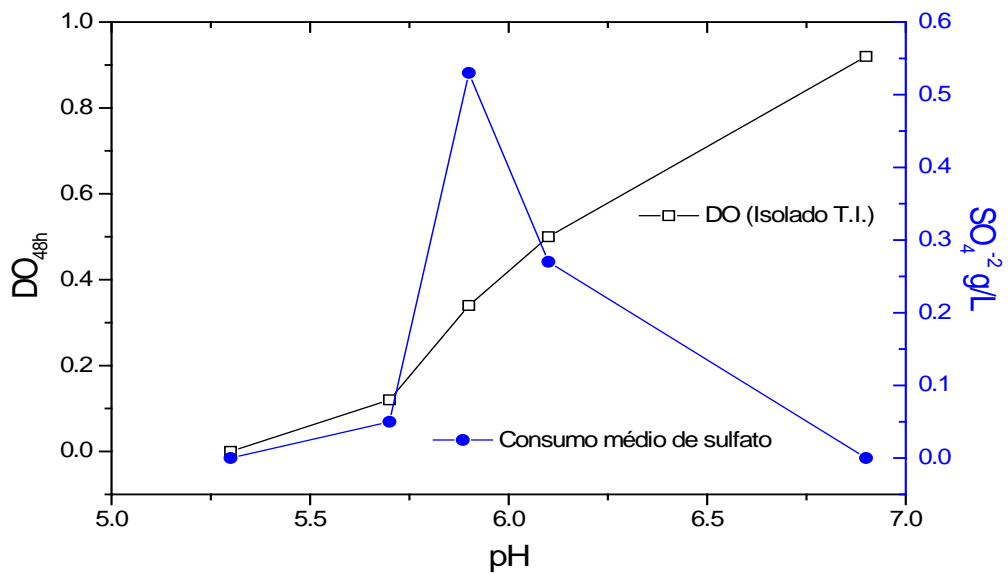


Figura 8 - Crescimento dos isolados T.I (DO de 48 horas) e consumo médio de sulfato em função do pH, em meio tioglicolato 7,5% (v/v).

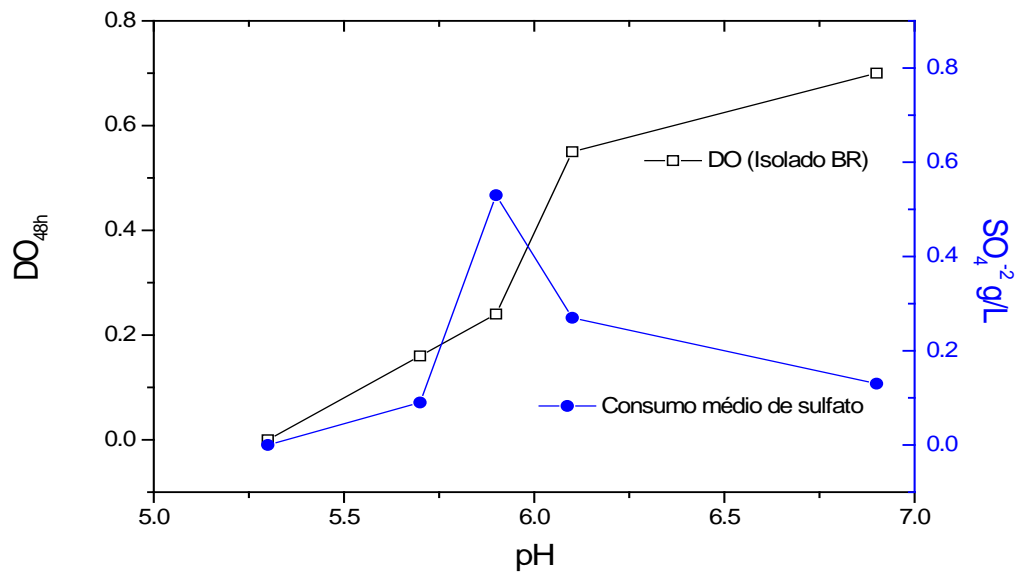


Figura 9 - Crescimento dos isolados B.R. (DO de 48 horas) e consumo médio de sulfato em função do pH, em meio tioglicolato 7,5% (v/v).

É possível notar nas figuras 7, 8, e 9 que o crescimento das BRS foi maior em pH 6,9. Porém, o ponto máximo do crescimento destas bactérias não coincide com o ponto de maior consumo de sulfato. No meio tioglicolato 7,5% (v/v), o pH ótimo para redução de sulfato foi 5,9. Isto porque, o meio rico em matéria orgânica favorece o uso de outras vias de liberação de energia, dificultando a redução do sulfato (Lens *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 1996; Von Sperling, 1996). Porém, em condições limite (stress) as BRS são “forçadas” a utilizar este acceptor de elétrons. Neste caso, o pH foi o fator limitante do crescimento bacteriano e o fator “estimulante” (condição limite) do consumo de sulfato. Os ensaios de pH foram realizados em meio fluido de tioglicolato e em meio mínimo. Sendo que o meio tioglicolato é um meio rico em matéria orgânica e pode ser usado para crescimento de bactérias anaeróbias. A proporção deste meio fluido, em solução de sulfato-acetato (1:1), variou com o objetivo de aumentar ou diminuir o tempo de crescimento e a concentração celular. Ou seja, para uma proporção de tioglicolato igual a 7,5% (v/v), mantendo o pH original da mistura (6,9), a DO de 24 horas foi em média 0,200 enquanto para proporção de 2,0% (v/v) a média da DO de 24

horas foi 0,080. Isto facilitou a observação das variações no crescimento por alteração do pH. Esta observação permite salientar a influência da acidez sobre o número de bactérias e sobre o consumo de sulfato. Garcia *et al.* (2001) estudando um sistema contínuo real, citaram que as análises da concentração de sulfato, em pH 7, demonstraram um consumo de 85% (redução do teor de sulfato de 9000mg/L para 1350mg/L) de sulfato em 27 dias, enquanto que, em pH 5, o mesmo consumo ocorreu em 9 dias. Paralelamente à redução de sulfato, observou-se a alcalinização do pH para um valor igual a 8,2 e a diminuição do Eh para -250mV (Garcia *et al.*, 2001).

O tempo de residência de 48 horas é aplicável em sistemas reais e é um fator importante na redução de sulfato, pois o processo anaeróbico, por gerar menos energia, é sempre mais lento que o processo aeróbico. O pH é um dos fatores limitantes mais importantes no que se refere ao crescimento das BRS (Elliott *et al.*, 1998; Küsel *et al.*, 2001; White *et al.*, 1997). O crescimento das BRS foi acompanhado dentro de uma faixa de pH que variou de 6,9 a 5,1 em meio tioglicolato 7,5% (v/v), utilizando-se inóculos de cultura mista e de isolados T.I. e B.R. O pH 5,3 foi o limite de acidez que as BRS Gram negativas suportaram, nas condições experimentais do presente trabalho. As reductoras de sulfato mais resistentes são as Gram positivas, crescendo em meio tioglicolato 7,5% (v/v) com pH igual a 5,3 (após um mês de incubação) e em meio mínimo com pH igual a 6,2.

3. Meio mínimo e caracterização das BRS

Todo ser vivo necessita de alguns elementos que são essenciais para o metabolismo celular. Entre estes elementos estão o carbono, o oxigênio, o nitrogênio, o hidrogênio, o fósforo e o enxofre. No caso dos microrganismos cultivados “in vitro”, estes elementos devem ser fornecidos pelo meio de cultivo. Desta forma, para elaborar um meio de cultivo faz-se necessário que se considere o metabolismo celular. Além disto, deve-se considerar as condições naturais em que o microrganismo desenvolve-se. Isto porque os elementos essenciais podem ser encontrados como constituintes de várias substâncias diferentes de acordo com o ambiente onde estão. No caso das BRS, por exemplo, elas

podem ser encontradas na camada permanente (profunda) do leito dos rios. Este ambiente apresenta características redutoras, contém pouca matéria orgânica - que, normalmente, encontra-se em processo final de decomposição - e apresenta os elementos nitrogênio, fósforo e enxofre na forma de sais inorgânicos - nitratos, ortofosfatos e sulfatos. Com base nestes conhecimentos, entre outros, foi elaborado um meio de cultivo para o crescimento das BRS "in vitro". Este meio foi denominado "meio mínimo" por conter, basicamente, os elementos essenciais para o metabolismo biológico, ou seja, fosfato (HPO_4^{-2}), nitrato, acetato e sulfato, em solução aquosa. Os ortofosfatos (PO_4^{-3} , HPO_4^{-2} , H_2PO_4^- , H_3PO_4), são fontes de fósforo prontamente disponíveis para o metabolismo biológico, sendo o HPO_4^{-2} mais comum no meio ambiente em pH próximo à neutralidade (Von Sperling, 1996). O acetato é uma fonte de carbono, encontrado em condições anaeróbias, ou seja, em processo final de decomposição da matéria orgânica e o nitrato é uma fonte de nitrogênio, presente em condições anóxicas (Eh variando de +50 a -50mV). Já o sulfato atua como acceptor final de elétrons na respiração anaeróbia das BRS (Lens *et al.*, 1998).

O grupo das BRS, como um todo, é capaz de utilizar um grande número de substâncias doadoras de elétrons, entre elas: acetato, anilina, succinato, catecol, etanol, fenol, acetona, propionato, lactato, etc. Porém, para compor o meio mínimo, optou-se pela escolha de apenas um doador de elétrons, o acetato. Isto porque, as BRS ficam subdivididas em dois subgrupos de acordo com o consumo ou não desta substância: as que realizam oxidação completa a CO_2 e as que realizam oxidação incompleta a acetato. Esta diferenciação em subgrupos facilitou a caracterização das BRS isoladas da amostra. Ou seja, o meio mínimo tornou-se seletivo para bactérias capazes de utilizar o acetato como única fonte de carbono.

O uso de sulfato como acceptor final de elétrons é inerente às bactérias redutoras de sulfato durante o processo de respiração anaeróbia. Porém, o meio de cultivo e as condições ambientais precisam ser favoráveis à redução do sulfato. Assim sendo, outro ponto avaliado foi a relação entre a concentração de sulfato e a concentração de nitrato. O uso do sulfato em uma concentração de aproximadamente 4g/L baseou-se na

definição de água ácida. Considera-se uma água ácida quando a concentração de sulfato é maior que 3000mg/L, entre outras características (Sengupta, 1993; Abrahão e Mello, 2003). Além disto, quanto mais elevada for a concentração deste ânion, maior a chance de ocorrer a redução do mesmo, pois, quando vários aceptores de elétrons estão disponíveis no mesmo ambiente, o sistema utiliza aquele que produz mais energia (oxigênio, nitrato, etc). E enquanto houver substâncias de maior liberação de energia, as que liberam menos energia não serão utilizadas (Von Sperling, 1996).

O sulfato é um dos aceptores de elétrons que menos libera energia e as BRS são capazes de utilizar o nitrato (Christensen *et al.*, 1996; Lens *et al.*, 1998; Tuppurainen *et al.*, 2002; Okabe *et al.*, 2003). Assim sendo, a composição do meio mínimo apresenta uma concentração de sulfato quase 6 vezes maior que a de nitrato. Christensen *et al.* (1996), estudando a remediação de águas ácidas em presença de BRS, observaram que a concentração de fosfato dos reatores anaeróbios em batelada, contendo soro de leite, permaneceu relativamente elevada no final dos ensaios, enquanto o nitrato apresentou concentrações inferiores a 0,1mg/L, durante todo o período de incubação. Este experimento exemplifica a capacidade de redução de nitrato pelas BRS e demonstra que o fosfato não interfere na redução de sulfato.

O meio mínimo simula as condições encontradas em sedimentos permanentes, anaeróbios, de corpos d'águas (Fortin *et al.*, 2000; Sass *et al.*, 2002). E foi utilizado por proporcionar condições seletivas às BRS, pois, em ambiente não estéril, ácido e com temperatura ambiente, o meio tioglicolato favorece o crescimento de leveduras. O meio mínimo foi testado em pH de 8,1 a 5,3 – sendo que o primeiro representa o pH normal da solução e o último foi o pH mais ácido em que verificou-se o crescimento das BRS, em questão. A tabela 10 e a figura 10 apresentam o crescimento bacteriano e o consumo de sulfato em função do pH, em meio mínimo. Neste meio, apenas as BRS Gram positivas apresentaram crescimento. Em função disto, no restante desta dissertação sempre que o meio em questão for o meio mínimo estará sendo feita referência aos isolados B.R.

Tabela 10 – Crescimento dos isolados B.R. (BRS Gram positivas) e consumo médio de sulfato em diferentes pH's.

pH	DO 48h do isolado B.R.	Consumo médio de sulfato em g/L
6,6	0,10	0,10
6,4	0,05	0,36
6,2	0,01	0,10
5,9	0,00	0,00

Condições: Meio Mínimo contendo solução de sulfato de sódio 5,74g/L, acetato de sódio 5,50g/L, nitrato de sódio 1g/L e fosfato de potássio dibásico 1g/L.

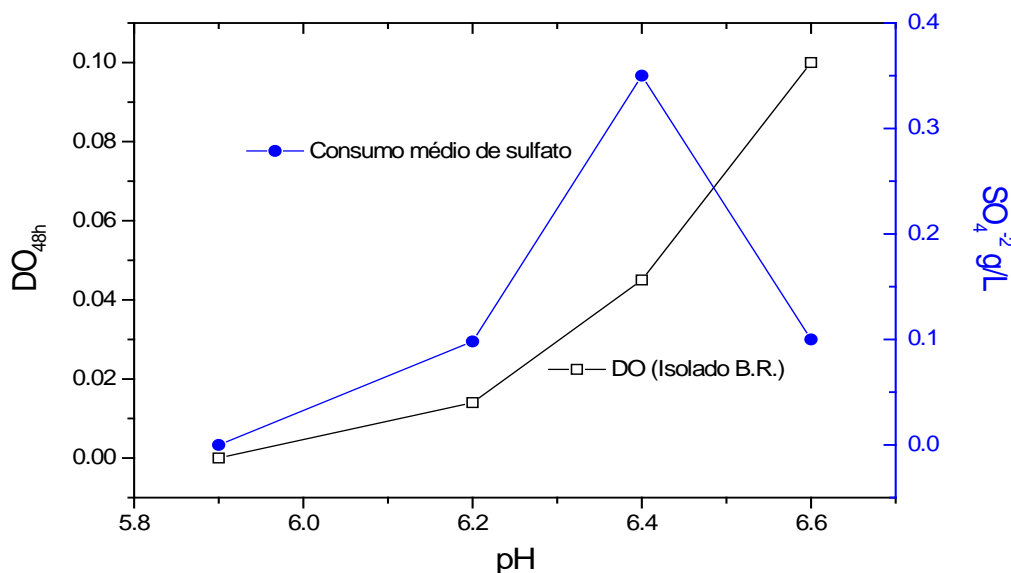


Figura 10 – Crescimento dos isolados B.R. em meio mínimo contendo solução de sulfato de sódio 5,74g/L, acetato de sódio 5,50g/L, nitrato de sódio 1g/L e fosfato de potássio dibásico 1g/L.

Comparando as figuras 9 e 10, nota-se semelhanças de comportamento dos isolados B.R. em meio mínimo e em meio tioglicolato 7,5% (v/v). Pois, em ambos os casos, o pH ótimo de consumo de sulfato não coincide com o máximo de crescimento. Porém, em meio mínimo, o maior valor de DO_{48h} , que indica o ponto máximo de crescimento

destas bactérias, foi sete vez menor que no meio tioglicolato 7,5% (v/v). E o pH ótimo para redução de sulfato foi 6,4. No caso do meio mínimo, que é composto, basicamente, de sais inorgânicos e acetato, o fato do pH ótimo de consumo de sulfato não coincidir com o máximo de crescimento das BRS, pode estar relacionado a presença de nitrato (aceptor de elétrons). Pois, segundo Von Sperling (1996), o nitrato é reduzido preferencialmente ao sulfato durante o processo de digestão anaeróbia. Porém, em condições “desfavoráveis”, ou seja, diante do stress causado pelo aumento da acidez de 6,6 para 6,4 estas bactérias realizam a função inerente ao grupo que é a redução do sulfato.

Foi feita uma curva de crescimento do isolado B.R. em meio mínimo com pH inicial 8,1 para avaliar o comportamento destes microrganismos neste meio sintético composto de sulfato de sódio 5,74g/L, acetato de sódio 5,50g/L, nitrato de sódio 1g/L e fosfato de potássio dibásico 1g/L (ver figura 11).

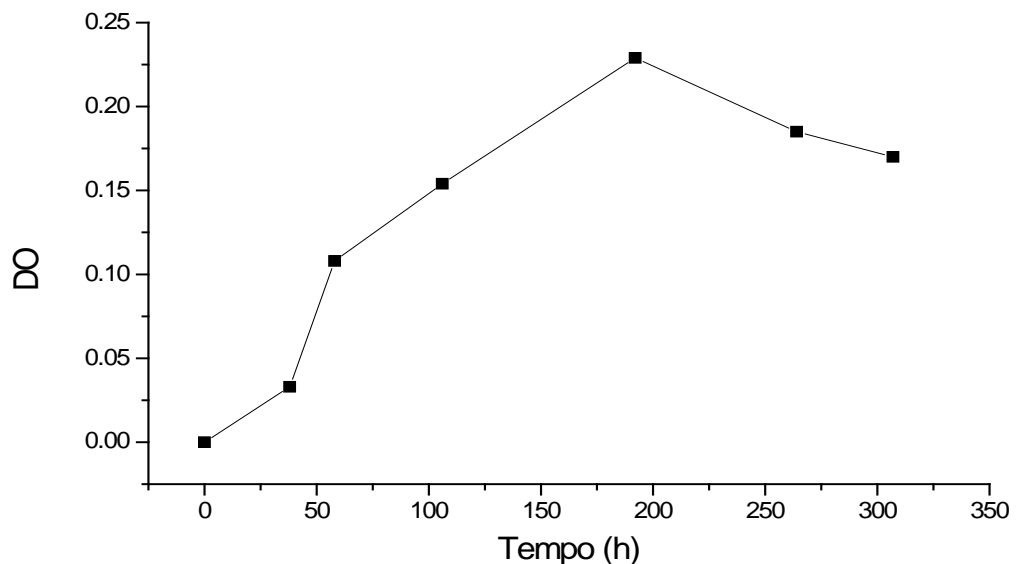


Figura 11 - Curva de crescimento do isolado B.R. (BRS Gram positiva) em meio mínimo (pH = 8,1).

Verificou-se que para o meio mínimo, sem alteração de pH, a fase lag durou 48 horas e que o decaimento bacteriano ocorreu após 200 horas. Estes dados serviram como referência para os ensaios em presença de metais.

4. Reator anaeróbio de batelada

O reator anaeróbio de batelada, descrito na figura 1 (ítem V, 2.1), baseou-se naqueles utilizados por Christensen *et al.* (1996). Estes últimos eram cilindros de acrílico transparente contendo três camadas cada um: duas de substrato sólido, composto de brita e de areia e uma camada superior de água de mina. Após a adição dos substratos e dos inóculos característicos de cada reator, os recipientes eram selados e incubados a 15°C, no escuro, durante 203 dias.

Os fatores considerados limitantes para o crescimento das BRS são o pH, o Eh e as concentrações de sulfato, de H₂S, de metais e de matéria orgânica (Garcia *et al.*, 2001). Dentre estes fatores, o pH, o Eh, a precipitação de metais e as concentrações de sulfato e de gás sulfídrico são, também, parâmetros de avaliação da atividade das BRS (Christensen *et al.*, 1996). No presente trabalho, o reator de 4,75L continha água de efluente industrial que apresentava as seguintes características: presença de matéria orgânica, com concentração de sulfato de 7,7g/L, pH 6,6 e concentração de manganês 37,5 mg/L. Estes três últimos parâmetros foram acompanhados para avaliar a eficiência das BRS no processo de tratamento de água no reator anaeróbio de batelada. O primeiro indício de crescimento das BRS no reator foi o cheiro característico do gás sulfídrico. Este cheiro de H₂S_(g) era facilmente percebido durante a coleta de amostras da parte inferior do reator, o que não acontecia na parte superior do mesmo.

Os processos anaeróbios ocorreram, inicialmente, na camada de areia e na parte inferior do reator, devido à menor concentração de oxigênio nestes locais e, também, pela presença de suporte sólido para formação do biofilme. A presença de substrato sólido no fundo dos cilindros é de vital importância para o tratamento das águas ácidas pelas BRS, em escala laboratorial. Pois, é na água intersticial da areia que ocorrem as primeiras

alterações químicas, como o aumento do pH e a precipitação de metal. Estes resultados estão em acordo com os relatos de Christensen *et al.* (1996).

Os experimentos de Christensen *et al.* (1996) servem como base para justificar os resultados obtidos nas amostras do reator anaeróbio de batelada. Observando a figura 12, é possível verificar que a precipitação do manganês ocorreu mais rapidamente na parte inferior do que na superior do reator. Isto porque, a atividade bacteriana teve início no fundo de areia do cilindro. Com o passar do tempo, o número de BRS aumenta (10^8 células/mL) e, conseqüentemente, a produção de H_2S também.

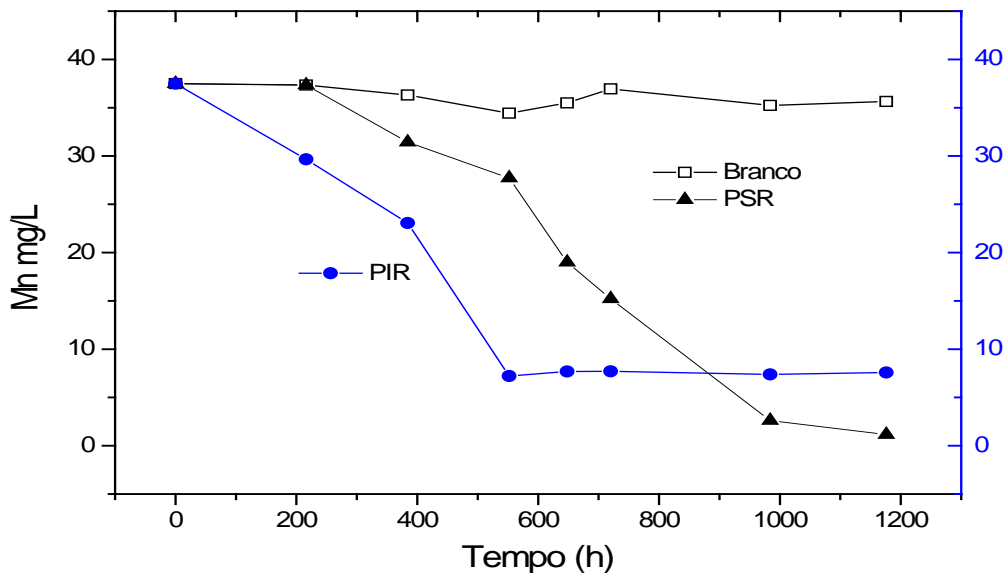
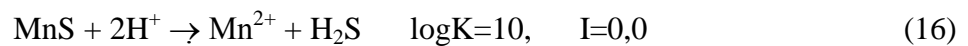


Figura 12 – Concentração do manganês dissolvido na parte superior do reator (PSR) e na parte inferior (PIR) do mesmo. Água de um efluente industrial contendo 37,5mg/L de manganês. Condições: Branco em aerobiose e temperatura ambiente. Reator, parte inferior e superior, em anaerobiose e temperatura de 33⁰C.

Concentração de H_2S igual ou superior a 40mg/L pode inibir a atividade das BRS. Porém, a concentração de sulfeto considerada tóxica para estas bactérias depende das espécies presentes, do grau de adaptação das bactérias e da composição orgânica e

inorgânica do meio (Burgess e Stuetz, 2002). A concentração de sulfeto solúvel presente na água intersticial da camada de esferas de vidro chegou a 90mg/L, na fase “estável” - entendendo fase estável como a fase após crescimento bacteriano (log). Este gás percola em direção às camadas superiores, propiciando uma precipitação de manganês posterior à observada na base.

A concentração de manganês na camada líquida superior do reator anaeróbio diminuiu de 37,5mg/L para 1,2mg/L, em 49 dias. Enquanto na camada contendo esferas de vidro, no mesmo período, a concentração deste metal diminuiu de 37,5mg/L para 7,5mg/L. A explicação para a diferença encontrada entre as concentrações finais de manganês na parte inferior do reator (7,5mg/L) quando comparada à parte superior (1,2mg/L) baseia-se na reação:



É possível calcular, para esta reação (16), a solubilidade do manganês em função do pH (T=25°C; [H₂S]=90mg/L) como sendo:

$$\text{Log} [\text{Mn}^{2+}] = 12,57 - 2\text{pH} \quad (17)$$

Para pH 7,5 (base do reator) a solubilidade teórica do sulfato de manganês é de 200mg/L. Este valor cai para 8mg/L em pH 8,2 (topo do reator). Embora os valores medidos da concentração de Mn²⁺ no reator sejam menores, é possível observar a mesma tendência. Ou seja, a solubilidade do manganês na base do reator (menor pH) é maior que no topo. É importante citar ainda que, além dos efeitos da força iônica, a produção de íons bicarbonato pelo metabolismo bacteriano também pode influenciar a precipitação deste metal. Pois, o carbonato de manganês é um produto sólido passível de ser formado neste sistema (pK_{ps} = 9,3). Um indício que sugere a participação do bicarbonato na precipitação é o pH mais elevado no topo do reator. Um pH mais elevado indica uma maior alcalinização da solução pela produção de HCO₃⁻. Além disso, a solubilidade do CO₂ é relativamente baixa, o que facilita seu acúmulo na parte

superior do reator, contribuindo para o aumento do pH e para a possível precipitação do manganês na forma de carbonato.

Em ambientes redutores, como as águas de subsolo, o manganês encontra-se na forma de Mn^{+2} e sua concentração raramente ultrapassa 2mg/L. Em tratamentos químicos de águas residuárias, a adição de carbonato de sódio precipita o Mn^{+2} como $MnCO_3$, em pH 8,5 (Manahan, 2000). A precipitação do manganês pela produção biológica de sulfeto e alcalinização, em reator anaeróbico de batelada, foi confirmada por Christensen *et al.* (1996). Na figura 13, é possível observar que a concentração de Mn^{+2} diminui à medida que o pH aumentou. Isto porque, a alteração do valor de pH no meio está relacionada, entre outras coisas, à produção de $H_2S_{(aq)}$ e de HCO_3^- . Ainda na figura 13, observa-se a concentração do manganês dissolvido em três condições diferentes: (1) no controle negativo (meio sem inóculo); (2) na camada líquida superior do reator (PSR); e (3) na parte inferior contendo esferas de vidro (PIR).

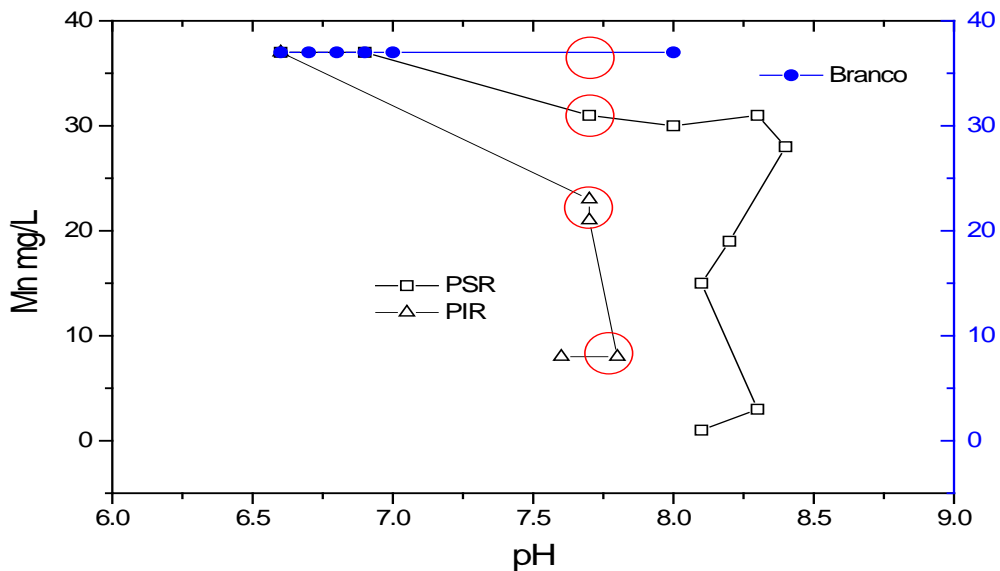
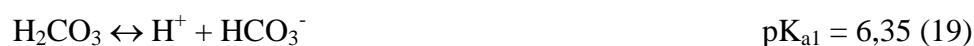


Figura 13 – Concentração do manganês *versus* pH. Branco = controle negativo; PIR = parte inferior do reator; PSR = parte superior do reator. Condições: O pH original da água do efluente industrial era 8,0 e foi ajustado para 6,6.

É possível especular que a formação de hidróxido metálico não foi o fator responsável pela precipitação do manganês, neste caso. Observando os círculos da figura 13, verifica-se que para um pH igual a 7,7 existem quatro concentrações diferentes de manganês: 8mg/L, 23mg/L, 33mg/L e 37,5mg/L, indicando que a precipitação deste metal foi resultado da formação de um outro tipo de precipitado, nestas condições. Considerando-se que as BRS liberam H₂S e CO₂ em sua respiração anaeróbia, supõe-se que os precipitados formados sejam o sulfeto e/ou o carbonato de manganês. Segundo os resultados obtidos, o pH não é o fator determinante na precipitação deste metal e sim a formação dos dois agentes precipitantes (H₂S e CO₂).

As concentrações de HCO₃⁻, H₂S e dos ácidos orgânicos voláteis interferem no pH do meio de cultivo. A decomposição da matéria orgânica presente na água do efluente industrial gera ácidos orgânicos voláteis que acidificam o meio (Tuppurainen *et al.*, 2002). Por outro lado, as BRS produzem CO₂(g) e H₂S(g). Em ambientes aquáticos naturais, o dióxido de carbono transforma-se em bicarbonato que, por sua vez, reage com outras substâncias do meio tamponando as águas. O bicarbonato (HCO₃⁻) é a espécie predominante em pH 8,3. Assim sendo, o bicarbonato favorece a estabilização do pH em valores próximos a 8,2, como observado no presente trabalho (Sawyer *et al.*, 1994; Manahan, 2000). O ácido sulfídrico, por sua vez, apresenta uma solubilidade de 4,0g/L à 20°C e 2,5g/L à 40°C, permanecendo protonado em pH ácido e desprotonado em pH maior que 7,0 (Martel e Smith, 2003; Sawyer *et al.*, 1994):



Outro parâmetro avaliado, no reator anaeróbio de batelada, foi o consumo de sulfato pelas BRS (figura 14). O sulfato em concentrações elevadas (7,7g/L) funcionou de maneira seletiva o que favoreceu o crescimento destes microrganismos. Os resultados obtidos de amostras colhidas no reator demonstraram que o consumo máximo de sulfato, em batelada, ficou em torno de 890mg/L (12% de remoção), após 85 dias. Christensen *et al.* (1996), em seus reatores anaeróbios de batelada, obtiveram, após 203 dias, um consumo de sulfato na ordem de 614 a 893mg/L, o que equivalia a 19-27%, da concentração total inicial de sulfato (3306mg/L).

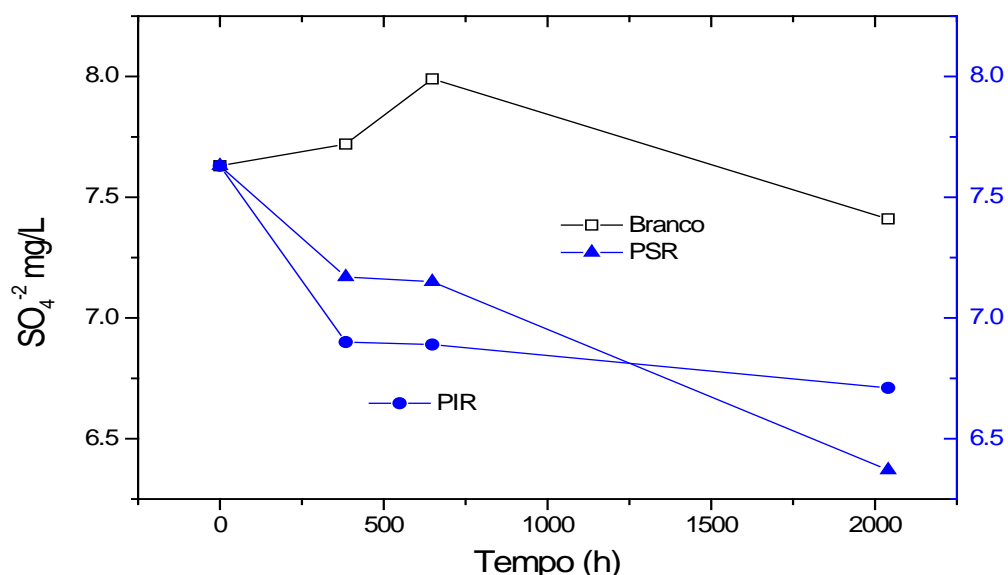


Figura 14 – Concentração do sulfato dissolvido. Água do efluente industrial contendo 7,7g/L de sulfato em pH 8,0. Condições: Branco em aerobiose e temperatura ambiente. Reator, parte inferior e superior, em anaerobiose e temperatura de 33⁰C.

5. Meios contendo manganês e cádmio em frascos de 100 mL

Ensaio, referentes a precipitação de metais pelo sulfeto gerado biologicamente, foram realizados com o manganês e com o cádmio em frascos de vidro vedados contendo meio

mínimo e leito de areia. Porém, antes dos ensaios com manganês e com cádmio foram feitos ensaios preliminares, em ambiente estéril, que geraram dados importantes para montagem dos ensaios propriamente ditos. Os ensaios preliminares podem ser subdivididos em duas etapas: a primeira, sem leito de areia e a segunda, com leito de areia. O objetivo era verificar em qual(is) condição(ões) as BRS eram capazes de crescer e de precipitar os metais; sendo que o cobre foi o metal mais tóxico para as BRS, dentre os metais estudados. Utilizou-se uma concentração de 20mg/L de cobre por ser considerada não inibitória para as BRS, segundo a literatura (Fortin *et al.*, 2000). Verificou-se, porém, que em frascos contendo meio 2% (v/v) de tioglicolato as bactérias não cresceram na presença de cobre e as que cresceram em presença de manganês e zinco não precipitaram estes metais. No meio mínimo, com pH 6,2, o resultado foi semelhante, ou seja, o crescimento bacteriano foi observado em presença de manganês e de zinco, mas também não houve precipitação.

Durante a adição de acetato de zinco e de sulfato de cobre em meio mínimo, com pH 6,2, ocorreu a precipitação dos metais devido à formação de hidróxidos dos mesmos. A solubilidade destes metais, no meio mínimo, varia conforme o pH. Para conseguir uma concentração de cobre e zinco igual a 20mg/L era necessário que se abaixasse o pH para cinco, segundo os diagramas de solubilidade (Silva e Leão, 1999). Este valor de pH é incompatível com o crescimento das BRS em estudo. A alternativa foi substituir o cobre pelo cádmio, que permanece na forma de Cd^{+2} em pH 6,2; e, diminuir a concentração de zinco para 1,5mg/L. A turbidez, causada pelo crescimento das BRS em presença dos metais cobre, manganês, zinco, foi avaliada através da leitura em espectrofotômetro utilizando uma densidade óptica de 600nm (DO_{600nm}), conforme mostrado nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Turbidez causada pelo crescimento das BRS em presença dos metais cobre, manganês e zinco.

DO600nm medida em presença de diferentes metais			
Horas	Cu	Mn	Zn
0	0,000	0,000	0,000
72	0,010	0,076	0,050
216	0,013	0,154	0,013
288	0,012	0,173	0,012
552	0,012	0,167	0,012

Condições: Meio Mínimo adicionado de meio 2% (v/v) de tioglicolato, com pH 5,5 e temperatura de 33°C. Ambiente Estéril.

Tabela 12 – Densidade óptica 600nm (DO_{600nm}) das BRS em presença dos metais cádmio, manganês e zinco.

DO600nm medida em presença de diferentes metais			
Horas	Cd	Mn	Zn
0	0,000	0,000	0,000
144	0,002	0,014	0,011
192	0,000	0,077	0,011

Condições: Meio Mínimo, com pH 6,2 e temperatura de 33°C. Ambiente estéril.

Observando os resultados das densidades ópticas de 600nm, referentes à turbidez do meio, foi possível verificar a influência dos metais manganês, zinco, cobre e cádmio sobre o crescimento das BRS. O cádmio e o cobre inibiram o crescimento das BRS. A toxicidade destes metais, em ordem decrescente, neste caso, pode ser escrita da seguinte forma: Cd>Cu>Zn>Mn. E, a taxa de crescimento das BRS, em presença dos mesmos, foi: (1) Mn>Zn>Cu, em meio contendo 2% (v/v) de tioglicolato e pH 5,5; e, (2) Mn>Zn>Cd, em meio mínimo e pH 6,2.

O manganês foi o metal escolhido para ser utilizado em uma segunda etapa de ensaios, por apresentar, durante a primeira etapa, os maiores valores de DO tanto em meio mínimo quanto em meio contendo 2% (v/v) de tioglicolato. Os resultados obtidos nos ensaios com manganês e leite de areia, após 192 horas de incubação, a 33°C, foram:

DO_{600nm} igual a 0,260 de absorvância; alcalinização do meio (de 6,2 para 7,9); e, precipitação do metal (de 20mg/L para 1,59mg/L). Comparativamente, a turbidez em presença de areia foi 3,4 vezes maior do que na ausência desta estrutura de fixação, ou seja, a DO de 600nm que foi igual a 0,077 em meio mínimo, sem a areia, passou a ser igual a 0,260, com a areia. A alcalinização do meio e a precipitação de metais indicam que as condições foram propícias para o metabolismo das BRS (Garcia *et al.*, 2001; Lens *et al.*, 1998). Estes resultados confirmaram a importância da areia, enquanto estrutura de fixação, na atividade destes microrganismos. Observando a tabela 13, é possível verificar o aumento da turbidez e a diminuição da concentração de manganês, em presença de leito de areia.

Tabela 13 – DO_{600nm} X concentração de manganês, em função do tempo.

Horas	DO600nm	Concentração de Mn em mg/L
0	0,000	20
144	0,021	19
192	0,260	1,6

Condições: Meio Mínimo, com pH 6,2 e temperatura de 33°C, em presença de leito de areia. Ambiente estéril.

Em outra etapa foi estudada a precipitação de manganês e de cádmio. Os parâmetros avaliados foram: (1) o crescimento bacteriano; (2) a concentração destes metais; (3) a variação do pH e do Eh do meio; e (4) o consumo de sulfato. Comparando as figuras 15 e 16, nota-se que o crescimento das BRS, em presença de manganês, ocorre abruptamente enquanto que, em presença de cádmio, este processo é gradual. Nota-se, também, que o número de bactérias por volume de solução é dez vezes maior no meio contendo manganês. Estas diferenças ocorreram devido a maior toxicidade do cádmio em comparação ao manganês (Esteves, 1998; Manahan, 2000).

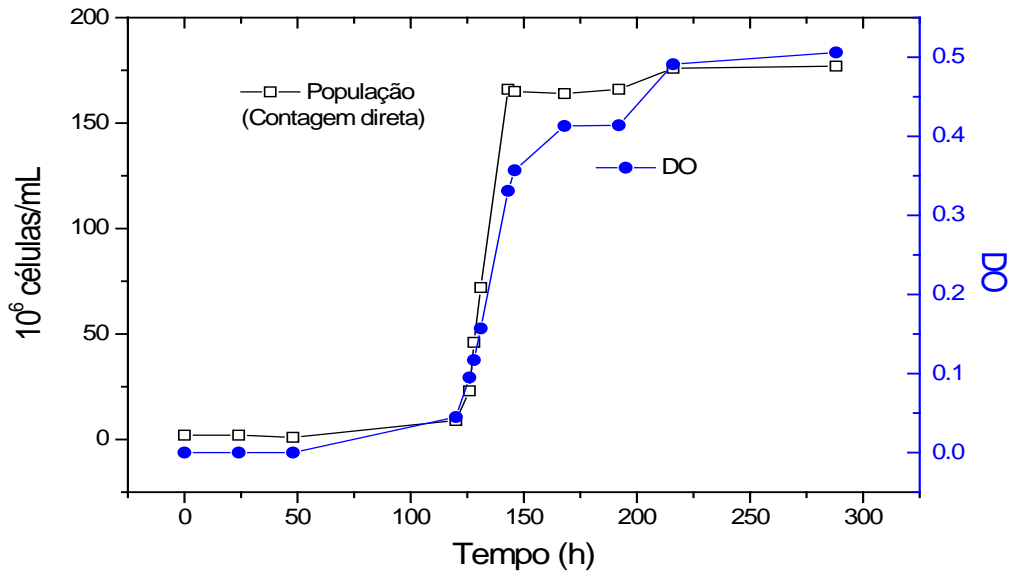


Figura 15 – Avaliação do crescimento das BRS, em presença de manganês, feita por turbidimetria (DO) e por contagem direta em câmara de Neubauer.

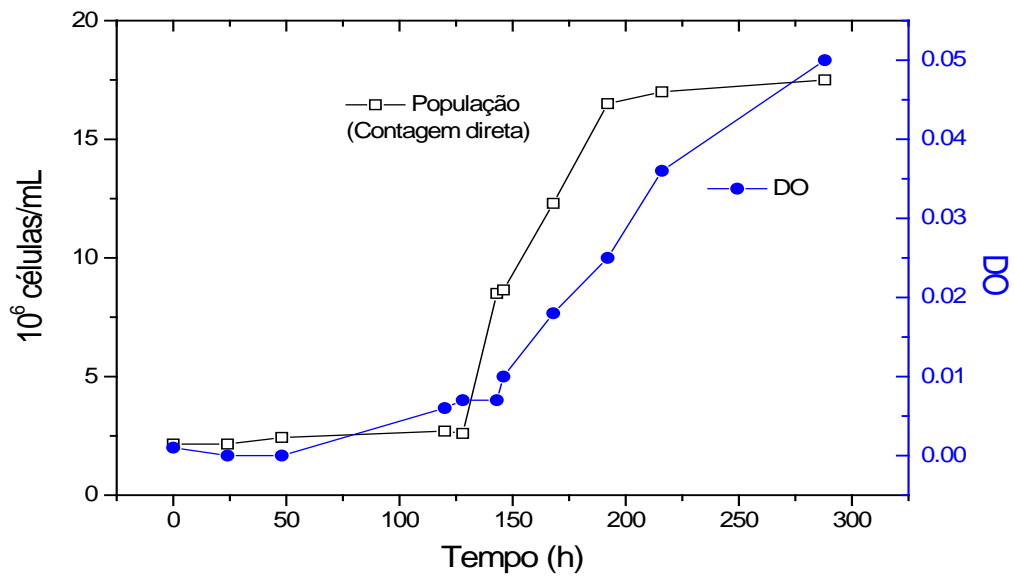


Figura 16 – Avaliação do crescimento das BRS, em presença de cádmio, feita por turbidimetria (DO) e por contagem direta em câmara de Neubauer.

Segundo a Resolução CONAMA nº20 de 1986 as concentrações de manganês e de cádmio devem estar na faixa de 0,1 a 0,5mg/L Mn e 0,001 a 0,01mg/L Cd, dependendo da classificação do corpo d'água receptor. Assim sendo, a precipitação de metais pelo sistema biológico de redução de sulfato pode ser uma alternativa interessante no polimento de alguns efluentes industriais. É possível observar nas figuras 17 e 18 a relação, inversamente proporcional, do crescimento bacteriano com a precipitação dos metais. A precipitação do manganês ocorre em menor tempo que a precipitação do cádmio. Isto porque, a produção do sulfeto e do CO₂ dependem da redução biológica do sulfato que em presença de cádmio fica inibida. Os resultados são curvas com inclinações mais suaves no caso do cádmio e mais abruptas no caso do manganês.

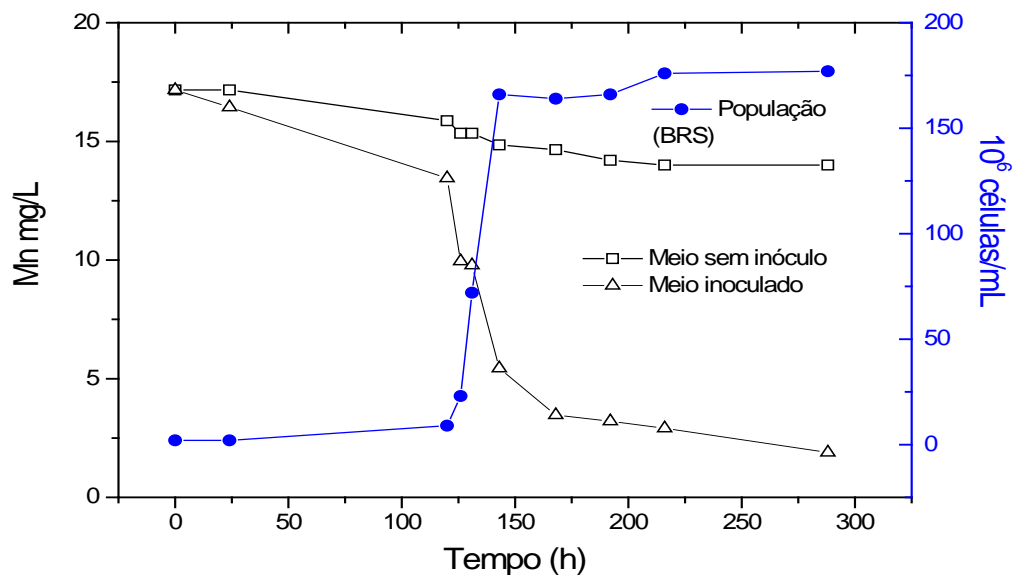


Figura 17 – Relação existente entre crescimento bacteriano e a precipitação do manganês.

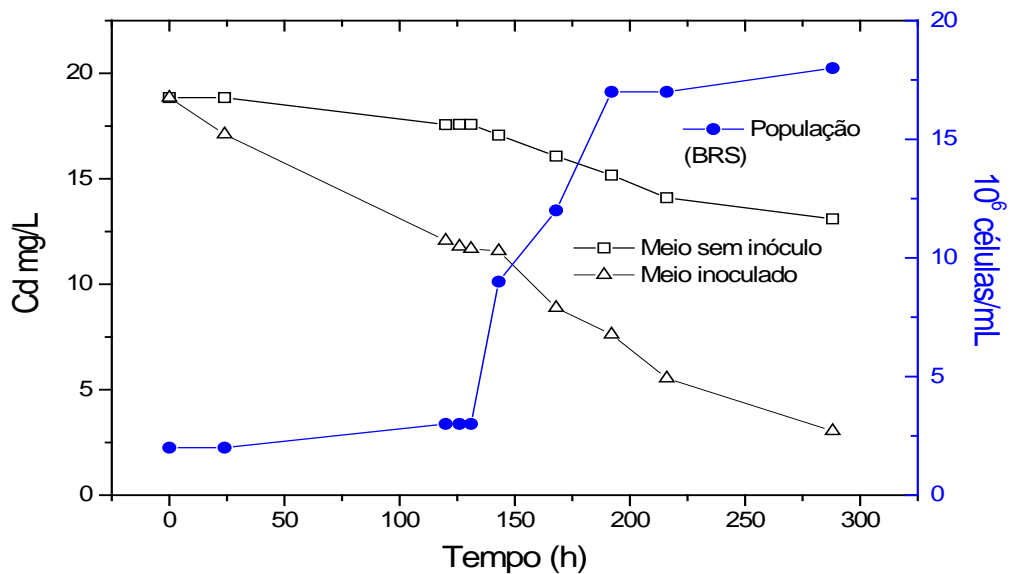


Figura 18 – Relação existente entre crescimento bacteriano e a precipitação do cádmio.

Analisando o pH e o crescimento bacteriano (contagem direta), verifica-se que há relação direta entre os mesmos. Isto porque, o sulfato é utilizado como aceptor final de elétrons na respiração anaeróbia. Logo, o crescimento bacteriano (fase log) favorece a cinética do processo de dessulfatação, reduzindo maior quantidade de sulfato (Von Sperling, 1996). E a redução de sulfato, por sua vez, implica em consumo de H^+ e produção de CO_2 , como já visto nas equações 19 e 21. Observa-se que, tanto na figura 19 quanto na figura 20, as curvas de pH acompanham a inclinação da curva de crescimento bacteriano, confirmando a relação direta entre estes parâmetros.

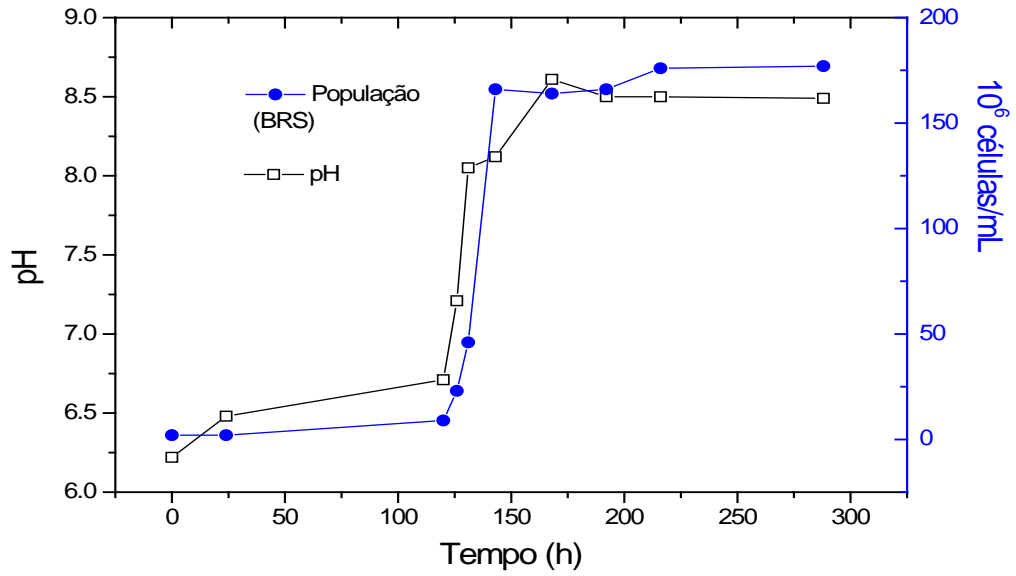


Figura 19 – Crescimento bacteriano em presença de manganês e alcalinização do meio mínimo.

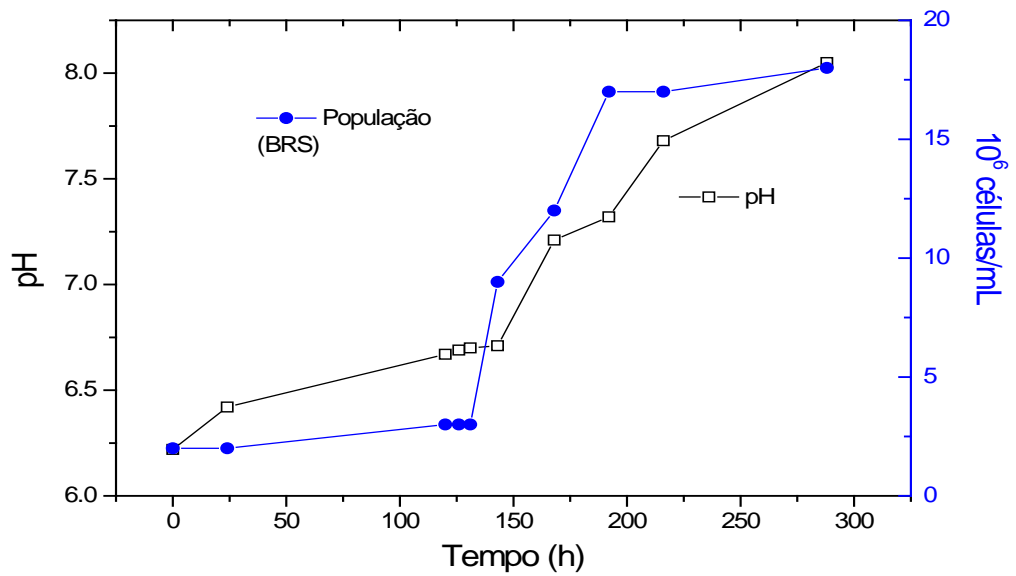


Figura 20 – Crescimento bacteriano em presença de cádmio e alcalinização do meio mínimo.

A fase log das BRS, em presença de manganês, durou 24 horas. Enquanto, em presença de cádmio, durou 4 dias. Este fato está relacionado à diferença de toxidez entre estes metais. O crescimento bacteriano, em presença dos metais cádmio e manganês, foi modelado tomando-se como base a fase log das figuras 19 e 20. Assim, pôde-se escrever:

a) Manganês: $\ln(\text{população}) = 0,123(\text{tempo}) - 12,206$ $\mu=0,123$ (23)

b) Cádmio: $\ln(\text{população}) = 0,0139(\text{tempo}) + 0,148$ $\mu=0,0139$ (24)

Onde μ é a velocidade de crescimento específica. A reta resultante, com inclinação igual a μ , permitiu o cálculo do tempo de duplicação (g) que pôde ser determinado aplicando-se a equação:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (25)$$

Os tempos de duplicação das BRS encontrados, em presença de manganês e de cádmio, foram, respectivamente, 6 horas e 50 horas; o que confirma a maior dificuldade de crescimento das BRS em presença do cádmio. Para que o sistema de tratamento em reatores anaeróbios seja eficiente, o tempo de residência deve ser maior que o tempo de duplicação, o que sugere a necessidade de adaptação das BRS à presença de cádmio em sistemas industriais.

Observando as figuras 21 e 22, verifica-se que a concentração de sulfato, nos reatores de 100mL, reduziu-se com o tempo, como esperado. Porém, a taxa de redução ficou em torno de 10%, em 12 dias. Sendo, que os primeiros 4 dias de incubação, tanto em presença de manganês quanto de cádmio, equivalem à fase lag do processo. Tabak e Govind (2003) desenvolveram estudos em biorreatores de membrana, onde foi possível verificar a relação direta entre o consumo de sulfato e o crescimento bacteriano. E observaram que o consumo de sulfato ocorria durante a fase log, estabilizando-se, no sistema batelada, após esta fase; confirmando os resultados do presente trabalho.

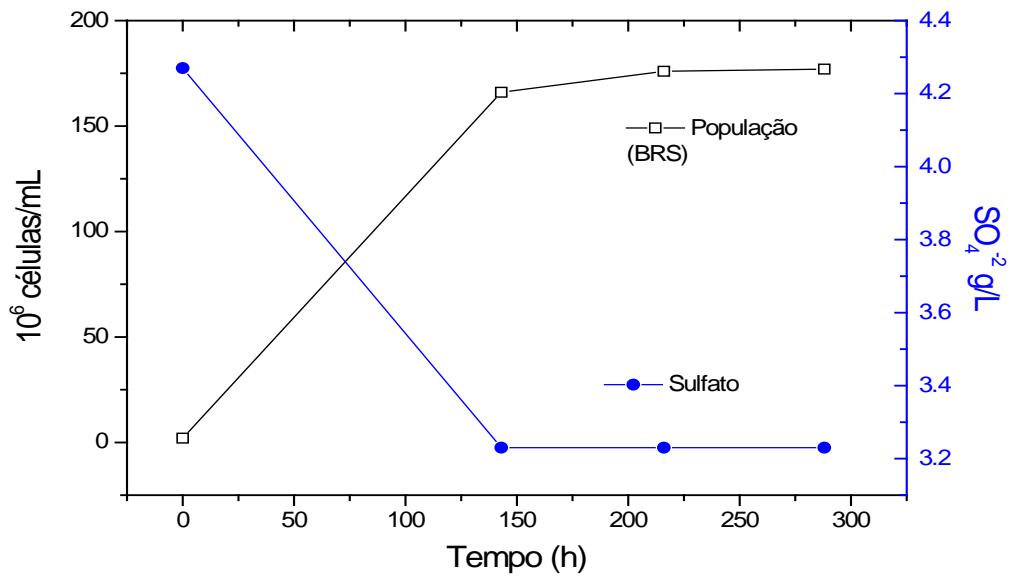


Figura 21 – Crescimento bacteriano, em presença de manganês, *versus* o consumo de sulfato.

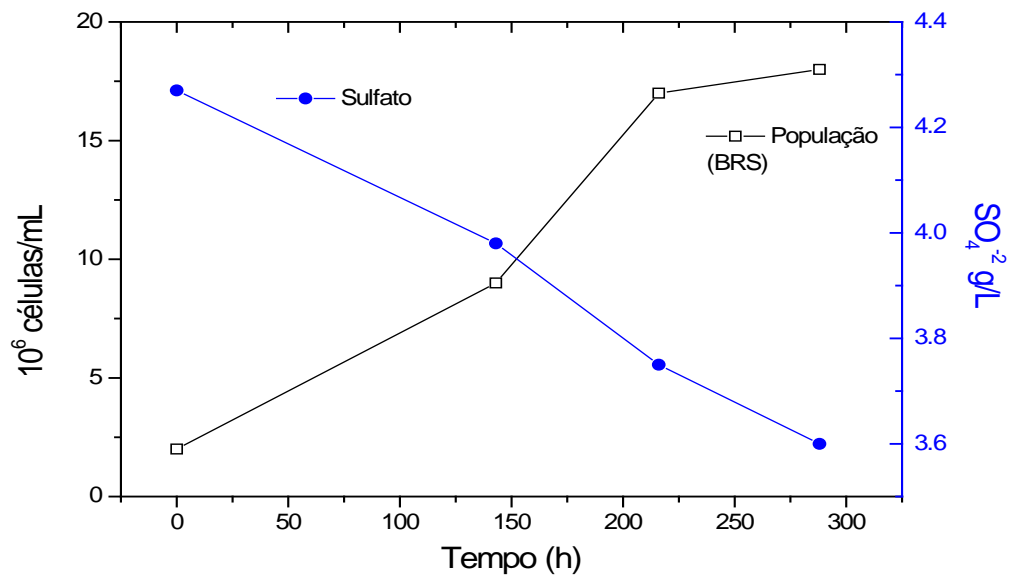


Figura 22 – Crescimento bacteriano, em presença de cádmio, *versus* o consumo de sulfato.

Os ensaios realizados nos reatores anaeróbios de batelada com leito de areia, utilizando meio mínimo e pH 6,2, apresentaram 90% de precipitação do manganês (de 20mg/L para 2mg/L) e 85% de remoção de cádmio (de 20mg/L para 3mg/L), após 13 dias. Ginter e Grobicki (1997), estudando a precipitação do manganês (50mg/L) em reator UASB, verificaram que a ausência de sulfato no meio de cultura dificulta a remoção deste metal no sistema. Nesta condição, o manganês poderia ser removido por adsorção no lodo em suspensão, porém, este processo não se mostrou eficiente. Em presença de 88,4mg/L de sulfato houve uma precipitação de 40% de manganês, enquanto na ausência deste ânion a precipitação foi de apenas 7,2%. A solução de alimentação do reator era composta de 0,67g de sucrose, 0,2g peptona, 0,675g NaHCO₃ e 0,02g de K₂HPO₄ por litro (DQO final de 1g/L) e tinha o pH ajustado para 6,3. Ginter e Grobicki (1997) observaram ainda que a precipitação ocorreu pela formação do carbonato de manganês (MnCO₃). Em uma etapa posterior deste mesmo trabalho, estes autores acrescentaram 50mg/L de cádmio ao meio de cultura (contendo sulfato) e obtiveram uma remoção de 56% de manganês, ou seja, a mistura dos metais favoreceu a precipitação do manganês pelo processo de co-precipitação.

Com o intuito de esclarecer qual(is) composto(s) de cádmio e de manganês precipitam nos reatores anaeróbios, foram construídos diagramas de EhXpH para estes dois metais. Foram considerados como possíveis ligantes: os sulfetos, os carbonatos e os hidróxidos. A análise dos gráficos baseia-se no valor de Eh medido, durante a atividade bacteriana, que foi igual a -290mV (Ag/AgCl) e no pH que variou de 6,2 a 8,5 (figuras 23 e 24). A faixa cinza, nas figuras 23 e 24, representa os valores de Eh (-290mV) e de pH (6,2 a 8,5) medidos durante os ensaios de biorredução.

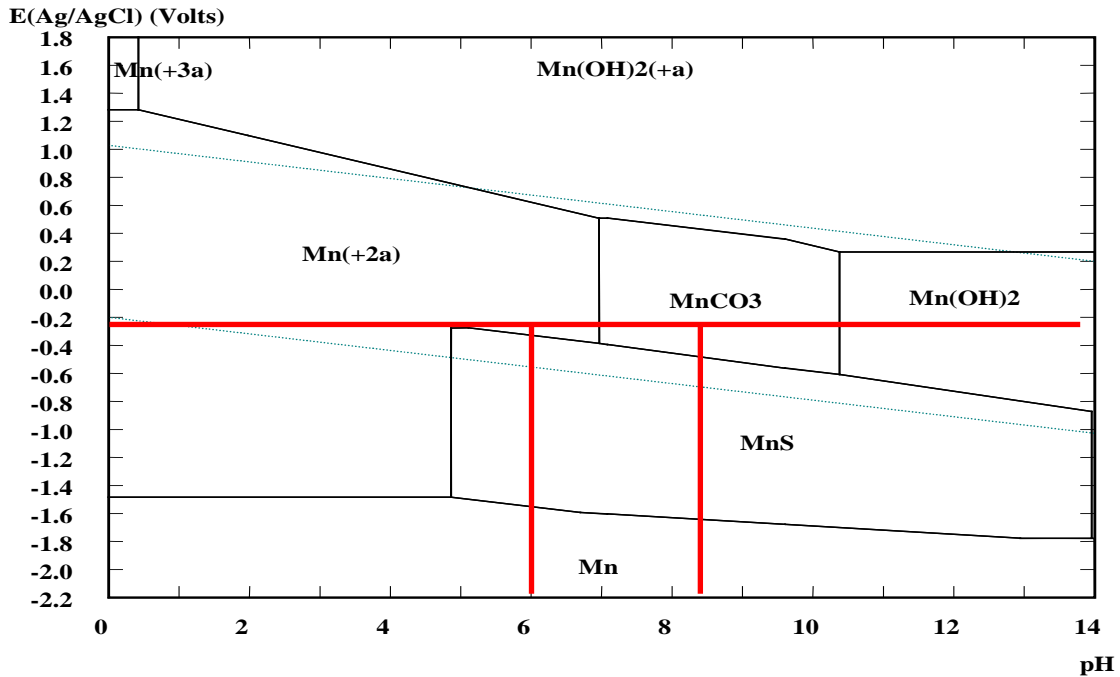


Figura 23 – Diagrama de EhXpH para o manganês, a 25°C. Condições: $[Mn]_T=3,6 \times 10^{-4}$ mol/Kg H₂O, $[CO_3]_T=5,2 \times 10^{-3}$ mol/Kg H₂O e $[S]_T=2,6 \times 10^{-3}$ mol/Kg H₂O.

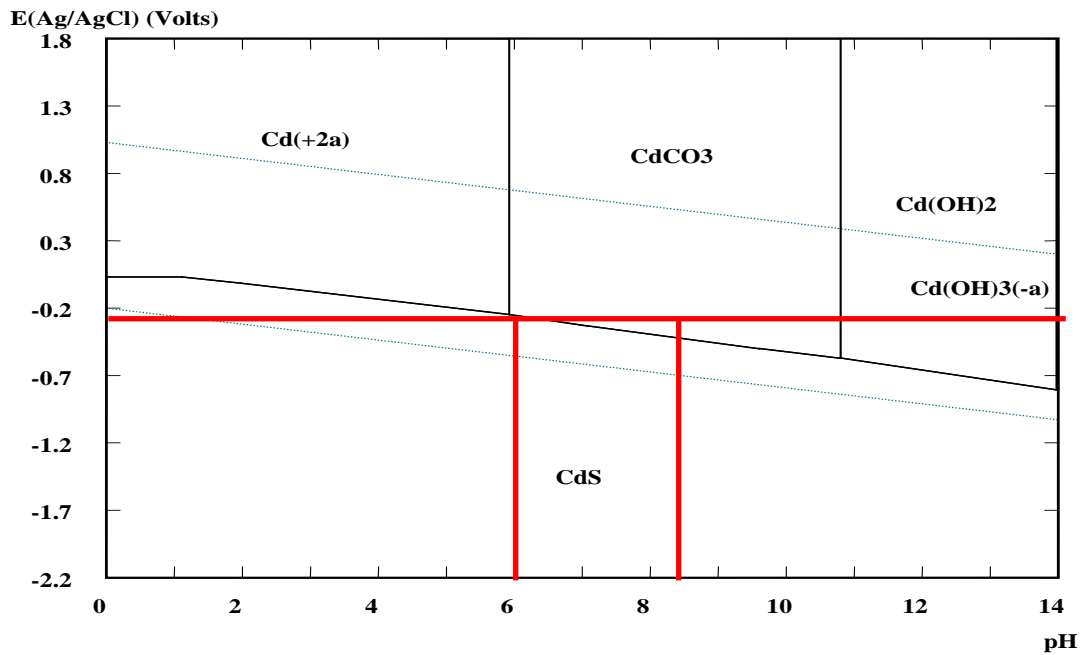


Figura 24 – Diagrama de EhXpH para o cádmio, a 25°C. Condições: $[Cd]_T=1,78 \times 10^{-4}$ mol/Kg H₂O, $[CO_3]_T=5,2 \times 10^{-3}$ mol/Kg H₂O e $[S]_T=2,64 \times 10^{-3}$ mol/Kg H₂O.

A figura 23 sugere que o manganês, nas condições estudadas, pode precipitar na forma de carbonato. Entretanto, como diagramas EhXpH não consideram aspectos cinéticos, a precipitação de sulfeto pode estar ocorrendo simultaneamente. A precipitação deste metal na forma de carbonato justificaria a sua maior remoção no topo do reator de bancada (figura 12). Uma vez que, o CO₂ tende a acumular-se na parte superior do reator, devido a sua baixa solubilidade em água.

Observando a figura 24, verifica-se que o cádmio, nas condições estudadas, pode precipitar tanto na forma de sulfeto quanto de carbonato. Porém, os produtos de solubilidade do CdS e do CdCO₃ diferem de 6 a 7 ordens de magnitude em favor da formação do sulfeto de cádmio. Em função da menor solubilidade do sulfeto de cádmio ($K=10^7$, equação 26) quando comparada ao carbonato deste metal ($K_{ps}=10^{-12,1}$) acredita-se que o precipitado predominante seja o de sulfeto como sugerido por Ginter e Grobicki (1997).



Observando os resultados como um todo, verifica-se que, apesar de algumas limitações, as BRS estudadas foram capazes de reduzir sulfato, alcalinizar o meio e precipitar metais. Sendo que os compostos precipitados, tanto na forma de carbonato quanto de sulfeto, são estáveis no meio.

VII. CONCLUSÃO

Apesar de serem classificadas como anaeróbias estritas (potencial redox em torno de -100mV), as BRS apresentam tolerância ao oxigênio devido à presença da enzima catalase, o que permite o seu manuseio em aerobiose. A eficiência na redução do sulfato e o crescimento das BRS estão diretamente relacionados ao pH e ao meio utilizado. O meio mais rico em nutrientes, como é o caso do meio tioglicolato 7,5% (v/v), permite o crescimento das BRS em pH mais ácido (5,6), enquanto em meio mínimo, a acidez não deve ser inferior a 6,2. A acidez favorece o consumo de sulfato apesar de prolongar a fase lag, tanto em meio tioglicolato 7,5% (v/v) quanto em meio mínimo. A redução de sulfato em reator de batelada é limitada por ser um sistema passível de saturação; desta forma, o consumo máximo de sulfato, conseguido em 85 dias, foi 890mg/L. O meio mínimo é seletivo para as BRS Gram positivas (isolados B.R.), pois, estas bactérias são mais resistentes a diminuição do pH e também menos exigentes quanto ao meio nutricional. Para ensaios “in vitro”, verificou-se que a presença de um leito de areia é de suma importância para a precipitação de metais.

A aplicação das BRS em processo final (polimento) de tratamento de águas ácidas de minas é viável, pois, além destes microrganismos crescerem em meios compostos, basicamente, de sais inorgânicos, eles também precipitam metais e alcalinizam o meio. Porém, alguns pontos são fundamentais para a utilização das BRS em tratamento de corpos d'água: (1) o controle do pH do sistema; (2) o acompanhamento da quantidade e da qualidade da matéria orgânica; e (3) a utilização de bactérias adaptadas as condições do sistema em questão.

Referindo-se ao uso BRS no tratamento de efluentes, dois cenários podem ser construídos: (1) quando a precipitação dos metais é o principal objetivo; (2) quando o objetivo é a redução do teor de sulfato. No primeiro caso, o tempo de residência nos reatores anaeróbios pode ser reduzido (em torno de 13 horas, por exemplo), uma vez que, pequenas concentrações dos íons sulfeto e carbonato, produzidos pelas BRS, são capazes de remover os metais. Esta tecnologia mostrou-se eficiente para reduzir os

teores de manganês e de cádmio em meio sintético e em efluentes industriais. No segundo caso, o tempo de residência nos reatores é maior (48 horas no mínimo), devido à cinética do processo. Exemplificando cada caso, pode-se dizer que reatores anaeróbios seriam apropriados para precipitar metais enquanto a redução de sulfato seria melhor conduzida em lagoas de estabilização.

No caso brasileiro, o maior potencial de aplicação da biorredução de sulfato seria associada ao uso da cal. Como a cal é um insumo de baixo custo e amplamente disponível no país, esta seria a primeira opção para neutralização de efluentes ácidos. Entretanto, para reduzir os teores de sulfato que permanecem em torno de 1400mg/L, devido a solubilidade do gesso, necessita-se de uma etapa de polimento. Neste caso, a biorredução seria aplicada ao sulfato objetivando o seu enquadramento às normas da Resolução CONAMA nº20 de 1986.

VIII. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Tratamento de DAM utilizando BRS em reator anaeróbio de batelada.
- Tratamento de DAM utilizando BRS em reator anaeróbio de alimentação contínua.
- Estudo de fontes naturais de carbono para alimentação do reator em sistema contínuo

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRAHÃO, W. A. P.; MELLO, J. W. V. (2003). Aspectos químicos e mineralógicos relacionados à geração de drenagem ácida em materiais sulfetados, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de solos, Viçosa-MG.

BEYENAL, H.; LEWANDOWSKI, Z. (2001). Mass-transport dynamics, activity, and structure of sulfate-reducing biofilms, *Environmental and energy engineering* 47, 7.

BHATTACHARYA, S. K.; UBEROI, V.; DRONAMRAJU, M. M. (1996). Interaction between acetate fed sulfate reducers and methanogens, *Pergamon, Water Research*.30, 10, pp. 2239-2246.

BRAGA, B. (2002). *Introdução à engenharia ambiental*. São Paulo: Prentice Hall.

BURGESS, J. E.; STUETZ, R. M. (2002). Activated sludge for the treatment of sulphur-rich wastewaters, *Pergamon, Minerals Engineering* 15, pp. 839-846.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria, *Elsevier, FEMS Microbiology Ecology* 31, pp. 1-9.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater 20^a ed*, USA: Ed APHA.

CHRISTENSEN, B.; LAAKE, M.; LIEN, T. (1996). Treatment of acid mine water by sulfate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment, *Pergamon, Water.Research*.30, 7, pp. 1617-1624.

CYPIONKA, H.; WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1985). Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients, *Elsevier, FEMS Microbiology Ecology* 31, pp. 39 - 45.

DILLING, W.; CYPIONKA H. (1990). Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria *Elsevier, FEMS Microbiology Letters* 71, pp. 123-128.

ELLIOTT, P.; RAGUSA, S.; CATCHESIDE, D. (1998). Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in a upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage, *Pergamon, Wat. Res.* 32, 12, pp. 3724-3730.

ESTEVEES, F.A. (1998). *Fundamentos de limnologia.*, 2^a ed., Rio de Janeiro: Ed Interciencia.

FARELEIRA, P.; CHEN, L.; LIU, M. Y.; LEGALL, J.; SANTOS, H.; XAVIER, A. V (2003). *Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in Desulfovibrio gigas*, *Great Britain, Microbiology* 149, pp.1513-1522.

FORTIN D.; ROY M.; RIOUX JEAN-P.; THIBAUT PIERRE-J. (2000). Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings, Elsevier, FEMS Microbiology Ecology 33, pp. 197-208.

GADD, G. M. (2002). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, Elsevier Science Ltda, Current Opinion in Biotechnology 11, pp.271 - 279.

GARCIA, C.; MORENO, D.A.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M.L.; GONZÁLEZ, F. (2001). Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria, Pergamon, Minerals Engineering. Vol. 14, nº 9, pp. 997-1008.

GHIGLIAZZA, R.; LODI, A.; ROVATTI, M. (2000). Kinetic and process considerations on biological reduction of soluble and scarcely soluble sulfates, Elsevier, Resources, Conservation and Recycling 29, pp. 181-194.

GINTER, M. O.; GROBICKI, A. M. (1997). Manganese removal mechanisms in a stirred UASB reactor, Pergamon, Wat. Res. 31, 6, pp. 1261-1268.

GRANT, W. D. (1998). Microbiologia Ambiental, Editorial Acirbia S. A., Zaragoza – España. Capítulo 7: Transformaciones microbianas de otros elementos, pp. 151-190.

INGVORSEN K.; NIELSEN M. Y.; JOULIAN C. (2003). Kinetics of bacterial sulfate reduction in an activated sludge plant, Elsevier, FEMS Microbiology Ecology 1570, pp. 1-9.

JOHNSON, D. B. (2001). Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies, Elsevier, Hydrometallurgy 59, pp. 147-157.

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

KÜSEL, K.; ROTH, U.; TRINKWALTER, T.; PEIFFER, S. (2001). Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments, Elsevier, Environmental and Experimental Botany 46, pp. 213 - 223.

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

MANAHAN, S. E. (2000). Environmental Chemistry, 7^a ed., Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, pp 898.

MARTEL, A. E.; SMITH, R. M. (2003). NIST critically selected stability constants of metals complexes Version 07, The National Institute of Standards and Technology – USA.

MIRANDA, F. (2003). Gestão Ambiental e desenvolvimento sustentável, V Semana Integrada de Estudos de Engenharia, Ouro Preto.

OKABE S.; ITO T.; SATOH H. (2003). Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions, *Microbiol Biotechnol* 63, pp 322-334.

OTTO, Bier. (1966). *Bacteriologia e Imunologia*, 13ª ed., Ed Melhoramentos, Capítulo XXXVI: Métodos Bioquímicos, pp. 824 a 827.

PELCZAR, M. J. Jr. (1996). *Microbiologia: conceitos e aplicações*, 2ª ed. São Paulo: Ed. Makron books, vol 1.

REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (2002). *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação* organização e coordenação científica, 2ª ed., São Paulo: Ed. Escrituras.

SASS, A. M.; ESCHEMANN, A.; KÜHL, M.; THAR, R.; SASS, H.; CYPIONKA H. (2002). *Growth and chemosensory behavior of sulfate-reducing bacteria in oxygen-sulfide gradients*, Elsevier, *FEMS Microbiology Ecology* v. 40, p. 47 – 54.

SAWYER, C. N.; McCARLY P. L.; PARKIN, G. F. (1994). *Chemistry for environmental engineering*, 4ª ed., New York: McGraw-Hill Book Company.

SENGUPTA, M. (1993). *Environmental impacts of mining monitoring, restoration and control*, 1ªed., Florida: Boca Raton. - Lewis Publishers, Chapter 5: Acid Rock Drainage and Metal Migration, pp. 167 – 259; Chapter 8: Wetlands, pp. 325 - 424.

SILVA, A. J.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. (2002). Sulfate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor, Elsevier, *Process Biochemistry* 37, pp. 927 - 935.

SILVA, C. A.; LEÃO V. A. (1999). *Diagramas de Pourbaix*, Departamento de Metalurgia, Escola de Minas da UFOP.

SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S.; AGUIAR, L.M.B.A. (1987). *Microbiologia básica*, Fortaleza, Ed UFC.

TABAK, H. H.; GOVIND, R. (2003). Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1) Metal precipitation for recovery and recycle Biodegradation 14, pp.423-436. 2) Membrane bioreactor system for sulfate reduction Biodegradation 14, pp.437-452.

TUPPURAINEN, K. O.; VAISÄNEN, A. O.; RINTALA, J. A. (2002). Zinc removal in anaerobic sulphate-reducing liquid substrate process, Pergamon, Minerals Engineering 15, pp. 847-852.

Von SPERLING, M. (1996). Princípios básicos do tratamento de esgotos. Belo Horizonte: DESA-UFMG, volumes 1 e 2.

VOSSOUGH, M.; SHAKERI, M.; ALEMZADEH, I. (2003). Performance of anaerobic baffled reactor treating synthetic wastewater influenced by decreasing COD/SO₄⁻² ratios, Elsevier, Chemical Engineering and Processing 42, pp. 811 - 816.

WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. (1997). Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination, Elsevier, FEMS Microbiology Reviews 20, pp. 503 - 516.

WIDDEL, F. (1988). Produção de ácido sulfídrico por bactérias redutoras de sulfato e outras atividades - traduzido por Maria Emília Costa Lima, do alemão para o português, Universität München.