

**INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE  
MESTRADO PROFISSIONAL DE USO SUSTENTÁVEL DE RECURSOS  
NATURAIS EM REGIÕES TROPICAIS**

**TAYNÁ DINIZ FREDERICO**

**ANÁLISE DA CAPACIDADE METABÓLICA DE UM CONSÓRCIO  
BACTERIANO NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Dissertação apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Desenvolvimento Sustentável do Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais do Instituto Tecnológico Vale (ITV).

Orientador: Guilherme Corrêa de Oliveira, Dr.  
Coorientador: José Augusto Pires Bitencourt, Dr.

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F852 Frederico, Tayná Diniz

Análise da capacidade metabólica de um consórcio bacteriano no tratamento de drenagem ácida de mina. / Tayná Diniz Frederico. - Belém, ITV, 2019.

90 f. il.

Orientador: Guilherme Corrêa de Oliveira.

Coorientador: José Augusto Pires Bitencourt.

1. Drenagem ácida - Mina. 2. Tratamento - Biológico. 3. Biorreator. 4. Microrganismos. I. Oliveira, Guilherme Corrêa de. II. Bitencourt, José Augusto Pires. III. Título.

CDD 23. ed. 338.98115

Bibliotecário(a) responsável: Nisa Gonçalves / CRB 2 – 525

**TAYNÁ DINIZ FREDERICO**

**ANÁLISE DA CAPACIDADE METABÓLICA DE UM CONSÓRCIO  
BACTERIANO NO TRATAMENTO DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Dissertação apresentado como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Ambientais e Desenvolvimento Sustentável do  
Programa de Mestrado Profissional em Uso  
Sustentável de Recursos Naturais em Regiões  
Tropicais do Instituto Tecnológico Vale (ITV).

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira.  
Orientador – Instituto Tecnológico Vale (ITV)

---

Dr. José Augusto Pires Bitencourt  
Co-orientador – Instituto Tecnológico Vale (ITV)

---

Dr<sup>a</sup>. Gisele Lopes Nunes  
Membro interno – Instituto Tecnológico Vale (ITV)

---

Dr<sup>a</sup>. Patricia Magalhães Pereira Silva  
Membro externo – Instituto SENAI de Inovação em Tecnologias Mineraias

Belém – PA

2019

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Guilherme Oliveira, pela oportunidade e orientação no meu mestrado.

Ao meu co-orientador, José Augusto Bitencourt, pela orientação, por toda a contribuição no trabalho, pela paciência, dedicação, e ensinamentos que possibilitaram que eu realizasse esta etapa acadêmica.

A toda equipe da Genômica Ambiental do ITV, em especial Eder Pires e Renato Oliveira pela ajuda nas análises de diversidade dos microrganismos. Ao Manoel Lopes, por toda a ajuda e apoio nos experimentos. À minha parceira de laboratório, Werica Colaço, que desde o começo estava junto comigo no laboratório, sempre me dando apoio e estando ao meu lado nesse período. E aos amigos que fiz durante o meu tempo no ITV, Isa, Kleber e Mabel que de alguma forma ajudaram e estiveram presentes nesses dois anos.

Aos pesquisadores do Instituto SENAI de Inovação em Tecnologias Minerais do Pará (ISI-SENAI) por toda ajuda e colaboração no projeto.

À minha família, em especial minha mãe e pai, Maria e Ronaldo, pelo incentivo e apoio nas minhas decisões acadêmicas, por todos os ensinamentos e por toda ajuda e suporte durante esse período do mestrado. À minha irmã Nathalia por todos os seminários que ela teve que assistir e por me aguentar nos momentos mais estressantes. Ao meu namorado, João, por estar ao meu lado nesse momento da minha vida, por me ajudar quando foi necessário e pela paciência nos meus momentos de estresse. À minha madrinha, Rosangela por seus conselhos, orientações, apoio e incentivo na minha vida acadêmica e por sempre acreditar em mim.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar de tão boa vontade da avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Instituto Tecnológico Vale pela oportunidade do mestrado e ao suporte financeiro fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

A todos, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com o apoio financeiro do Edital de Inovação para a Indústria (CNI), no 156532, BIODAM--Biorremediação para Tratamento de Drenagem Ácida de Mina, em parceria com o Instituto Senai de Inovação em Pesquisas Minerais (ISI)

## RESUMO

Drenagem ácida de mina (AMD) são águas residuais produzidas pela indústria mineradora. AMD apresenta concentrações elevadas de metais dissolvidos, sulfato e um pH ácido, tornando-se um grande poluente para o meio ambiente. O método mais utilizado no seu tratamento é a adição de um agente neutralizante, como por exemplo a cal (óxido de cálcio – CaO). Método desvantajoso por produzir um lodo rico em metal e sulfato, encarecendo os custos operacionais. O tratamento biológico utiliza bactérias redutoras de sulfato (SRBs) e é uma alternativa ambientalmente atrativa, pois diminui a concentração de sulfato, aumenta o pH e possibilita a recuperação de metais de interesse econômico. Nesse trabalho foi realizado um estudo com um consórcio bacteriano cultivado em um biorreator anaeróbio, analisando a sua capacidade de sobreviver em ambientes ácidos e o tratamento de uma AMD sintética assim como a precipitação de um metal de interesse. Foram monitorados a diminuição do sulfato, consumo do glicerol e produção de acetato. Foram analisadas a atividade enzimática da enzima esterase (EST), atividade do sistema transportador de elétrons, a produção de biopolímeros e a diversidade dos microrganismos ao longo do experimento. O consórcio apresentou a capacidade de sobreviver em um ambiente ácido e desfavorável, como a AMD sintética. Aumentou o pH do meio, reduziu a concentração de sulfato e ocasionou a precipitação de metal. Foram realizadas as análises de atividade enzimática e metabólica dos microrganismos, ensaios ainda não realizados em estudos similares, com os resultados obtidos, foi observada a relação da atividade enzimática e metabólica com a degradação da matéria orgânica e crescimento celular. A análise de diversidade dos microrganismos mostrou que os microrganismos dominantes no biorreator foram do gênero *Desulfosporosinus* e *Clostridium*, sendo o *Desulfosporosinus* um organismo tolerante a ambientes ácidos. Apesar da necessidade de aumentar a quantidade de composto orgânico administrada para o consórcio e a introdução de um microrganismo que consuma acetato no cultivo, já que o acetato é uma substância tóxica para SRBs, o consórcio bacteriano mostrou ser uma boa alternativa para ser utilizado em tratamentos de AMD, possibilitando o aumento do pH, diminuição da concentração de sulfato e precipitação de metais de interesse econômico.

Palavras-chave: Drenagem ácida de mina, tratamento biológico, biorreator, microrganismos, bactérias redutoras de sulfato, *Desulfosporosinus*.

## ABSTRACT

Acid mine drainage (AMD) are wastewater produced by the mining industry. AMD has high concentrations of dissolved metals, sulfate and a very low pH, making it a great environment pollutant for the environment. The most widespread method in its treatment is the addition of a neutralizing reagent, such as lime (calcium oxide – CaO). A disadvantageous method which producing a sludge rich in metal and sulfate, increasing operating costs. Biological treatment uses sulfate reducing bacteria (SRBs) and is an environmentally attractive alternative, because it reduces the sulfate concentration, increases the pH and allow the recovery of metals of economic interest. In this project, a study was carried out with a bacteria consortium grown in an anaerobic bioreactor, analyzing its ability to survive in acidic environments and its ability to treat a synthetic AMD as well as the precipitation of a metal of interest. Sulfate reduction, glycerol consumption and acetate production were monitored. The enzymatic activity of esterase enzyme, activity of the electron transport system, the production of biopolymers and the diversity of the microorganisms throughout the experiment were analyzed. The consortium had the ability to survive in an acid and unfavorable environment, such as synthetic AMD. It increased the pH of the medium, reduced sulfate and caused the precipitation of metal. Analyzes of the enzymatic and metabolic activity of the microorganisms were carried out, essays not yet performed in similar studies, with the results obtained was observed the relation of the enzymatic and metabolic activity with the organic matter degradation and cell growth. Analysis of microorganisms diversity showed that the dominant microorganisms in the bioreactor were of the genus *Desulfosporosinus* and *Clostridium*, with *Desulfosporosinus* being an organism possibly tolerant to acidic environments. Despite the necessity to increase the amount of organic compound administered to the consortium and the introduction of a microorganism that consumes acetate in the culture, since acetate is a toxic for SRBs, the bacteria consortium proved to be a great alternative in the use of AMD treatment, allowing the increase of pH, decrease of sulfate concentration and precipitation of metals of economic interest.

Keywords: Acid mine drainage, biological treatment, bioreactor, microorganisms, sulfate reducing bacteria, *Desulfosporosinus*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Drenagem ácida da mina de carvão, Jaintia Hills e (b) AMD de resíduos de mina no Canadá (NANCUCHEO et al., 2017).....	17
Figura 2. Tratamentos Abióticos .....	18
Figura 3. Tratamentos Biológicos .....	19
Figura 4. Esquema gráfico dos biorreatores e processos do Thipaq (MUYZER; STAMS, 2008).....	21
Figura 5. Reação dissimilatória do sulfato (MADIGAN et al., 2010).....	23
Figura 6. Esquema do meio dupla camada (NANCUCHEO et al., 2016) .....	30
Figura 7. Biorreator utilizado no experimento .....	32
Figura 8. Representação gráfica do biorreator utilizado nos ensaios, ilustração modificada de Santos e Johnson (2017) .....	33
Figura 9. Mudança de pH ao longo dos dias de operação do experimento .....	46
Figura 10. Mudança do fluxo de saída ao longo dos dias de operação do experimento .....	47
Figura 11. Número de células bacterianas totais ao longo dos dias de operação do experimento .....	49
Figura 12. Concentração em mM do glicerol e acetato ao longo do experimento .....	51
Figura 13. Concentração de sulfato ao longo do experimento .....	53
Figura 14. Gráfico da estimativa da atividade enzimática das esterases (EST) .....	55
Figura 15. Gráfico do ensaio atividade do sistema transportador de elétrons (ETSA) .....	58
Figura 16. Quantificação de proteínas totais .....	61
Figura 17. Quantificação de carboidratos totais .....	62
Figura 18. Quantificação lipídios totais.....	63
Figura 19. Gráfico de barras, gerado pelo QIIME, da análise de diversidade dos microrganismos .....	65
Figura 20. Dendrograma baseado em sequências do gene 16S rRNA de bactérias e arqueias redutoras de sulfato.....	68
Figura 21. Correlação de Spearman rs.....	71

Figura 22. Análise das componentes principais (PCA).....	73
Figura 23. Concentração de Glicerol, Acetato e Sulfato e valores de pH1 e pH2 nos dias escolhidos para análise de diversidade dos microrganismos.....	74
Figura 24. Frasco lavador que foi acoplado ao biorreator para o ensaio com AMD natural retirada de uma mina de cobre da região Amazônica.....	76
Figura 25. Difratoograma de DRX do precipitado (SILVA et al, 2018).....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Normas da Resolução CONAMA nº 357 e nº 430, para efluentes de fonte poluidoras lançados em um ambiente natural.....	18
Tabela 2. Composição química da AMD sintética de Sossego adaptado de Santos e Johnson (2017).....	34
Tabela 3. Condições para análises cromatográficas. ....	35
Tabela 4. Porcentagem dos microrganismos <i>Desulfosporosinus</i> e <i>Clostridium</i> nas amostras de DNA, aferidas no QIIME .....	64
Tabela 5. Identidade da sequência identificada como <i>Desulfosporosinus</i> pelo QIIME com as sequências no NCBI. ....	66
Tabela 6. Identidade da sequência identificada como <i>Clostridium</i> pelo QIIME com as sequências no NCBI .....	69
Tabela 7. Resultado do teste Mann Whitney, valores $p < 0,05$ . ....	72

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMD	<i>Acid Mine Drainage</i>
AMP	<i>Adenosine Monophosphate</i>
APS	<i>Adenosine Phosphosulfate</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BMP	<i>Brazilian Microbiome Project</i>
CaO	Óxido de Cálcio
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Cálcio
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Acetato
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Etanol
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido Acético
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CuS	Sulfeto de Cobre
DHA	Desidrogenase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRX	Difratometria de Raios-X
e <sup>-</sup>	Elétron
E <sup>o'</sup>	Potencial de Redução
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EST	Esterase
ETSA	<i>Electron Transport System Activity</i>
Fe <sup>2+</sup>	Ferro Ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Ferro Férrico
FeS <sub>2</sub>	Pirita
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
H <sup>+</sup>	Íon de Hidrogênio
HBS	<i>Heterotrophic Basal Salts</i>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
H <sub>2</sub> O	Água
HS <sup>-</sup>	Sulfeto

H <sub>2</sub> S	Sulfeto de Hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
INT	Cloreto de 2-[(P-Iodofenil)-3-(P-Nitrofenil)-5-Fenil Tetrazolium]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio Monobásico
KOH	Hidróxido de Potássio
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OH <sup>-</sup>	Hidroxila
OTUs	Operacional taxonomic unit
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pH1	Potenciômetros Superior
pH2	Potenciômetros Inferior
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	RNA Ribossomal
S <sup>0</sup>	Enxofre Elementar
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Sulfito
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Tiosulfato
SRBs	Sulfate Reducing Bacteria
TE	<i>Trace Elements</i>
TPF	Trifeniltetrazolium Formazan
Zn <sup>2+</sup>	Íon de Zinco
ZnS	Sulfeto de Zinco

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
	3.1. Geração de Drenagem Ácida de Mina (AMD).....	16
	3.2. Tratamentos da AMD .....	18
	3.3. Microrganismos Sulfato Redutores .....	22
	3.4. Análise de diversidade de microrganismos com o 16S rRNA .....	25
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
	5.1. Objetivo Geral .....	28
	5.2. Objetivos Específicos .....	28
<b>6.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
	6.1. Cultivo do consórcio.....	29
	6.2. Montagem do Biorreator.....	31
	6.3. Crescimento populacional total. ....	34
	6.4. Monitoramento das concentrações de glicerol, acetato e sulfato. ....	35
	6.5. Quantificação dos biopolímeros (carboidratos, lipídios e proteínas totais).....	36
	6.6. Análise da atividade enzimática microbiana total e análise da desidrogenase.....	37
	6.7. Mudança da diversidade de consórcio contido no biorreator .....	38
	6.7.1. Extração do DNA .....	38
	6.7.2. Amplificação do gene 16s rRNA.....	39
	6.7.3. Sequenciamento.....	39
	6.7.4. Análise dos dados .....	40
	6.7.4.1. Demultiplexação.....	40
	6.7.4.2. Normalização do número de <i>reads</i> .....	41
	6.7.4.3. Identificação taxonômica até gênero utilizando o programa QIIME.....	41

6.7.5. Identificação taxonômica até espécie e árvore filogenética de SRBs. ....	42
6.8. Análise estatística .....	43
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
7.1. Mudança do pH.....	45
7.2. Crescimento populacional total. ....	48
7.3. Monitoramento da concentração de glicerol, acetato e sulfato.....	50
7.4. Estimativa total da atividade enzimática microbiana e ensaio da desidrogenase .....	54
7.5. Quantificação dos biopolímeros .....	60
7.6. Análise da diversidade de microrganismos .....	63
7.7. Análise estatística .....	70
7.8. Análise do metal recuperado.....	75
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas ambientais gerados pela indústria mineradora são as drenagens ácidas de minas (*acid mine drainage* - AMD), resíduo que apresenta uma grande quantidade de sulfato, metais e metaloides dissolvidos e pH bastante ácido, provocando um grande impacto no ambiente se não forem adequadamente tratadas (BANKS et al., 1997; JOHNSON, 2003; HALLBERG, 2010).

Várias tecnologias já foram desenvolvidas no intuito de tratar esse tipo de rejeito (JOHNSON; HALLBERG, 2005), um dos métodos mais utilizados para o tratamento da AMD é a utilização da cal ou carbonato de cálcio, um agente neutralizante que provoca o aumento do pH e ocasiona a precipitação de uma grande variedade de metais na forma de hidróxidos ou carbonatos (COULTON; BULLEN; HALLETT, 2003; JOHNSON; HALLBERG, 2005). Entretanto, o resultado deste tratamento é um lodo rico em metais, sulfatos, carbonatos e hidróxidos, sendo tóxico para vários organismos, como plantas e animais. Os metais presentes no lodo podem estar disponíveis devido a redução do poder imobilizante do carbonato, sendo recomendado a disposição desse lodo em aterros específicos ou o seu armazenamento em barragens (JOHNSON, 2003; SIMATE; NDLOVU, 2014).

Uma alternativa para o tratamento de AMD é a utilização de bactérias redutoras de sulfato (SRBs). SRBs são organismos que realizam a redução dissimilatória de sulfato a sulfeto, onde utilizam o sulfato como aceptor final de elétrons para degradação da matéria orgânica, liberando sulfeto como produto dessa reação (MUYZER; STAMS, 2008). A atividade de redução do sulfato a sulfeto provocada pelas SRBs pode ser utilizada para diminuir a quantidade de sulfato, metais e aumentar o pH das drenagens ácidas de minas, devido essa reação ser próton consumidora, resultando no aumento do pH. Além disso, o sulfeto produzido pode reagir com metais dissolvidos, precipitando-os (JOHNSON; HALLBERG, 2005; MUYZER; STAMS, 2008). Após a precipitação, os metais podem ser recuperados.

A utilização de SRBs é uma alternativa bastante vantajosa, pois possibilita a recuperação de metais de interesse e o seu tratamento, diminuindo a quantidade de metais e metaloides, sulfato e aumentando o pH. As tecnologias Thiopaq e o sistema Biosulfide foram desenvolvidas utilizando como princípio fundamental a reação de redução de sulfato para tratamento de água ácidas que contêm metais (ROWLEY et al., 1997; BOONSTRA et al., 1999).

Vários estudos já foram realizados no intuito de se estudar SRBs no tratamento de águas residuais de minas (SEN; JOHNSON, 1999; JOHNSON et al., 2009; NANCUCHEO; JOHNSON, 2012; NANCUCHEO; JOHNSON, 2014; SANTOS; JOHNSON, 2017). O intuito agora é encontrar novos organismos capazes de realizar a precipitação de metais da AMD, em uma condição de pH baixo, e que essa tecnologia seja nacional.

Neste trabalho foi realizado um estudo de um consórcio de bactérias isoladas do Chile. Sendo observada a sua capacidade de sobreviver em ambientes ácidos, gerando sulfeto de hidrogênio e precipitando metais de interesse, como o cobre. Foram monitorados o consumo de glicerol e sulfato e a produção de acetato. Foram analisadas a atividade enzimática das esterases e atividade do sistema transportador de elétrons e os biopolímeros produzidos foram quantificados. E também foi analisada a diversidade de microrganismos contidos no consórcio ao longo do experimento.

## **2. HIPÓTESES**

O consórcio de bactérias utilizado no experimento, ao longo de 342 dias, contendo bactérias redutoras de sulfato, apresenta a capacidade de sobreviver em ambiente ácido que contém sulfato, utilizando-o na metabolização de compostos orgânicos e ocasionando o aumento do pH do meio. Produzindo sulfeto de hidrogênio que irá reagir com metais dissolvidos, precipitando-os. Tornando viável a sua utilização em futuras tecnologias de tratamento biológico de drenagens ácidas de minas.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Geração de Drenagem Ácida de Mina (AMD)

Os produtos da mineração tornaram-se essências para a sociedade, os metais fazem parte da maioria dos produtos de uso diário, como na construção dos meios de transporte ou de equipamentos de comunicação (NORDSTROM, 2000). Apesar da mineração possibilitar o desenvolvimento da sociedade, possibilitando a geração de produtos e novas tecnologias, é uma atividade que libera uma grande quantidade de rejeitos podendo, se não forem tratados adequadamente, impactar à saúde de organismos e do ecossistema como um todo, em uma escala local e até global (JOHNSON, 2003; SIMATE; NDLOVU, 2014).

Os rejeitos da mineração podem ser: (i) resultantes da quebra do minério depositados em montes, podendo ter componentes quimicamente inertes ou reativos; (ii) resíduos de lixiviação, rejeitos minerais reativos, caracterizados por materiais com grãos finos e grande quantidade de minerais sulfetados; e (iii) as águas residuais que são produzidas no processo de mineração, ou pela interação de águas e rochas expostas ou interação da água com os rejeitos minerais reativos (JOHNSON, 2003). Para controlar e prevenir o contato com água e oxigênio muitos desses rejeitos são enterrados em câmaras seladas com argila (JOHNSON, 2003).

As águas residuais são chamadas de drenagens ácidas de mina (AMD) (Figura 1), sua formação ocorre quando os minerais sulfetados são oxidados em contato com a água e oxigênio (JOHNSON, 2003). Além disso, minerais sulfetados insolúveis em ácidos, como a pirita ( $\text{FeS}_2$ ), podem ser oxidados na presença de ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e água, liberando ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) solúvel e outros compostos de ferro ligados ao enxofre (tiosulfato -  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) (Equação 1) (JOHNSON, 2003).



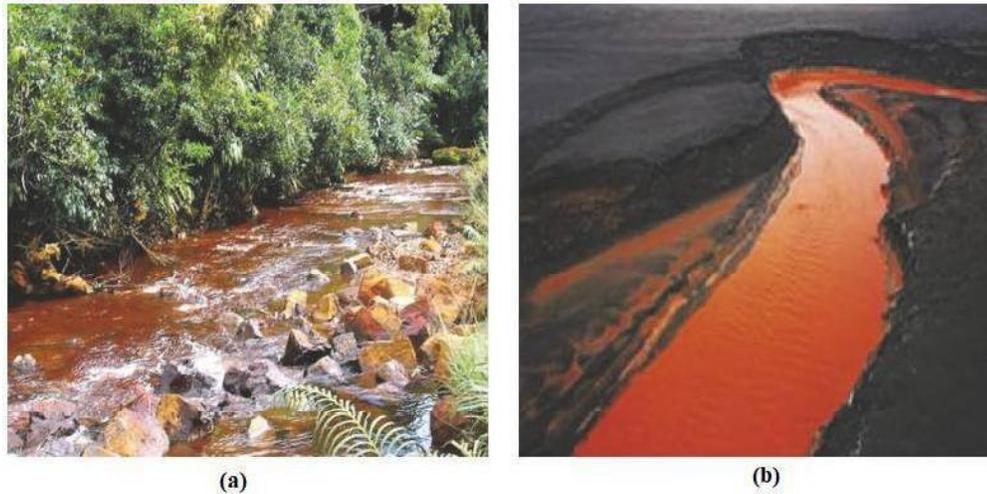


Figura 1. (a) Drenagem ácida da mina de carvão, Jaintia Hills e (b) AMD de resíduos de mina no Canadá (NANCUCHEO et al., 2017).

O  $\text{Fe}^{2+}$  liberado pode ser oxidado por microrganismos acidófilos oxidantes de ferro, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, regenerando o  $\text{Fe}^{3+}$ , mas com a sua mobilidade aumentada. Neste cenário, o pH tende a reduzir e a concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  móvel a aumentar, favorecendo a solubilização da pirita e de minerais sulfetados solúveis em ácidos (Equação 2). Os sulfetos resultantes são solubilizados por microrganismos oxidantes de enxofre (Equação 3) (JOHNSON, 2003).



Por isso as drenagens ácidas de mina representam um grave problema ambiental, pois apresentam uma grande quantidade de sulfato dissolvido, uma variedade de metais e metaloides dissolvidos e pH muito baixo, em torno de 2-3 (BANKS et al., 1997; JOHNSON, 2003; HALLBERG, 2010). De modo que apresentam valores acima dos descritas nas normas da Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 357 (BRASIL, 2005) e nº 430 (BRASIL, 2011) (Tabela 1), que estabelecem diretrizes e procedimentos para avaliação da qualidade dos corpos hídricos e estabelece parâmetros para a liberação de efluentes de fontes

poluidoras no ambiente, delimitando uma concentração de no máximo 250 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato dissolvido, 1 mg.L<sup>-1</sup> de cobre dissolvido e pH entre 6 - 9.

Tabela 1. Normas da Resolução CONAMA n° 357 e n° 430, para efluentes de fonte poluidoras lançados em um ambiente natural.

	Valores
<b>pH</b>	6,0 até 9,0
<b>Sulfato</b>	< 2,06 mM (< 250 m g.L <sup>-1</sup> )
<b>Cobre dissolvido</b>	< 0,015 mM (< 1 m g.L <sup>-1</sup> )

Essa grande concentração de metais e o pH ácido da AMD pode ocasionar vários efeitos deletérios para o ambiente. Além de, os metais permanecerem no ambiente por um longo período, acumulando-se em vários níveis tróficos, devido à magnificação trófica. Provocando sérios problemas metabólicos, comprometendo o desenvolvimento dos indivíduos e ocasionando a sua morte (SIMATE; NDLOVU, 2014).

### 3.2.Tratamentos da AMD

Os métodos para o tratamento de AMD podem ser divididos em tratamentos químicos (Figura 2) e biológicos (Figura 3), e subdivididos em ativo, que requerem entradas contínuas de recursos para sustentar o processo, e passivo, que requerem uma entrada mínima de recursos depois de estarem operando (JOHNSON; HALLBERG, 2005).

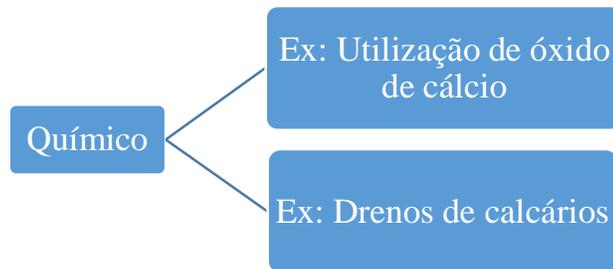


Figura 2. Tratamentos Abióticos.

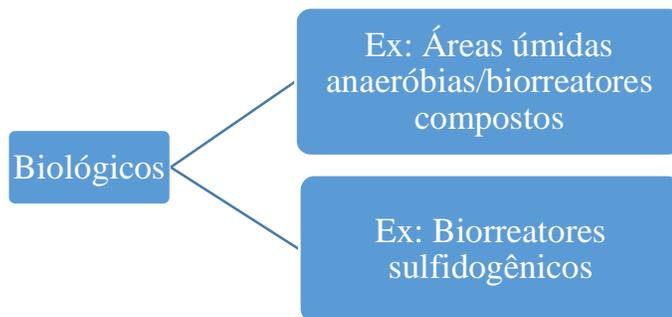


Figura 3. Tratamentos Biológicos.

O tratamento mais utilizado é o tratamento químico ativo que envolve a adição de um agente químico neutralizante, como a cal (óxido de cálcio - CaO) ou carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), que aumenta o pH, acelera a taxa de oxidação química de ferro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) e causa a precipitação de uma variedade de metais na forma de hidróxidos ou carbonatos. Apesar de ser um método eficiente, ele apresenta a desvantagem de gerar altos custos operacionais e produzir uma grande quantidade de lodo rico em metal e sulfato (COULTON; BULLEN; HALLETT, 2003; JOHNSON; HALLBERG, 2005).

Drenos de calcário anóxico, desenvolvido por Kleinmann e colaboradores (1998), é um exemplo de tratamento químico passivo. Os drenos são canais por onde a drenagem flui formados por uma camada de cascalho de calcário impermeável ao ar e água, nesse sistema o objetivo é aumentar o pH da água e deixar o ferro em sua forma reduzida evitando a sua oxidação e a precipitação de hidróxido de ferro. Porém, em concentrações significativas de ferro e alumínio, há a formação de hidróxidos que diminuem a permeabilidade do dreno além de possibilitar a dissolução do cascalho devido a formação de géis carbonáticos dentro do dreno (EVANGELOU, 1998; JOHNSON; HALLBERG, 2005).

Os sistemas de tratamentos biológicos utilizam microrganismos para reduzir os poluentes contidos na AMD. O principal tratamento biológico passivo são as áreas úmidas (*wetlands*), como as áreas úmidas aeróbias que são utilizadas em águas alcalinas nas quais a principal remediação é a oxidação do Fe<sup>3+</sup>, hidrólise do Fe<sup>2+</sup> e remoção de metaloides, como o arsênio (JOHNSON; HALLBERG, 2005).

Outro tratamento passivo é a utilização de áreas úmidas anaeróbias/ biorreatores compostos (*anaerobic wetlands/ compost bioreactors*). Nesses sistemas, em instalações construídas abaixo do solo, a principal reação que ocorre é a redução de sulfato, que irá

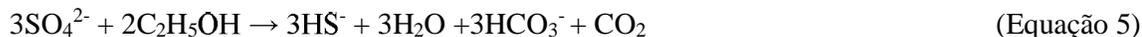
aumentar o pH e gerar sulfeto para precipitação de metais. Porém esse sistema é bastante desvantajoso, por ser caro, requerer uma grande área para instalação e ter eficiência imprevisível (JOHNSON; HALLBERG, 2005).

Nos tratamentos biológicos ativos são utilizados os biorreatores sulfidogênicos, que utilizam o sulfeto de hidrogênio produzido por SRBs para aumentar o pH e remover metais na forma de sulfetos insolúveis, por meio da precipitação seletiva controlada pelo pH (STEUDEL, 2000; NANCUCHEO; JOHNSON, 2012). Os biorreatores podem ser *on-line*, precipitam o metal dentro do próprio biorreator, ou podem ser *off-line*, precipitam os metais de interesse em um segundo compartimento (como frasco lavador ou outro reator). (JOHNSON; HALLBERG, 2005; JAMESON et al., 2010).

Duas tecnologias utilizando biorreatores *off-line* já foram descritas e colocadas em prática para o tratamento de AMD: o processo Thiopaq (*Thiopaq processes*) e o sistema Biosulfide (*Biosulfide system*).

O Thiopaq, desenvolvido pela companhia PAQUES, começou a ser utilizado em 1992 para o tratamento de águas subterrâneas ácidas da refinaria de zinco Budelco da Holanda. Em 1995, uma planta piloto também foi utilizada para tratar água com elevadas concentrações de metais e metaloides da mina de cobre Kennecott, em Bingham Canyon, Utah, EUA. Neste sistema, o cobre foi recuperado com uma eficiência de 99,9% (BOONSTRA et al., 1999).

O Thiopaq é dividido em quatro etapas (Figura 4): no biorreator 1 ocorre a redução de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) em condições anaeróbicas por SRBs, utilizando hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) como doador de elétrons e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como fonte de carbono (Equação 4) ou etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) como fonte de carbono e doador de elétrons (Equação 5) (BOONSTRA et al., 1999), produzindo sulfeto ( $\text{HS}^-$ ) que é direcionado a outro frasco.



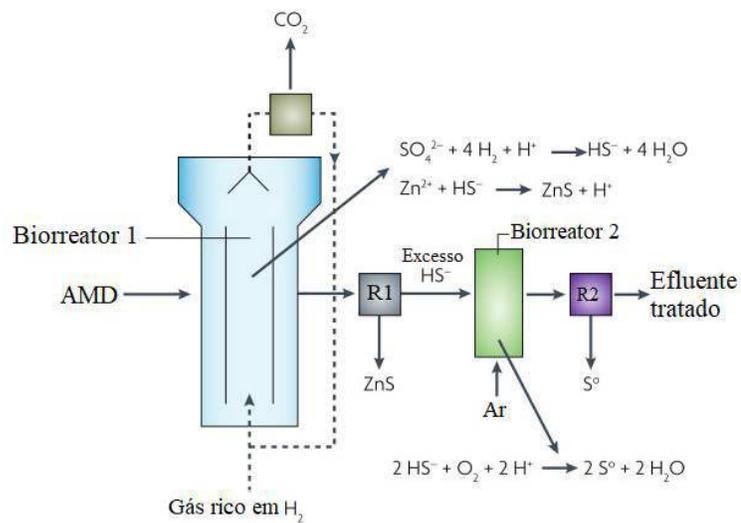


Figura 4. Esquema gráfico dos biorreatores e processos do Thipaq (MUYZER; STAMS, 2008). AMD: Drenagem ácida de mina. R1: Reator que recupera o metal sulfetado; R2: separador de placas inclinado para a recuperação de enxofre. No biorreator 1 ocorre a redução do sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfeto ( $\text{HS}^-$ ). O sulfeto passa para o reator (R1), onde irá reagir com metais, precipitando metais sulfetados (como o sulfeto de zinco –  $\text{ZnS}$ ). No biorreator 2 ocorre a oxidação do excesso de sulfeto gerando enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ). E no reator 2 (R2) o enxofre é separado.

O biorreator 2, aeróbio, contém *Acidithiobacillus* spp. que oxidam o excesso de sulfeto em enxofre elementar, que não foi precipitado como metal sulfetado, aumentando o pH no biorreator (Equação 6). O enxofre é separado em um separador de placas (R2) inclinado e o metais sulfetados são separados em um outro reator (R1) (BOONSTRA et al., 1999).



O sistema Biosulfide utiliza dois biorreatores que operam independente, um reator químico por onde a AMD entra em contato com sulfeto de hidrogênio gerado no biorreator biológico. No biorreator químico é realizado o controle de pH e concentração de sulfeto para separação seletiva dos metais. Parte da AMD tratada no biorreator químico entra no biológico para fornecer sulfato para as SRBs. Para aumentar o pH da água, além da alcalinidade produzida

por SRBs, um agente alcalino também pode ser utilizado no biorreator químico (ROWLEY et al., 1997; JOHNSON; HALLBERG, 2005).

### 3.3. Microrganismos Sulfato Redutores

Microrganismos sulfato redutores possuem a capacidade de realizar a redução dissimilatória de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ou enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ) a sulfeto ( $\text{HS}^-$ ) (MUYZER; STAMS, 2008). São organismo de respiração anaeróbia e podem estar presentes em diferentes ambientes que contém sulfato, desde solo, água doce, sedimentos marinhos, lamas de vulcões, drenagem ácida de mina e até em lagos com água salgada (MUYZER; STAMS, 2008).

A maioria dos sulfatos redutores são bactérias pertencentes a classe Deltaproteobacteria (como os dos gêneros *Desulfovibrio* spp.), seguindo por aqueles dentro da classe Clostridia (gêneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* e *Desulfosporomusa*), linhagens termófilas Nitrospirae (gênero *Thermodesulfovibrio*), Thermodesulfobacteria (gênero *Thermodesulfobacterium*) e Thermodesulfobiaceae (gênero *Thermodesulfobium*). Apenas duas linhagens de arqueias são redutores de sulfatos, Euryarchaeota (gênero *Archaeoglobus* e as termoacidófilas moderadas do gênero *Thermoplasma*), e Crenarchaeota (gênero *Thermocladium*, *Caldirvirga* e as termoacidófilas gêneros *Acidianus*, *Stygiolobus*, *Sulfurisphaera*) (MUYZER; STAMS, 2008; JOHNSON; HALLBERG, 2009).

A maioria das SRBs apresentam um pH ótimo de crescimento entre 6 e 8 e são mesófilas (WIDDEL, 1998), mas algumas já foram isoladas de ambientes com temperatura extrema, como as termófilas *Thermodesulforhabdus norvegicus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfotomaculum* spp.) (BEEDER; TORSVIK; LIEN, 1995; ZELLNER et al., 1989) e as psicrotolerantes *Desulfobacter psychrotolerans*, *Desulfovibrio cuneatus* e *Desulfovibrio litoralis* (SASS et al., 1998; TARPGAARD; BOETIUS; FINSTER, 2006; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015). Dois *Desulfosporosinus*, *D. acididurans* e *D. acidiphilus*, foram descritos com a capacidade de sobreviver em ambientes ácidos, entre 3,8 e 5,5, apresentando pH ótimo de crescimento de 5,5 (*D. acididurans*) e 5,2 (*D. acidiphilus*) (ALAZARD et al., 2010; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015).

Para que o sulfato seja utilizado por esses microrganismos como acceptor final de elétrons ele precisa primeiramente ser ativado. Isso é necessário pois o sulfato é um acceptor de elétrons desfavorável, por possuir um par redox sulfato-sulfito com um potencial de redução

( $E^\circ$ ) de -516 mV, valor muito negativo para que os mediadores de elétrons, ferredoxina ou NADH, possam reduzi-lo (MUYZER; STAMS, 2008).

O sulfato é então ativado pela enzima ATP sulfurilase, que catalisa a ligação do íon sulfato a um fosfato da ATP formando a adenosina fosfosulfato (*adenosine phosphosulfate* – APS). O sulfato presente no APS é reduzido a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) pela enzima APS redutase liberando adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate* – AMP). Após a formação do sulfito, a enzima sulfito redutase catalisa a reação de sulfito à sulfeto, que será liberado pela célula (Figura 5) (MADIGAN et al., 2010).

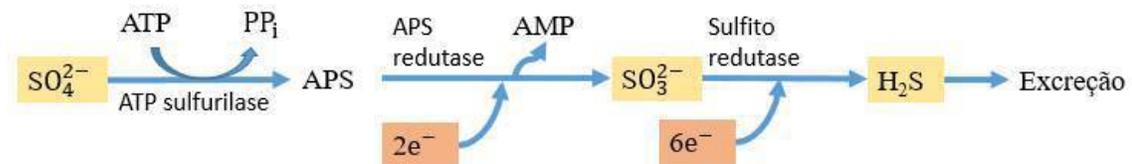


Figura 5. Reação dissimilatória do sulfato (MADIGAN et al., 2010).

Os organismos sulfatos redutores podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sua capacidade de degradação de compostos orgânicos, grupo I: que degradam compostos como o lactato, piruvato, malato, álcoois primários incompletamente a acetato, e grupo II: que degradam compostos, como acetato, lactato, succinato completamente a dióxido de carbono (MUYZER; STAMS, 2008; MADIGAN et al., 2010).

*Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum* e certas espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfosporosinus* são capazes de crescer quimioautotroficamente utilizando hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) como doador de elétrons, sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como aceptor de elétrons e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como única fonte de carbono (ALAZARD et al., 2010; MADIGAN et al., 2010; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015).

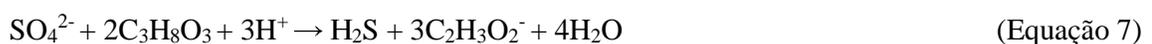
Em lugares ácidos que contém sulfato e ocorre a redução dessa molécula, pesquisadores afirmam que essa redução é causada por bactérias (JOHNSON; HALLBERG, 2009), uma vez que há evidências de que arqueias acidófilas reduzem apenas enxofre elementar a sulfeto (JOHNSON; HALLBERG, 2009), porém o isolamento de SRBs acidófilas ou ácido-tolerantes mostrou-se bastante complicado. Mesmo em lugares ácidos que apresentam sulfidogênese a maioria dos isolados foram SRBs já conhecidas por serem muito sensíveis a ambientes ácidos ( $\text{pH} < 5$ ) (TUTTLE et al., 1969; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015).

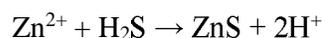
Johnson e Hallberg (2009) apresentam duas possibilidades para a dificuldade em se isolar esses microrganismos: (i) a toxicidade de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como o ácido acético, presentes em pH baixo como moléculas não carregadas/não dissociadas. Essas moléculas são normalmente lipofílicas, entram no citoplasma das células, que mesmo em bactérias acidófilas é neutro, causando a dissociação do ácido, fazendo com que haja uma maior entrada de prótons no citoplasma e uma diminuição do pH do mesmo, provocando morte celular; (ii) o sulfeto de hidrogênio, produzido pelas SRBs, é tóxico para as bactérias em concentrações pequenas como 3 mM e em pH < 4. A forma mais simples de acetato (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em pH ácido está presente na sua forma não dissociada como acetato de hidrogênio ou ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). O ácido acético apresenta uma maior toxicidade para esses microrganismos do que o acetato, sendo tóxico em concentrações maiores que 0,90 mM (REIS et al., 1990).

Devido esse problema, ácidos orgânicos, como o ácido acético, não podem ser usados nos meios de cultivos para SRBs acidófilas como uma fonte de carbono. Até mesmo álcoois, como o glicerol, podem ser compostos problemáticos pois uma grande parte das redutoras de sulfato degradam composto orgânicos incompletamente liberando o acetato como produto, molécula tóxica para SRBs (REIS et al., 1990; KIMURA; HALLBERG; JOHNSON, 2006; JOHNSON; HALLBERG, 2009).

Pesquisas de Johnson e colaboradores (2009) e Kimura e colaboradores (2006) utilizaram bactérias heterotróficas para consumir esse acetato diminuindo sua concentração no cultivo. Para inibir a toxicidade do sulfeto de hidrogênio, é utilizado zinco nos meios de cultura para SRBs, para reagirem com sulfeto de hidrogênio, ocasionando a precipitação em sulfeto de zinco ( KIMURA; HALLBERG; JOHNSON, 2006; JOHNSON; HALLBERG, 2009).

Apesar dessas SRBs produzirem sulfeto que é tóxico, com odor desagradável e provocar a corrosão de canos do sistema de esgoto e da industrial petroquímica, elas também podem ser utilizadas nos tratamentos biológicos de águas residuais com metais pesados, como as AMD, onde a produção de sulfeto (Equação 7) irá reduzir a quantidade de metais pela precipitação na forma de metais sulfetados (Equação 8), diminuir a quantidade de sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) que é utilizado com acceptor de elétrons, e aumentar o pH, pela diminuição de íons dissolvidos (JOHNSON; HALLBERG, 2005; MUYZER; STAMS, 2008; JOHNSON; HALLBERG, 2009).





(Equação 8)

### **3.4. Análise de diversidade de microrganismos com o 16S rRNA**

O gene 16S rRNA ou subunidade menor ribossomal 16S é um dos marcadores moleculares mais utilizados em análises filogenéticas, identificação taxonômica bacteriana e análise da diversidade de microrganismos em um consórcio (CLARRIDGE, 2004). Esse marcador é universal para bactérias e arqueias, facilitando assim as análises filogenéticas (CLARRIDGE, 2004), e análises de diversidade dos microrganismos.

A sequência do gene 16S rRNA apresenta aproximadamente 1550 bp e contém regiões altamente conservadas, possibilitando a construção de *primers*. Ao mesmo tempo, possui regiões hipervariáveis, intercaladas por regiões conservadas, o que possibilita a caracterização da diversidade taxonômica de microrganismos (WOESE et al., 1975; CLARRIDGE, 2004; YANG; WANG; QIAN, 2016). O gene 16S rRNA apresenta 9 regiões hipervariáveis, chamadas de V1 a V9. A região V4 é mais utilizada como marcador genético de bactérias sendo ótima para estudos filogenéticos de bactérias (PEER; CHAPELLE; WACHTER, 1996; YANG; WANG; QIAN, 2016).

#### 4. JUSTIFICATIVA

A drenagem ácida de mina é um dos problemas mais preocupantes produzidos pela indústria mineradora. Apresentando uma água rica em metais e metaloides dissolvidos, grande quantidade de sulfato e um pH muito ácido. Não estando dentro dos limites legais para liberação, de acordo com as resoluções CONAMA nº 357 (Brasil, 2005) e nº 430 (Brasil, 2011), e quando liberado, inadvertidamente, no ambiente pode provocar sérios problemas aos organismos e ao ecossistema como um todo.

Um dos métodos mais utilizados no tratamento de AMD é a utilização de cal (óxido de cálcio – CaO). Apesar de aumentar o pH do meio, é um processo que apresenta altos custos operacionais e produz um lodo rico em sulfato e metais. Produzindo dessa forma outro poluente que precisa ser armazenado em local apropriado.

Devido a ineficiência dos métodos mais utilizados, a utilização de SRBs cultivadas em biorreatores em tratamentos de AMD é bastante atrativa, pois possibilita a redução do sulfato e metais dissolvidos e o aumento do pH do meio. Além de, possibilitar a recuperação de metais de interesse econômico. As SRBs são organismos que realizam a redução dissimilatória de sulfato podendo ser utilizadas em tratamentos biológicos de AMD, pois utilizam o sulfato do ambiente como aceptor de elétrons na redução do sulfato para sulfeto, diminuindo a concentração desse íon no meio. Como a reação de redução de sulfato é próton consumidora, as SRBs aumentam o pH do meio, pela diminuição dos íons  $H^+$  dissolvidos. E podem ocasionar a precipitação de metais de interesse devido a reação desses com o sulfeto de hidrogênio, produto da reação de redução de sulfato.

Apesar de tecnologias utilizando SRBs em biorreatores para o tratamento de AMD já terem sido desenvolvidas e colocadas em prática, como a Thiopaq e Biosulfide, nestes trabalhos foram utilizadas bactérias que não apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes ácidos, fazendo com que haja a necessidade de se utilizar dois reatores ou a adição de um agente neutralizante para aumentar o pH. Aumentando os custos do processo.

Por isso, novos estudos precisam ser realizados na busca de SRBs que apresentem a capacidade de sobreviver em ambientes ácidos e que possam ser utilizadas no tratamento de AMD apresentando um alto desempenho e diminuindo os custos do processo. No projeto descrito foi realizado um estudo de um novo consórcio de bactérias, com capacidade de

sobreviver em ambientes ácidos e possibilitando o tratamento de uma AMD sintética. Monitorando a diminuição da concentração do sulfato no meio, o aumento do pH e a precipitação de metais de interesse econômico. Com os resultados foi possível observar a possibilidade de utilizar esse consórcio no desenvolvimento de uma tecnologia nacional de tratamento de AMD.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo Geral**

Estudo da capacidade de tratamento de drenagem ácida de mina de cobre de um consórcio bacteriano cultivado em biorreator sulfidogênico de bancada ao longo de 342 dias. Analisando a capacidade do consórcio em sobreviver em ambientes ácidos e possibilitando a precipitação de metais de interesse.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- i. Monitorar a mudança de pH em um biorreator de bancada;
- ii. Monitorar o consumo de glicerol;
- iii. Monitorar a produção de acetato;
- iv. Monitorar o consumo de sulfato;
- v. Aferir o crescimento populacional total;
- vi. Aferimento da atividade do sistema transportador de elétrons e a produção de enzimas desidrogenases;
- vii. Estimar a atividade enzimática microbiana total;
- viii. Realizar a quantificação dos biopolímeros (carboidratos, lipídios e proteínas) produzidos pelo consórcio bacteriano;
- ix. Estudar a mudança da diversidade de consórcio por meio da análise do gene que codifica 16S rRNA.

## 6. METODOLOGIA

A contagem do número de células totais e o monitoramento da concentração de glicerol, acetato e sulfato foram realizados duas vezes na semana. A quantificação de biopolímeros, ensaios da atividade enzimática das esterases e desidrogenases foram realizados uma vez na semana. E as amostras para análise de diversidade de microrganismos foram retiradas uma vez na semana. Todos os reagentes utilizados nas análises foram obtidos da Sigma-Aldrich, Alemanha.

### 6.1. Cultivo do consórcio

O consórcio bacteriano utilizado no trabalho é da coleção do laboratório do Dr. Ivan Patricio Nancuqueo Cuevas, pesquisador da *Universidad San Sebastián* (Chile). As bactérias foram isoladas de um sedimento do leito de um rio adjacente a uma mina abandonada de enxofre, no Atacama Chileno (comunicação pessoal, Nancuqueo).

O isolamento foi realizado como descrito por Nancuqueo e colaboradores (2016). As amostras de sedimento superficial foram coletadas e colocadas em tubos falcons estéreis. No laboratório, um volume de 0,5 mL de sais basais (*heterotrophic basal salts* – HBS) com pH 2,5 foi adicionado a 0,5 g de sedimento. Foram realizadas diluições seriadas com a mistura HBS + sedimento, distribuídas em placas de petri com meio sólido de duas camadas para o cultivo.

No preparo do meio sólido de duas camadas, foram utilizados reagentes de alta pureza analítica (Sigma Alemanha), sendo preparado duas soluções (A e B) e uma terceira solução de sulfato de ferro III. A solução A apresentava em sua composição: (i) um volume de 20 mL de HBS, contendo os reagentes nas seguintes concentrações:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (25  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (22,5  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (7,5  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,5  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{KCl}$  (2,5  $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,7  $\text{g.L}^{-1}$ ), com a adição de 770 mL de água de osmose reversa; (ii) 4 mL de glicerol (1 M), (iii) 0,1 g de extrato de levedura; (iv) 7 mL de sulfato de zinco (1 M); (v) 0,875 g de sulfato de magnésio; (vi) 1 mL de elementos traços (*trace elements* - TE) contendo os reagentes nas seguintes concentrações:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 15\text{H}_2\text{O}$  (0,5  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,6  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,5  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1  $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $\text{NaVO}_3$  (0,1  $\text{g.L}^{-1}$ ). A solução B apresentava 5g de agarose (sigma

tipo I) diluídos em 200 mL de água de osmose reversa. As duas soluções foram autoclavadas (121 °C por 20 minutos). A terceira solução de sulfato de ferro III foi filtrada com uma membrana de 0,2 µm.

As soluções foram misturadas à solução de sulfato de ferro III e a mistura foi dividida em porções de mesmo volume. Em uma das porções, foi adicionado um volume de 10 mL de cultura de “*Acidocella aromática*” e 20 mL dessa solução com a bactéria foi inserida em placas de petri (Figura 6a). Após essa camada se solidificar, 20 mL da outra porção do meio sem a adição da bactéria foi adicionada na placa de petri em cima da primeira camada (Figura 6b).

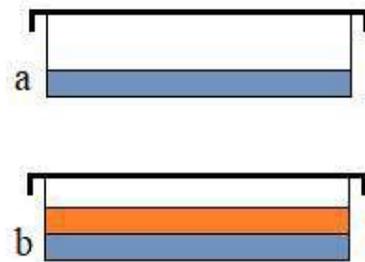


Figura 6. Esquema do meio dupla camada. (a) primeira camada de meio, em azul, contendo “*Acidocella aromática*”; (a) segunda camada de meio em laranja sem bactéria (NANCUCHEO et al., 2016).

As placas que apresentaram um precipitado preto, devido a precipitação do ferro, foram selecionadas e as colônias presentes foram cultivadas em meio líquido. O meio líquido apresentava em sua composição HBS, TE, sulfato de magnésio todos nas concentrações descritas anteriormente, glicerol 4 mM, 0,01% (w/v) de extrato de levedura e 7 mM de sulfato de zinco. O pH do meio foi ajustado para 3,5 com ácido sulfúrico (1 M) e a solução foi autoclavada (121 °C por 20 minutos). Sulfato de ferro III, filtrado, foi adicionada ao meio já resfriado em uma concentração final de 100 µm.

Os cultivos com meio sólido e líquido foram incubados em jarras anaeróbias Oxoid™ AnaeroJar™ Base, Jar (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em uma temperatura de 30 °C, com sachê Oxoid™ AnaeroGen™ 2,5 L Sachet (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) para manutenção do ambiente anaeróbio.

Até a transferência do consórcio para o biorreator, o cultivado era realizado em frascos de 500 mL, com 10 mL de HBS, 0,5 mL de TE, 2 mL de solução de sulfato de zinco (4 mM),

0,05 g de extrato de levedura, 0,437 g de sulfato de magnésio e 3 mM de glicerol, completada para 500 mL com água de osmose reversa e ajustado o pH para 3,5 com ácido sulfúrico. Gás nitrogênio livre de oxigênio ( $150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) era borbulhado para o meio por 30 minutos, para manter as condições anóxicas, e a solução era autoclavada a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos, antes do repique (transferência do consórcio de um meio cultura antigo para o novo meio). O cultivo era incubado em jarras anaeróbias Oxoid™ AnaeroJar™ Base, Jar (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) com sachê Oxoid™ AnaeroGen™ 2,5 L Sachet (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), a uma temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , dentro das jarras também era colocado um tubo falcon com 5 mL de sulfato de cobre, para observar se estava ocorrendo a precipitação do metal.

## **6.2. Montagem do Biorreator**

O cultivo do consórcio de bactérias no biorreator foi realizado de acordo com o descrito no experimento de Santos e Johnson (2016). O experimento durou 342 dias, sendo que o biorreator foi mantido em um período de adaptação durante os primeiros 40 dias, onde o sistema foi mantido em batelada, sem retirada ou entrada de alimentação. Após os 40 dias de adaptação, o biorreator foi mantido em fluxo contínuo até o final do experimento.

Para o preparo inicial do biorreator (Figura 7), foi utilizado um volume de trabalho de 2,3 L. Um volume de 1 L de pérolas de vidro de 2 mm diâmetro foi colocado no reator, ambos estéreis, para auxiliar na colonização das bactérias, com 800 mL de meio de cultura como descrito pelo tópico 6.1. Por 30 minutos gás nitrogênio livre de oxigênio ( $150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) filtrado (filtro de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ ) foi borbulhado para o biorreator, para manter as condições anóxicas e o biorreator foi autoclavado ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos). Após a esterilização e o resfriamento do meio, 500 mL de inóculo foram adicionados.



Figura 7. Biorreator utilizado no experimento. 1: Frasco lavador; 2: Biorreator; 3: Unidade FerMac. 4: AMD de alimentação.

O biorreator de 2,5 L (Figura 8) foi acoplado a unidade FerMac 310/60 (Eletrolab., UK) para controle do pH (pH 5,0) utilizando dois potenciômetros, um em um volume de 1,7 L (superior – pH1) e outro em contato com as pérolas de vidro (inferior – pH2), temperatura (30 °C), agitação (40 rpm) e entrada e saída de fluxo controlada por bombas peristálticas da unidade.

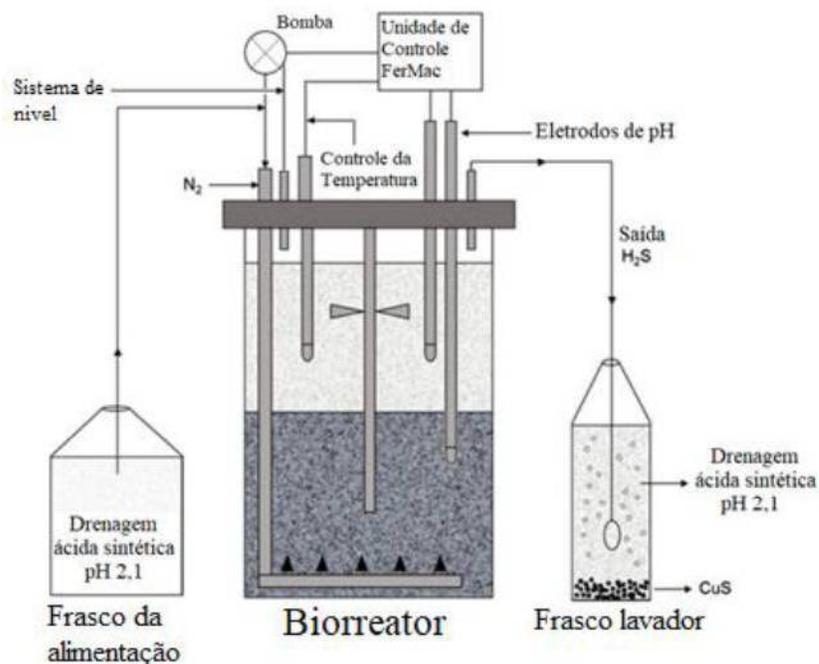


Figura 8. Representação gráfica do biorreator utilizado nos ensaios, ilustração modificada de Santos e Johnson (2017). N<sub>2</sub>: nitrogênio; H<sub>2</sub>S: sulfeto de hidrogênio; CuS: Sulfeto de cobre. As setas representam a direção do fluxo de líquido ou gás.

Para alimentação do biorreator foi utilizada uma AMD sintética baseada na AMD de Sossego descrita por Santos e Johnson (2017) (Tabela 2), com pH ajustado, inicialmente, para 2,1 sem a adição de cobre, com adição, inicialmente, de 3 mM de glicerol, 0.01% de extrato de levedura, HBS e TE (nas concentrações descritas pelo tópico 6.1).

Tabela 2. Composição química da AMD sintética de Sossego adaptado de Santos e Johnson (2017).

Íons	Concentração (mM)
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,00
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .10H <sub>2</sub> O	2,10
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,28
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,27
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,15
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02

Foi acoplado ao biorreator um frasco lavador, para saída do gás H<sub>2</sub>S, com a AMD sintética contendo cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 7,50 mM) para análise da precipitação desse metal. Para manter as condições anóxicas e facilitar a saída de H<sub>2</sub>S, gás nitrogênio livre de oxigênio filtrado (filtro de 0,22 µm) foi bombeado para o biorreator com um fluxo de 150 mL.min<sup>-1</sup>.

O fluxo de entrada da alimentação foi realizado pelo controle de pH, configurado para 5,0. Devido à redução de sulfato ser próton consumidora, as bactérias aumentavam o pH, com o pH > 5,0 ocorria a entrada de líquido para diminuição do pH até o valor configurado (pH = 5,0). A saída foi controlada pelo sistema de nível, quando o líquido ultrapassava o volume de 2,3 L o mesmo era retirado por bombeamento.

No período de adaptação, foi retirado 500 mL de meio e colocado 500 mL de inóculo nos dias 7 e 14 de operação. Após os 40 dias de adaptação, o sistema foi mantido em fluxo contínuo controlado pelo pH, enquanto o pH estivesse acima de 5,0 havia entrada de alimentação.

### 6.3.Crescimento populacional total.

Crescimento populacional total foi analisado pela contagem do número de células bacterianas totais, utilizando uma câmara de Neubauer (Brand, Alemanha) e o microscópio óptico Leica DM 3000 LED (Leica Microsystems, Alemanha). A câmara de Neubauer contém grades quadriculares (grid), subdivididas em 16 quadrados com 0,0625 mm<sup>2</sup> de área e

profundidade de 0,1 mm, nessa área foi adicionado um volume de 10 µL de amostra do biorreator para contagem das células. Células por mL foi calculado pela fórmula descrita nas instruções da câmara para contagem (Equação 9) (Disponível em: [https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlkammern\\_e.pdf](https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_e.pdf)).

$$\text{Células.mL}^{-1} = \left( \frac{\text{Células contadas}}{\text{Quadrados (mm}^2\text{)} \times \text{profundidade da câmara (mm)} \times \text{diluição}} \right) / 10^3 \quad (\text{Equação 9})$$

#### 6.4. Monitoramento das concentrações de glicerol, acetato e sulfato.

As concentrações de glicerol, acetato e sulfato foram monitoradas por cromatografia de íons com o cromatógrafo Dionex™ ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Para verificar a concentração de glicerol das amostras foi utilizado uma coluna Carbo Pac MA1, um detector Amperométrico ED e como eluente foi utilizado uma solução de NaOH (0,5 M) e para concentração de sulfato e acetato foi utilizado a coluna Íon Pac AS-11, com um detector de condutividade e como eluente foi utilizado uma solução de KOH (10 mM) (Tabela 3).

Tabela 3. Condições para análises cromatográficas.

	Coluna	Detector	Eluente
Glicerol	Carbo Pac MA1	Amperométrico ED	NaOH 0,5M
Acetato e Sulfato	Íon Pac AS-11	Condutividade	KOH 10mM

A cromatografia iônica é baseada na reação de adsorção reversível e diferencial dos íons de uma amostra e uma substância sólida (coluna), altamente carregada. Uma amostra aniônica ou catiônica, dependendo do tipo de análise, junto com um eluente é injetada na coluna, onde ocorre a adsorção dos íons da amostra à coluna. Com íons com maior afinidade pelos grupos da coluna, o eluente ajuda a carrear e separar os íons das amostras, fazendo com que esses sejam separados da coluna em tempos de retenção diferentes, devido a afinidade diferencial de cada um. Esses íons separados vão então passar por um detector, que irá analisar e gerar um cromatograma (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997; FELIZZOLA; PIRES, 2012).

Para construção da curva de calibração para análise de glicerol foi utilizada uma solução de glicerol nas concentrações 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM. E para análise de acetato e sulfato foi utilizada uma solução de ácido acético e sulfato de sódio nas concentrações 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM.

### **6.5. Quantificação dos biopolímeros (carboidratos, lipídios e proteínas totais)**

A quantificação de biopolímeros solúveis (carboidratos totais, lipídios totais e proteínas totais) foram realizadas com 1 mL de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria no Biochrom Libra S80 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). A quantificação começou a ser realizadas após o início do fluxo contínuo, no dia 41 de operação.

Os procedimentos utilizados foram adaptados de Dubois e colaboradores (1956) e Gerchacov e Hatcher (1972), para quantificação de carboidratos totais, utilizando glicose como padrão; Hartree (1972), Lowry e colaboradores (1951) e Rice (1982), para quantificação de proteínas totais, utilizando como padrão albumina de soro bovino, fração V; Bligh e Dyer (1959) e Marsh e Weinstein (1966), para quantificação de lipídios totais, utilizando como padrão a tripalmitina.

Para quantificação de carboidratos totais, um volume de 1 mL de amostra foi adicionado 1mL de fenol 5%. A mistura foi então agitada em vortex e incubada por 20 minutos. Após incubação, foi adicionado a mistura 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada à 3000 rpm por 5 minutos. Por fim foi realizada a diluição da amostra, na proporção 1:1, para análise no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 490 nm.

Para quantificação de proteínas totais, foi adicionado à amostra 1 mL de solução alcalina (NaOH 8g.L<sup>-1</sup> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 40g.L<sup>-1</sup>), essa mistura foi incubada por 30 minutos. Após a incubação, 2,2 mL de água deionizada e 0,2 mL de solução de sulfato de cobre/solução de tartarato de sódio e potássio foram adicionados a mistura. Após 15 minutos de incubação, foi adicionado 0,1 mL de Folin. Por fim, depois de 30 minutos de incubação a amostra foi centrifugada à 3000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, foi analisada em comprimento de onda de 660 nm.

Para quantificação de lipídios totais, foi adicionado à amostra um volume de 2,5 mL de metanol e 1,25 mL de clorofórmio, sendo a mistura posteriormente incubada por 10 minutos a 4 °C. Após a incubação, 1,25 mL de água deionizada foram adicionadas e a amostra

centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi separada em duas fases e a fase orgânica transferida para um tubo de ensaio limpo para evaporação. Após a evaporação total do líquido, 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram adicionados ao tubo de ensaio, que foi aquecido a 180 °C por 15 minutos. Em seguida, no tubo de ensaio resfriado foi adicionado um volume de 3 mL de água deionizada e essa mistura foi colocada em tubos de ensaios de 15 mL para centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, a amostra foi analisada em comprimento de onda de 375 nm

#### **6.6. Análise da atividade enzimática microbiana total e análise da desidrogenase.**

Os procedimentos utilizados foram adaptados de Stubberfield e Shaw (1990), para análise da atividade enzimática das esterases e adaptado de Trevors (1984) e Hourri-Davignon e Relexans (1989), para análise de desidrogenase. Todas as análises foram realizadas em triplicata, com 1 mL de amostra em cada tubo, e analisadas por espectrofotometria utilizando o Biochrom Libra S80 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Os dois ensaios começaram a ser realizados após o início do fluxo contínuo.

O ensaio que gera uma estimativa da atividade enzimática microbiana total de uma amostra, é realizado pela hidrólise do diacetato de fluoresceína à fluoresceína, que pode ser realizado por uma variedade de enzimas incluindo esterases, proteases e lipases (STUBBERFIELD; SHAW, 1990; MAIER; PEPPER; GERBA, 2009).

Um volume de 1 mL de amostra foi tratado com um volume de 19 mL de solução tampão de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M e NaOH 0,1 M) e 100 µL de diacetato de fluoresceína (10 µg.mL<sup>-1</sup>). A mistura foi incubada em um shaker a 24 °C por 75 minutos, protegida da luz. Após os 75 minutos, a solução foi para um banho de gelo por 10 minutos para parar a reação das enzimas com o diacetato de fluoresceína. Por fim a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi analisado em um espectrômetro em um comprimento de onda de 490 nm. Os dados foram expressos em µg fluoresceína. h<sup>-1</sup>. mL<sup>-1</sup> usando uma curva padrão de calibração de fluoresceína. O controle (branco) foi preparado com 19 mL de tampão fosfato e 100 µL de acetona.

O ensaio de desidrogenase fornece uma estimativa do metabolismo aeróbio e anaeróbio de uma amostra pela medição da atividade do sistema transportador de elétrons da respiração (*Electron transport system activity* – ETSA), por meio da reação catalisada por um conjunto de

enzimas desidrogenases. Estas enzimas intracelulares catalisam as reações de oxido-redução que ocorrem na respiração (HOURI-DAVIGNON; RELEXANS, 1989; MAIER; PEPPER; GERBA, 2009).

Para o experimento, um volume de 1 mL de amostra e 0,2 mL de INT (cloreto de 2-[(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium]) 8 mM foram adicionados em tubos de ensaio com tampa. A mistura foi incubada, protegida da luz, por 35 minutos após esse tempo foi adicionado 5 ml de metanol, para extração do INT formazan produto da reação catalisada pela desidrogenase com o INT. Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada (10 minutos a 3000 rpm) e analisada em comprimento de onda de 475 nm. O controle foi preparado com 1 mL de água deionizada e 5 mL de metanol. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{L O}^2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$  utilizando para o cálculo uma curva padrão de calibração INT-formazan sintético.

## **6.7. Mudança da diversidade de consórcio contido no biorreator**

A análise de diversidade dos microrganismos contidos no biorreator foi realizada por meio do sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA e análise posterior desse fragmento utilizando o protocolo do QIIME. As amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas em períodos de 50 em 50 dias, após a fase de adaptação do biorreator, e uma amostra do inóculo foi analisada para comparação. No total 7 amostras foram sequenciadas e analisadas.

### **6.7.1. Extração do DNA**

Um volume de 40 mL de cada amostra foi filtrado em membranas de acetato de celulose (Merck Millipore, USA) de 0,2  $\mu\text{m}$  tamanho de poro e 25 mm de diâmetro. As bactérias aderidas às membranas foram submetidas a extração de DNA utilizando o kit PowerSoil Ultraclean Microbial DNA Isolation Kits (MoBio, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Para confirmar e averiguar a integridade e a qualidade do DNA, o mesmo foi submetido a eletroforese em gel de 1% de agarose com 10x tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), por 40 minutos a 90 V. Tampão de carregamento (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25% e água ultrapura) e SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) foram utilizados por amostras. A quantificação do DNA em  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  foi realizada com o Qubit® 2.0 fluorometer com o kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Invitrogen™).

### 6.7.2. Amplificação do gene 16s rRNA

Para amplificação da região V4 do gene 16S rRNA do consórcio de bactérias, foram realizadas duas reações em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). Na primeira PCR, foram utilizados os *primers* 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVG GGTWTCTAAT-3') (CAPORASO et al., 2012). A reação da PCR 1 continha 1- 2 ng de DNA para um volume final de 50 µL de reação, 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM de cada iniciador, 0,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, EUA) e 1 x de tampão de reação (Invitrogen, CA, EUA).

As reações 1 foram submetidas às seguintes condições de termociclagem: temperatura inicial de desnaturação 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e um período final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

Na segunda PCR, foram utilizados os *primers* 806R (5'-GGACTACHVG GGTWTCTAAT-3') e 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') contendo *barcodes* (Invitrogen, CA, EUA) de 13 bp (CAPORASO et al., 2012). Para cada amostra foi utilizado um *barcode* diferente, com a finalidade de identificar a amostra na análise posterior. A reação continha as mesmas concentrações dos reagentes utilizados na primeira reação. As reações 2 (PCR 2) foram submetidas as mesmas condições de termociclagem da primeira reação, com mudança apenas da temperatura de anelamento de 50 °C para 62 °C.

Os produtos da PCR 2 foram purificados com o QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e submetidos a eletroforese em gel de 1% de agarose com 10 x tampão TBE, por 45 minutos a 90 V. A quantificação foi realizada com o Qubit® 2.0 fluorometer com o kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Invitrogen™).

### 6.7.3. Sequenciamento

Os *amplicons*, obtidos na PCR 2, foram sequenciados no Ion Torrent PGM™ Hi-Q™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante para sequenciamento das bibliotecas *single-end*.

Para construção das bibliotecas *single-end*, foi realizada uma mistura de uma mesma concentração de DNA de cada *amplicon*. Cálculo para volume de cada amostra de PCR utilizada na mistura da biblioteca é fornecido pelo fabricante do protocolo de sequenciamento

(Thermo Fisher Scientific, MA, USA). A mistura dos *amplicons* foi utilizada na PCR em emulsão para bibliotecas, para isso foi utilizado o Ion OneTouch™ 2 System Q™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e os kit Ion PGM Hi-Q View OT2 reagentes, Ion PGM Hi-Q OT2 solutions e Ion PGM OT2 supplies Q™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a análise da qualidade do PCR em emulsão foi utilizado o Qubit® 2.0 fluorometer e o Ion Sphere™ Quality Control Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para o enriquecimento da amostra foi utilizado o Ion PGM™ Enrichment Beads e o Ion OneTouch™ ES (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

O produto do enriquecimento foi sequenciado em microchip Ion 318 Chip kit v2 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), utilizando os kit Ion PGM sequencing supplies, Ion PGM Hi-Q View sequencing solutions, sequencing dNTPSs (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) no sequenciador Ion Torrent PGM™ Hi-Q™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

#### **6.7.4. Análise dos dados**

Após o sequenciamento, todas as amostras foram analisadas utilizando o programa QIIME (*quantitative insights into microbial ecology*) versão 1 para o sistema operacional Linux. O QIIME é um *pipeline* de código aberto que possibilita a análise filogenética, classificação de sequências dentro de unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic unit* - OTUs) e análise de diversidade de microrganismos (CAPORASO et al., 2010). Para a análise foi utilizado o protocolo estabelecido pelo *Brazilian Microbiome Project* (BMP – disponível em: <http://www.brmicrobiome.org/>) (PYLRO et al., 2014).

##### **6.7.4.1. Demultiplexação**

Primeiramente as amostras foram demultiplexadas. O arquivo que é gerado pelo sequenciador apresenta todas as amostras agrupadas em um só arquivo, porém cada amostra apresenta um adaptador (*barcode*) que a identifica. Para detectar a origem das sequências o arquivo precisa ser demultiplexado. Então, um arquivo barcode.txt foi criado, contendo os adaptadores que foram utilizados em cada amostra e seus respectivos códigos. Utilizando o

**comando fastx\_barcode\_splitter.pl** a amostra foi demultiplexada baseada na sequência do *barcode* e ao final cada sequência de *reads* foi identificada.

Após a demultiplexação, o *primer* 515F (5'-GTGCCAGCNGCCGCGGTAA-3') e adaptadores foram retirados das sequências utilizando o comando **fastq\_strip\_barcode\_relabel2.py**. Ao final, um arquivo do tipo fastq foi gerado.

#### 6.7.4.2. Normalização do número de *reads*

Antes da análise taxonômica, foi realizado a normalização do número de *reads* de cada amostra. A amostra com menor número de *reads* totais foi utilizada como padrão de corte para as outras. Utilizando o comando **seqtk sample -s 100 <input.fastq> <number\_of\_reads> > <output.fastq>** o número de *reads* de cada amostra foi reduzido aleatoriamente de acordo com o padrão para que ao final cada amostra apresentasse o mesmo número de *reads*. Após a normalização, as sequências quiméricas foram retiradas com o comando **vsearch --uchime\_ref otus1.fasta --db trainset16\_022016.rdp.fasta --nonchimeras otus.fasta**.

#### 6.7.4.3. Identificação taxonômica até gênero utilizando o programa QIIME.

Após a normalização e a retirada de quimeras, as amostras passaram por um filtro de qualidade, permitindo apenas erro menor ou igual a 1%, sendo o arquivo posteriormente convertido ao formato fasta, além disso, as *reads* foram truncadas a 200 pb com o *script* **vsearch --fastx\_filter ../\$1 --fastq\_qmax 64 --fastq\_maxee 1.0 --fastq\_trunclen 200 --fastaout \${newfile}\_clipped.fasta**. Em seguida foi realizada a dereplicação, que seria a exclusão de sequências repetidas, com o *script* **vsearch --derep\_fulllength \${newfile}\_clipped.fasta --output \${newfile}\_derep.fasta --sizeout**. A dereplicação gerou o arquivo *\_derep.fasta* que foi utilizado no passo seguinte.

As OTUs então passam por um filtro de sequências *singletons*, onde aquelas que são observadas menos de duas vezes foram removidas. As OTUs foram agrupadas utilizando o método de UPARSE (EDGAR, 2013), agrupadas com uma porcentagem de identidade igual ou maior que 97%. O próximo passo foi o mapeamento de *reads* de volta para o banco de dados de OTUs, gerando arquivos *\_map.uc*. As *reads* foram mapeadas para um agrupamento de OTU utilizando como parâmetro a identidade maior ou igual a 97%.

A classificação taxonômica das OTUs foi realizada utilizando o banco de dados do RDP (*Ribosomal Database Project*) (COLE et al., 2014) com o *script assign\_taxonomy.py*. O *script align\_seqs.py* foi utilizado para o alinhamento das sequências com as sequências de referência do banco de dados do *Greengenes* (<http://greengenes.secondgenome.com/>).

As sequências foram então filtradas (com *filter\_alignment.py*), uma árvore de referência foi criada (com *make\_phylogeny.py*). Os arquivos *\_map.uc*, gerados no mapeamento das *reads*, foram convertidos a *otu\_table.txt* (com *uc2otutab.py*). A *otu\_table.txt* foi convertida a *otu\_table.biom*, e os metadados de taxonomia foram adicionados a essa tabela. As informações contidas na *otu\_table.biom* foram resumidas com *biom summarize-table* gerando um arquivo *\_biom\_table*. E como parâmetro de cobertura de sequenciamento para sub-amostragem e cobertura máxima de rarefação foi utilizado o valor mínimo de OTU necessário para análise de diversidade.

Para a análise de diversidade foi utilizado o *script core\_diversity\_analyses.py* através de aplicações métricas não filogenéticas. Para análise de diversidade alpha e beta e as curvas de rarefação, foi utilizado o *script alpha\_diversity.py* e *beta\_diversity.py*, respectivamente. Ao final dessas análises, foram gerados os histogramas de distância, gráficos de barras da taxonomia, gráfico 3D da PCoA, matrizes de distância e das coordenadas principais e gráficos das curvas de rarefação.

#### **6.7.5. Identificação taxonômica até espécie e árvore filogenética de SRBs.**

O programa QIIME gera a identificação dos organismos até gênero. Para a identificação da espécie, as sequências das bactérias dominantes foram submetidas ao banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando a ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para construção de um dendrograma de SRBs, as sequências de bactérias e arqueias que podem reduzir sulfato foram buscadas e obtidas do banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas sequências, junto com a sequência identificada como pertencente a uma bactéria redutora de sulfato pelo QIIME, foram alinhadas utilizando o programa CLUSTL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e editadas manualmente utilizando o programa Bioedit (HALL, 2011). Para construção do dendrograma foi utilizado o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 7 (KUMAR; STECHER;

TAMURA, 2016) utilizando o método de Máxima verossimilhança (YANG, 1994) e o modelo Kimura 2-parameter (KIMURA, 1980), com 1000 replicatas de Bootstrap.

### **6.8. Análise estatística**

O programa PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) para Windows 10 foi utilizado nas análises estatísticas que foram realizadas no trabalho.

Os dados foram agrupados em três conjuntos de dados, (i) utilizando os dados dos resultados de todas as análises realizadas durante os 342 dias de experimento, exceto a análise de diversidade de microrganismos, (ii) utilizando os dados normalizados da quantificação de biopolímeros, atividade do sistema transportador de elétrons, atividade enzimática das esterases e crescimento populacional e (iii) utilizando os dados obtidos de todas as análises realizadas, selecionando apenas os dias utilizados para análise de diversidade dos microrganismos.

Em todos os conjuntos de dados foram realizados o teste de Kruskal-Wallis, utilizando  $\rho < 0,05$  para determinar aquelas com mudanças significativas. O teste Kruskal-Wallis é um teste de análise de variância que irá comparar se há uma diferença significativa em um conjunto de dados (THEODORSSON-NORHEIM, 1986). Diferente do ANOVA, o teste Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico, sendo assim, esse teste não necessita que os dados estejam em uma distribuição normal ou sejam homogêneos (BIANCONI et al., 2008).

Para o primeiro conjunto de dados foi realizado também o teste de correlação com o coeficiente de correlação de Spearman  $r_s$ , com  $\rho < 0,05$  para aquelas que apresentaram uma correlação. O teste de correlação com coeficiente de Spearman  $r_s$  é um teste não paramétrico, que irá determinar o grau de associação entre duas amostras (ou, no caso, análises) (AYRES et al., 2007).

No segundo conjunto de dados, foi realizado o teste Mann-Whitney *pairwise post-hoc*. Esse é um teste não paramétrico e é realizado para observar quais grupos específicos de variáveis independentes são diferentes um do outro de forma estatisticamente significativa, após uma análise multivariada não paramétrica. Como base, foi utilizado  $\rho < 0,05$  e devido à natureza dos dados, não foi utilizado a correção de Benferroni. (AYRES et al., 2007; PORTAL ACTION, acesso: 28/01/2019).

E no terceiro conjuntos de dados foi realizada a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*). A PCA é um algoritmo matemático que reduz a

dimensionalidade dos dados, mantendo a maior parte da variação no conjunto de dados. As componentes principais, são direções nas quais a variação dos dados é máxima. Utilizando apenas alguns componentes, cada amostra pode ser representada por relativamente poucos números em vez de valores variáveis muito grandes. Ao final, um gráfico é gerado onde poderá ser analisado visualmente se há uma correlação ou não entre amostras e determinar se as amostras podem ser agrupadas (RINGNÉR, 2008).

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1. Mudança do pH

O experimento foi realizado em um total de 342 dias, operando por 40 dias em sistema de batelada, período de adaptação, onde não havia entrada ou saída de líquido. Devido à baixa diferença no número de células totais e variação do pH, nesse período, nos dias 7 e 14 de operação, houve retirada de um volume de 500 mL de líquido do reator e 500 mL de inóculo foi adicionado.

Após os 40 dias de adaptação, o biorreator foi operado em fluxo contínuo, onde a entrada de alimentação era controlada pelo aumento do pH, configurado para estar em 5,0. Quando o pH estava acima de 5,0 havia entrada de alimentação por bombeamento controlado pela unidade FerMac 310/60. Esse aumento do pH era controlado apenas pelo metabolismo de algumas bactérias, como as bactérias redutoras de sulfato que utilizam o  $H^+$  na redução dissimilatória de sulfato a sulfeto, provocando o aumento do pH (MUYZER; STAMS, 2008). Para manter o volume de 2,3 L dentro do biorreator, um sistema de nível foi configurado, quando o volume ultrapassava 2,3 L o líquido era retirado por bombeamento pelo sistema de bombas da unidade FerMac 310/60.

Dois potenciômetros foram utilizados para aferir o pH dentro do biorreator, pH1 posicionado em um volume de 1,7 L e pH2 em contato com as pérolas de vidro. A aferição do pH foi realizada para observar se: (i) o consórcio apresentava a capacidade de sobreviver em ambientes ácidos, (ii) se o consórcio poderia elevar o pH do meio e (iii) controle do pH dentro do biorreator. O consórcio foi cultivado inicialmente em pH 3,5 e durante o período de adaptação não houve mudança do meio, além do acréscimo de inóculo nos dias 7 e 14 descritos anteriormente, e no dia 32 foi adicionado 6 mL de glicerol 1 M, para estimular o crescimento populacional.

Ao final do período de adaptação o consórcio foi capaz de aumentar o pH do meio para 4,38 (pH1) e 4,49 (pH2) (Figura 9), mostrando que o mesmo apresenta a capacidade de sobreviver em pH ácido e aumentar o pH do meio. Com os resultados da análise do gene 16S rRNA, que serão mostrados no tópico 7.6, sabe-se que SRBs fazem parte desse consórcio, essas bactérias são conhecidas pela sua utilização no tratamento de AMD e sua capacidade de aumentar o pH do ambiente (BOONSTRA et al., 1999; SANTOS; JOHNSON, 2017). Isso é

possível pois esses organismos utilizam o  $H^+$  presente no meio na reação de redução de sulfato a sulfeto, diminuindo a concentração de  $H^+$  e aumentando o pH (MUYZER; STAMS, 2008).

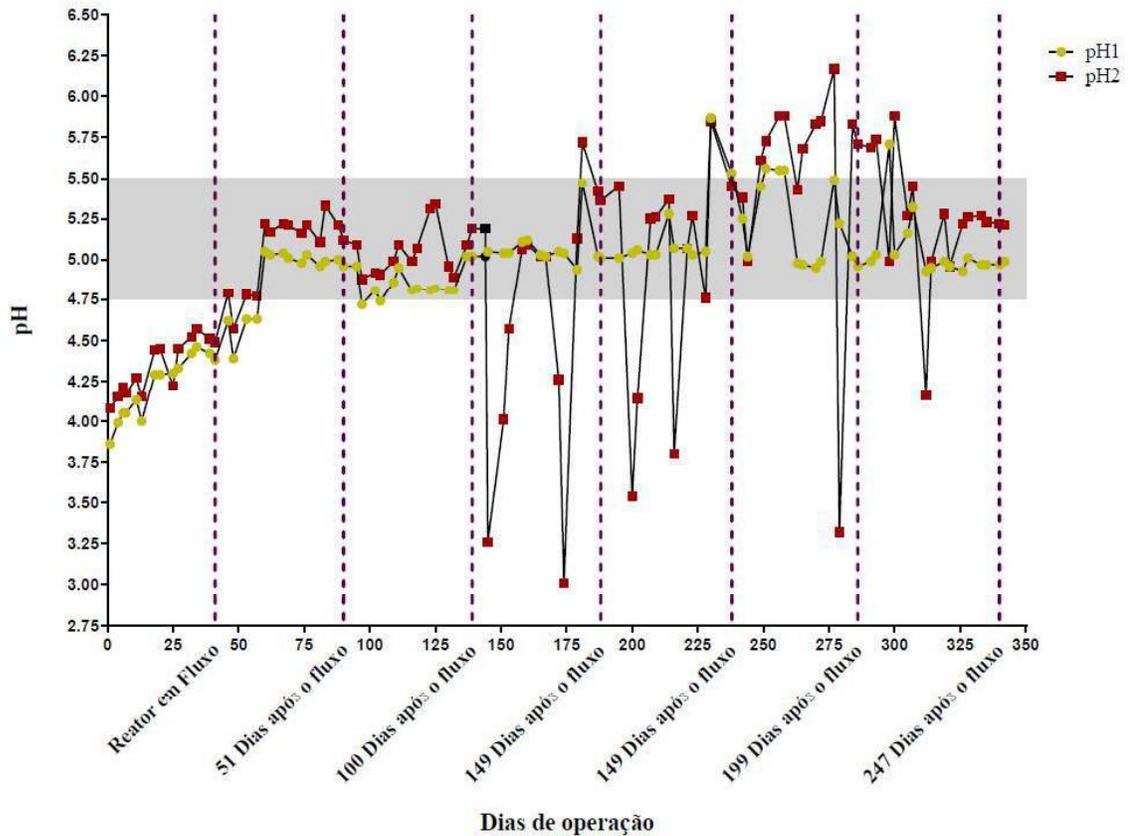


Figura 9. Mudança de pH ao longo dos dias de operação do experimento. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo, marcado pela linha descrita como Reator em Fluxo. O retângulo em cinza está marcando a faixa de pH entre 4,75 e 5,50. O dia 144 de operação apresenta os pontos com a coloração preta.

Após o período de adaptação, o consórcio começou a ser alimentado com uma AMD sintética com pH 2,1 até o dia 144 de operação, onde o pH variou de 4,38 - 5,19 (Figura 9). Após o dia 144, o pH da AMD sintética que alimenta o biorreator passou de 2,1 para 2,5. Essa alteração foi realizada pois o fluxo em pH 2,1 estava bastante intenso, aumentando de  $4 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ , no dia 125 de operação, para  $120 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ , no dia 139 de operação (Figura 10). A alteração do pH de 2,5 para 2,1 mostrou-se ser um dos fatores para aumento da taxa de fluxo em outros

trabalhos (SANTOS; JOHNSON, 2017). Uma maior entrada de alimentação aumenta a reação de redução de sulfato para sulfeto, o que aumenta o pH do meio. E devido o aumento do pH do meio, acima de 5,0, há um aumento na taxa de entrada da alimentação para forçar o pH a diminuir o seu valor para o parâmetro configurado (pH 5,0).

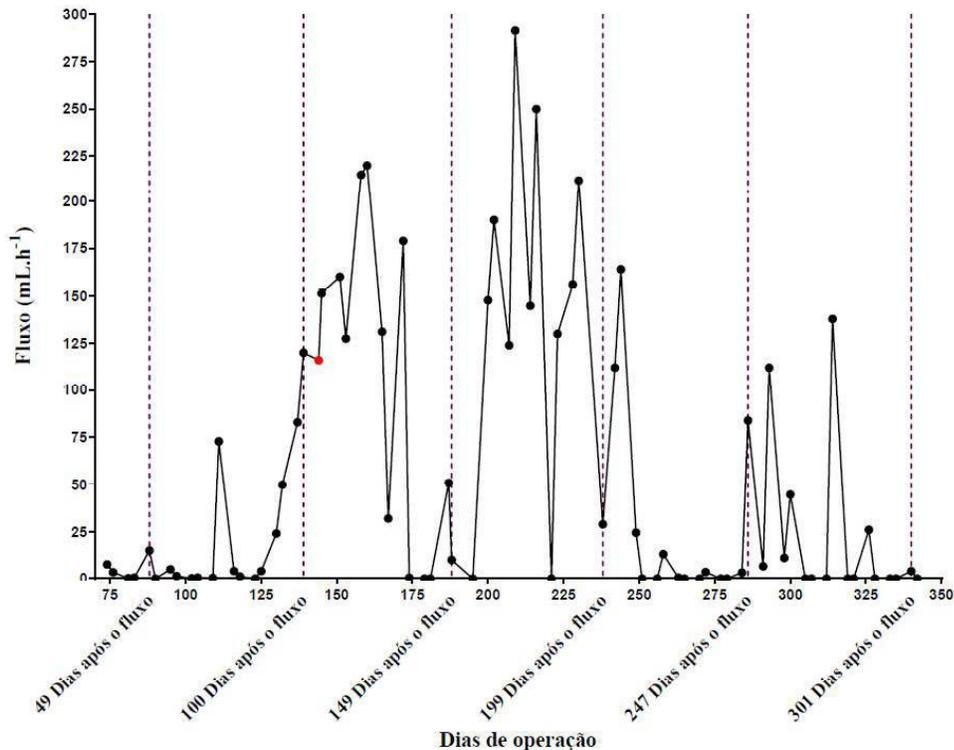


Figura 10. Mudança do fluxo de saída ao longo dos dias de operação do experimento. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo. O ponto em vermelho representa o dia 144 de operação, dia em que houve a mudança do pH da AMD sintética.

Ao longo da maior parte do experimento, o pH1 e pH2 ficaram em uma faixa de 4,75 a 5,50 (Figura 9), resultado ligeiramente superior aos obtidos por Santos e Johnson (2017), onde obtiveram uma faixa de pH de 4 - 5. Nos dias 249 e 300 de operação, o pH2 apresentou valores acima de 5,50, apresentando um máximo de 6,17 no dia 277. Esses resultados mostram que o consórcio conseguiu aumentar o pH da AMD sintética, estando próximos os valores de pH permitidos pela CONAMA nº430 (Brasil, 2011). Esta resolução preconiza que qualquer

efluente só poderá ser lançado diretamente em ambientes naturais estando em uma faixa de pH entre 6 a 9 (BRASIL, 2011).

Os resultados de pH2 abaixo de 4,6 observados durante o experimento são, provavelmente, devido ao fluxo de alimentação intenso nesses períodos. Essa variação na medição quando o fluxo é intenso ocorre pois o eletrodo do potenciômetro em contato com as pérolas de vidro (pH2) e a entrada da AMD sintética estavam perto dentro do biorreator, provavelmente os resultados foram coletados quando estava havendo uma grande entrada de alimentação, o que alterou o resultado.

## **7.2.Crescimento populacional total.**

Durante o período de adaptação, o número de células bacterianas totais, não apresentou uma variação considerável. Nos primeiros 100 dias após o início do fluxo, o número de células variou de  $9,87 \cdot 10^3$  a  $4,35 \cdot 10^4$  Células.mL<sup>-1</sup> (Figura 11).

No dia 174, 200 e 238 o número de células aumentou consideravelmente em relação aos restantes dos dias. Esse aumento no número de células, pode ser um reflexo da maior metabolização do glicerol, podendo ser comprovado pelas concentrações baixas de glicerol nos dias 174 (0,44 mM) e 200 (0,19 mM) e concentrações altas de acetato, produto da metabolização do glicerol, de 3,16 (dia 174) e 6,55 mM (dia 200).

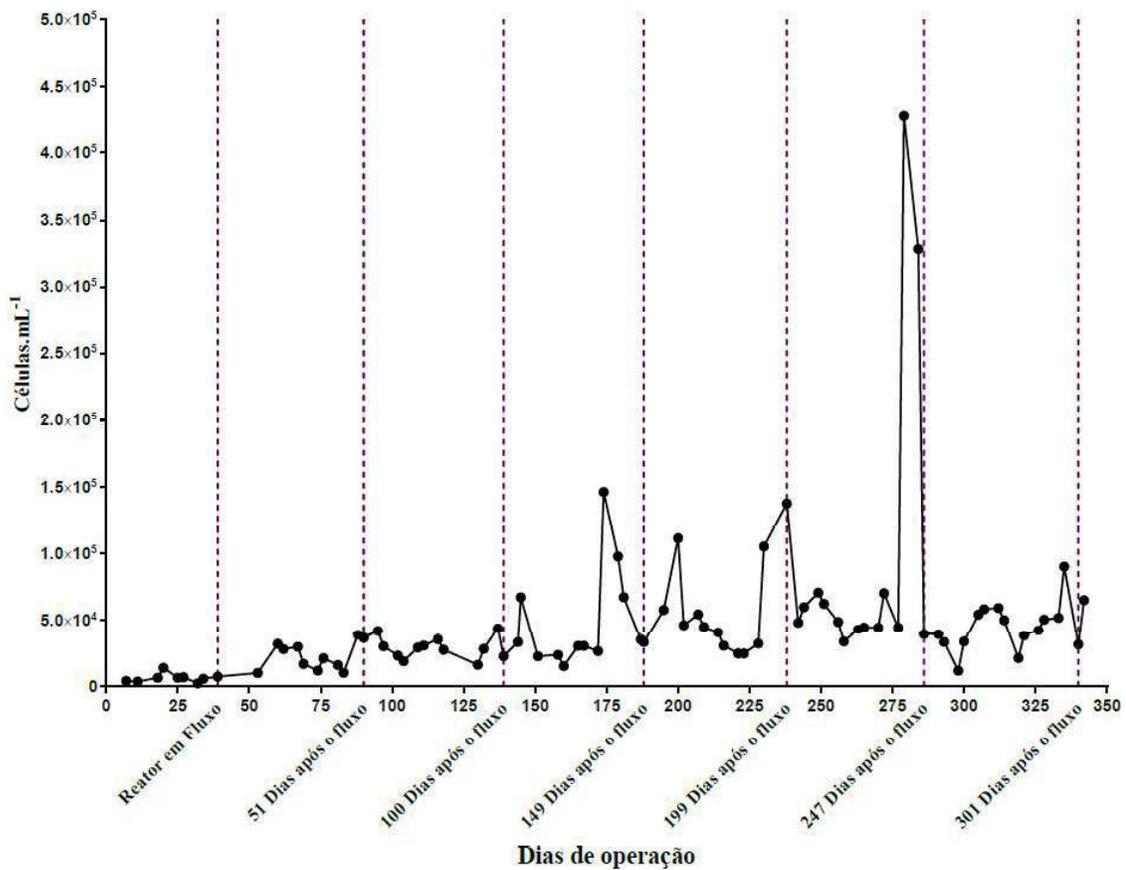


Figura 11. Número de células bacterianas totais ao longo dos dias de operação do experimento. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo, marcado pela linha descrita como Reator em Fluxo.

O valor máximo de números de células ocorreu nos dias 279 e 284 de operação,  $4,275$  e  $3,285 \times 10^8$  Células.mL<sup>-1</sup>, possivelmente *outliers*, já que o número de células ao longo do experimento não chegou perto dos dois valores.

Após os dias 174, 200, 238, 279 e 284, onde o número de células apresentou valores maiores que o restante dos dias, foi possível observar uma diminuição no número de células provavelmente devido ao aumento da concentração de acetato, gerado pelas SRBs durante a metabolização de compostos orgânicos (JOHNSON; HALLBERG, 2009), substância tóxica para células (REIS et al., 1990), podendo provocar uma diminuição do pH no citoplasmas das células desses microrganismos e morte celular (JOHNSON; HALLBERG, 2009).

### **7.3. Monitoramento da concentração de glicerol, acetato e sulfato**

O biorreator foi preparado com um meio, descrito no tópico 6.1 e 6.2, e alimentado inicialmente com uma AMD sintética com uma concentração de 3 mM de glicerol. Após 90 dias de operação, a concentração de glicerol na AMD sintética passou de 3 para 5 mM, para estimular o crescimento celular.

Ao longo da maior parte do experimento, a concentração de glicerol ficou abaixo de 1 mM (Figura 12), mostrando o ótimo consumo desse composto. Entre os dias 6 ao 14 de operação, a concentração de glicerol estava acima de 3,7 mM, provavelmente o baixo consumo de composto orgânicos pelos microrganismos foi devida a adaptação das células as condições do ambiente dentro do biorreator. Nos dias 34 e 57 também foram observados valores altos de glicerol, provavelmente devido a adição de 6 mL de glicerol 1 M nos dias 32 e 57, para aumentar o número de células que diminuiu entre os dias 27 a 32. E próximo ao dia 57 houve uma parada na entrada de alimentação (o fluxo não era monitorado nesse período, por isso essa informação não se encontra no gráfico da Figura 9), pois o pH não estava acima de 5, com isso uma parada na entrada de glicerol.

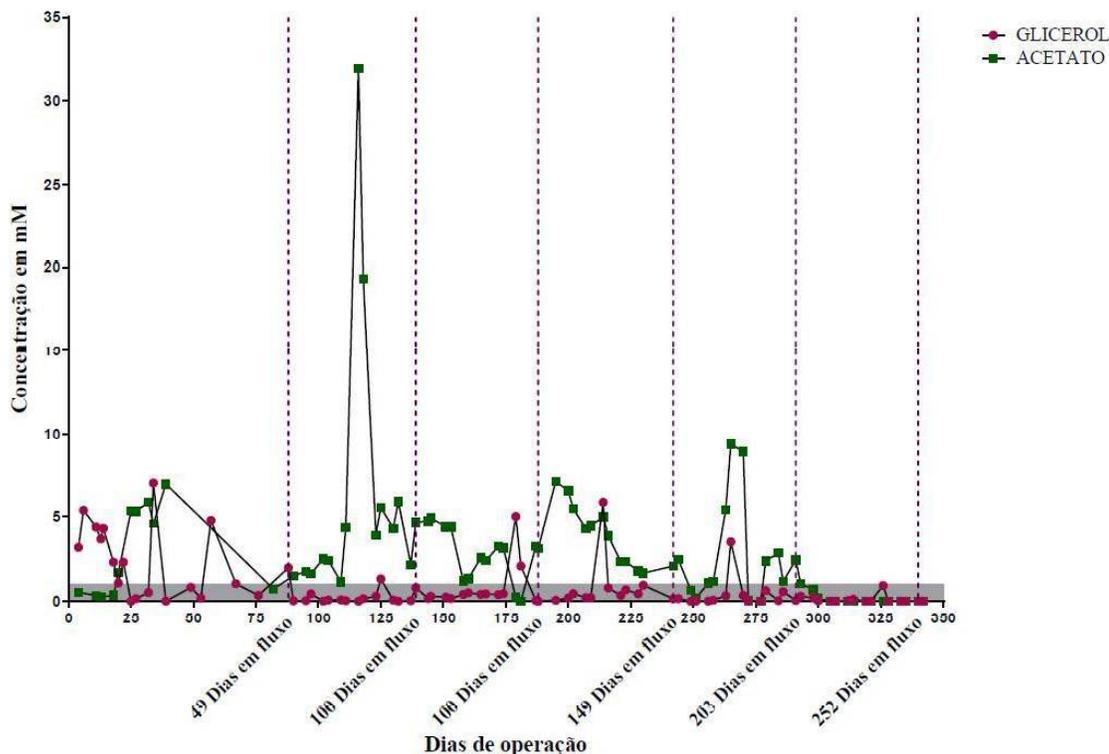


Figura 12. Concentração em mM do glicerol e acetato ao longo do experimento. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo, marcado pela linha descrita como Reator em Fluxo. Retângulo em cinza no gráfico está marcando a concentração de 1mM.

O glicerol foi escolhido como fonte de carbono em vez de outros compostos mais usuais, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como por exemplo ácido acético, pois em pH muito baixo esses ácidos são tóxicos para SRBs (JOHNSON; HALLBERG, 2009). O ácido acético, introduzidos em meio com pH ácido, abaixo de 6,0, ficam na forma de moléculas não carregadas/não dissociadas, essas moléculas que normalmente são lipofílicas, entram no citoplasma das células, causando a dissociação do ácido, fazendo com que haja uma maior entrada de prótons no citoplasma, diminuindo o pH do mesmo e causando a morte celular (JOHNSON; HALLBERG, 2009; REIS et al., 1990). Além disso, SRBs que oxidam compostos orgânicos incompletamente a acetato (MADIGAN et al., 2010), favorecem o aumento desse composto no reator.

O acetato, um dos produtos da metabolização de glicerol por SRBs do grupo I, apresentou ao longo do experimento uma concentração menor que 10 mM e pela maior parte do experimento a concentração estava abaixo de 5 mM (Figura 12). No dia 116 e 118 foi observado picos na concentração de acetato, o que explica a diminuição no número de células entre os dias 116 a 130, pois essa substância, como previamente comentado, é tóxica para SRBs (WANG; WANG, 1984; REIS et al., 1990).

O acetato em pH muito baixo está na forma de ácido acético, estando na forma não dissociada, que é tóxica para SRBs em concentrações muito pequenas, 0,90 mM (REIS et al., 1990). Um dos métodos para reverter esse problema seria a introdução de um microrganismo que consome acetato, como a *Acidocella*, mantendo o acetato em uma concentração aceitável para as SRBs (KIMURA; HALLBERG; JOHNSON, 2006; SANTOS; JOHNSON, 2017).

A diferença de concentração de sulfato (Figura 13) também foi monitorada, pois as SRBs utilizam essa molécula como aceptor final de elétron, provocando a redução da mesma e gerando sulfeto. A AMD sintética utilizada para alimentação continha uma concentração de sulfato de 13.86 mM. Ao longo da maior parte do experimento a concentração ficou abaixo de 25 mM (Figura 13).

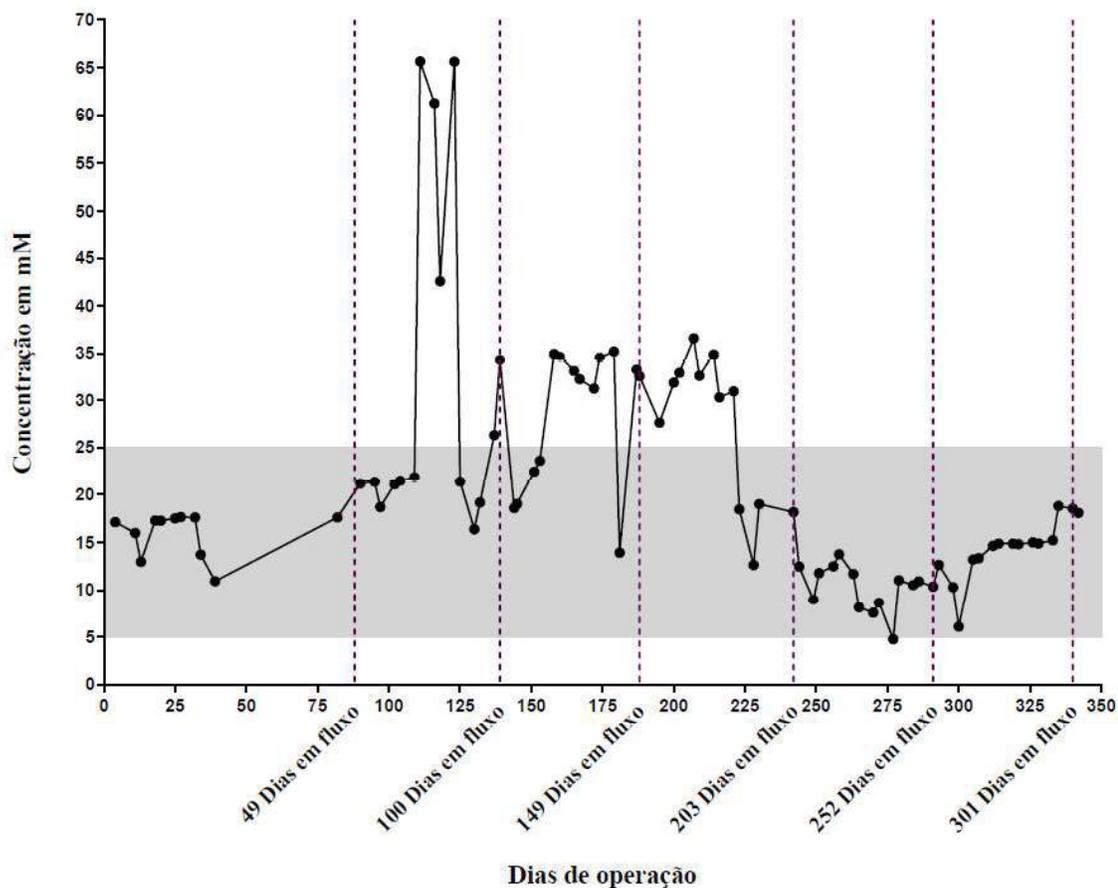


Figura 13. Concentração de sulfato ao longo do experimento. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo. O retângulo em cinza está marcando a concentração de sulfato entre 5 a 25 mM.

Foram observadas concentrações de sulfato elevadas nos dias 111 a 123, variando de 61,23 a 65,65 mM, respectivamente (Figura 13). Após o dia 300 de operação, a concentração de sulfato aumentou, variando em um faixa de 13,19 a 18,09 mM. Valores que excedem o limite determinado pela resolução CONAMA n° 357 (Brasil, 2005), que descreve que os efluentes devem apresentar uma concentração de sulfato inferior a 2,60 mM.

Apesar dos valores estarem acima de 13 mM na maior parte do experimento, foi observado, em alguns períodos, valores menores que 13 mM mostrando que o consorcio conseguiu utilizar o sulfato.

Dois fatores limitantes para diminuição de sulfato no sistema são o pH e a concentração de glicerol presentes na fonte de alimentação (NANCUCHEO; JOHNSON, 2014; SANTOS; JOHNSON, 2017). Santos e Johnson (2017), que utilizaram uma AMD sintética para alimentação com um pH de 2,1 e 5 mM de glicerol, conseguiram ao final do experimento observar concentrações de sulfato entre 6,5 e 20 mM, devido à alta entrada de alimentação quando o pH é diminuído para 2,1. Já o estudo de Nancucho e Johnson (2014), foi possível reduzir uma maior taxa de sulfato diminuindo o pH do meio, de 3 para 1,61, e aumentando a concentração de glicerol para 15 mM, reduzindo nessas condições de 98% do sulfato em sulfeto de hidrogênio, apresentando ao final do experimento uma concentração de 0,5 mM de sulfato dentro do biorreator.

#### **7.4. Estimativa total da atividade enzimática microbiana e ensaio da desidrogenase**

Os ensaios de estimativa da atividade enzimática microbiana e ensaio desidrogenase são métodos confiáveis e bastante utilizados para analisar as condições de amostras ambientais em relação a sua densidade celular, demanda de energia pelos microrganismos, viabilidade celular e produção e consumo de matéria orgânica (CRAPEZ; BAPTISTA NETO; BISPO, 2003; FONTANA et al., 2010; PENNAFIRME et al., 2015; WAITE et al., 2016), dando uma estimativa da eficiência metabólica dos microrganismos analisados.

Esses ensaios não foram mostrados em experimentos similares aos utilizados nesse trabalho, até a finalização do mesmo, sendo talvez o primeiro trabalho a analisar essas características, em conjunto, de um consórcio de bactérias cultivado em um biorreator anaeróbio alimentado com AMD sintética.

Para estimar a atividade enzimática microbiana total no biorreator, foi utilizado o ensaio de hidrólise do diacetato de fluoresceína à fluoresceína. Esse ensaio pode ser realizado por uma variedade de enzimas incluindo esterases, proteases e lipases (STUBBERFIELD; SHAW, 1990; MAIER et al., 2009).

Essas enzimas extracelulares vão agir em macromoléculas transformando-as em moléculas de baixo peso molecular, para que então possam ser absorvidas pelas células dos microrganismos (BAPTISTA NETO et al., 2005). O aumento da atividade das enzimas esterase (EST) indica que os microrganismos de um ambiente contaminado estavam sofrendo grande

estresse, requerendo uma maior demanda energética para sobreviver (ODUM, 1969; WAITE et al., 2016).

No gráfico da atividade enzimática das esterases (Figura 14) pode ser observado um aumento entre os dias 41 ao 97 de operação, de 0,378 para 1,740  $\mu\text{g}.\text{fluoresceína}.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , provavelmente esse aumento é devido à adaptação das bactérias as condições do biorreator. Após esse período a atividade enzimática das esterases diminuiu, apresentando valores entre 0,019 a 0,679  $\mu\text{g}.\text{fluoresceína}.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , com uma média de 0,172  $\mu\text{g}.\text{fluoresceína}.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$  entre os dias 104 e 286 de operação. Após o dia 286 de operação até a último dia de experimento, a atividade não apresentou valores acima de 0,071  $\mu\text{g}.\text{fluoresceína}.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ .

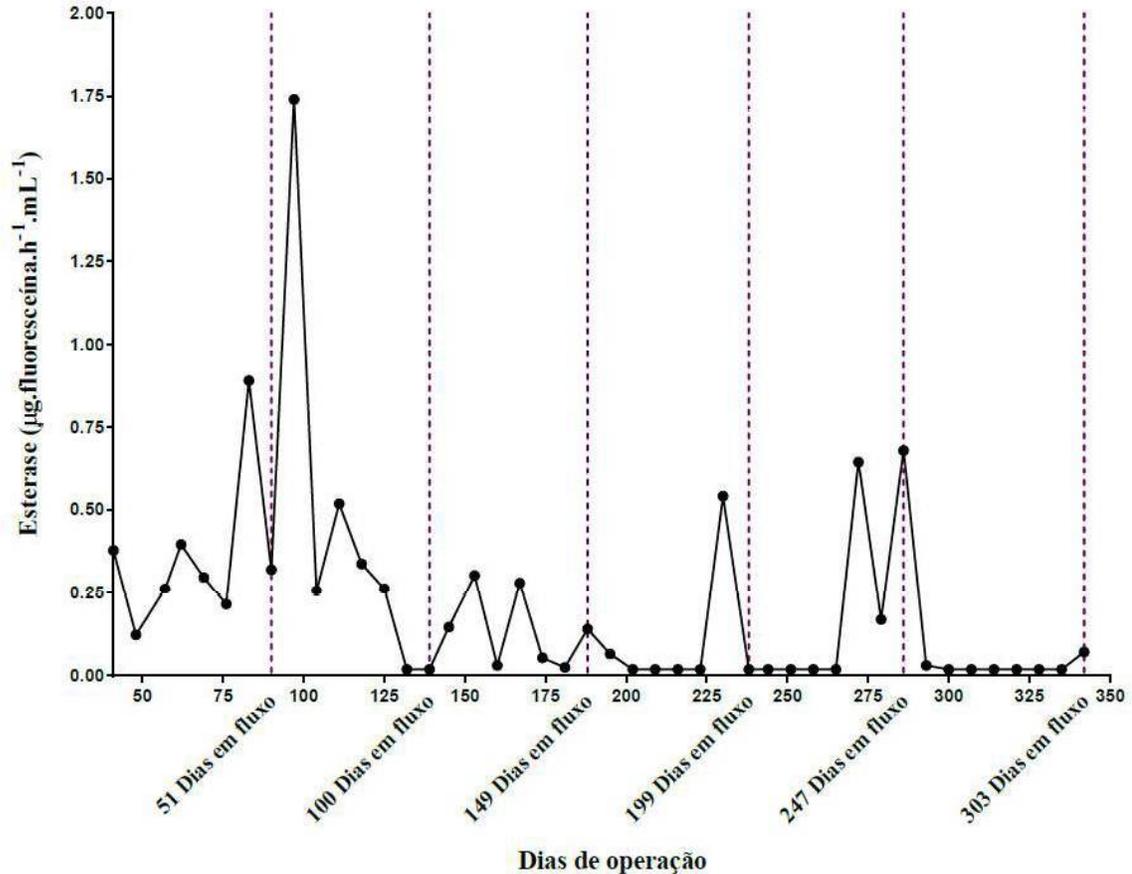


Figura 14. Gráfico da estimativa da atividade enzimática das esterases (EST). As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo.

A atividade enzimática das esterases durante o período entre os dias 41 ao 97 de operação apresentou valores acima de 0,11 - 0,17  $\mu\text{g.fluoresceína.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , encontrado em ambientes poluídos por metais onde os microrganismos se encontram em uma condição de estresse (CRAPEZ; BAPTISTA NETO; BISPO, 2003). Pode ser inferido que durante esse período o consórcio estava passando por uma condição de estresse, por estar se adaptando ao sistema, às condições do meio, alimentação com o pH extremamente baixo (2,1).

Análises de sedimentos de ambientes anóxico da área de mangue do Suruí, Baía de Guanabara, RJ, possivelmente impactada por derramamento de petróleo (FONTANA et al., 2010), apresentaram atividade de bactérias redutoras de sulfato e desnitrificantes e uma elevada taxa de atividade enzimática das esterases com uma média de 0,5  $\mu\text{g.fluoresceína.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , mínima de 0,04 e máxima de 1,24  $\mu\text{g.fluoresceína.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$  (FONTANA et al., 2010). Valores de atividade enzimática das esterases próximos aos do trabalho Fontana e colaboradores (2010), foram observados no biorreator estudado no experimento. Como foi simulada a presença do consórcio em um ambiente contaminado, como é o caso da AMD, os resultados similares mostram que uma das características de microrganismos de ambientes impactados é a alta taxa de atividade enzimática, onde eles buscam mais compostos orgânicos em um ambiente adverso para sobreviver, mostrando assim uma condição de estresse.

Outro ensaio realizado para analisar o metabolismo dos microrganismos, foi o ensaio de determinação da atividade da enzima desidrogenase. Esse ensaio fornece uma estimativa do metabolismo aeróbio e anaeróbio de uma amostra pela medição da atividade do sistema transportador de elétrons da respiração (ETSA), reação catalisada por um conjunto de enzimas desidrogenases. Estas enzimas intracelulares catalisam as reações de oxido-redução que ocorrem na respiração (HOURI-DAVIGNON; RELEXANS, 1989; MAIER et al., 2009).

Esse ensaio baseia-se na reação do complexo enzimático succinato desidrogenase, que oxida o succinato ao fumarato dentro do ciclo do ácido tricarboxílico, no sistema de transporte de elétrons, reduzindo um aceptor de elétrons, como oxigênio, nitrato, sulfato entre outros dependendo do metabolismo do microrganismo (MADIGAN et al., 2010; WAITE et al., 2016).

O INT utilizado no ensaio competirá com outros aceptores de elétrons pelo poder de redução do sistema transportador de elétrons, sendo então reduzido a formazan, um produto vermelho-violeta, quando a succinato desidrogenase é reoxidada por citocromos dentro da cadeia de transporte de elétrons (MAIER et al., 2009; WAITE et al., 2016). A leitura do espectro

é direcionada à detecção do INT-formazan ou o formazan produzido pela célula, ou seja, a célula só produz o formazan quando esta integra e com metabolismo viável, sendo um ótimo indicador do estado da atividade do sistema transportador de elétrons (ETSA), e por consequência, a viabilidade celular (MAIER et al., 2009). O resultado ETSA é expresso em  $\mu\text{L O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$  e atividade da enzima desidrogenase (DHA) é expressa em  $\mu\text{L INT-F} \cdot \text{mL}^{-1}$ , o gráfico do trabalho foi expresso em  $\mu\text{L O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

A atividade do sistema transportador de elétrons entre os dias 41 a 83 de operação foi 0,005 a 0,029  $\mu\text{L O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 15). Uma diminuição na atividade foi observada entre os dias 181 de 258 de operação, resultando em uma atividade de 0,004  $\mu\text{L O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Valores máximos de atividade foram observados nos dias 265 e 272, possivelmente *outliers*. Após o dia 272 de operação até o final do experimento, a atividade apenas diminuiu, mostrando uma possível falha no sistema, reduzindo a energia celular produzida e desencadeando a morte celular.

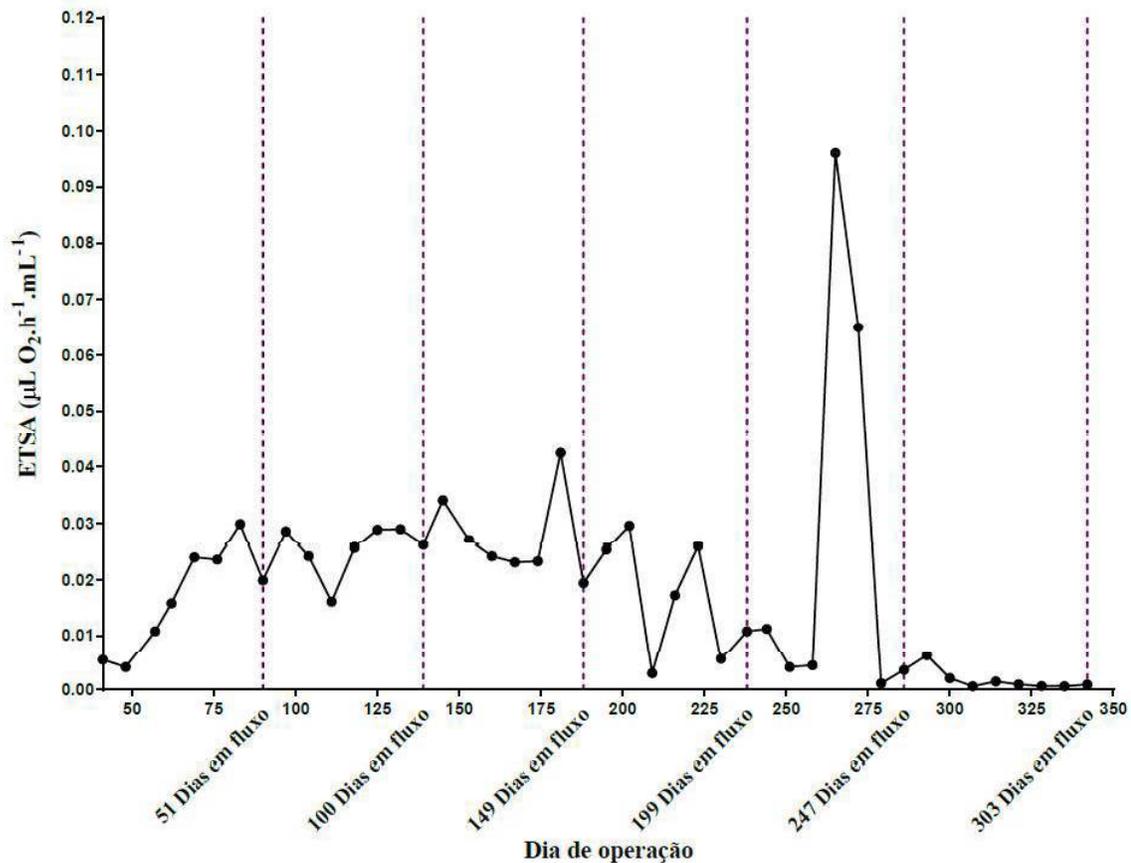


Figura 15. Gráfico do ensaio atividade do sistema transportador de elétrons (ETSA). As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo.

A Praia de Boa Vista, na baía de Guanabara, RJ, que apresenta concentrações similares de Zn, Ni e Pb aos da praia de Jurujuba um dos compartimentos mais poluídos da baía de Guanabara, RJ, apresentou valores de desidrogenase de 0,12 – 0,18  $\mu\text{L O}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  nas amostras de sedimentos coletadas no inverno e 0,02 – 7,48  $\mu\text{L O}_2.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  no verão (CRAPEZ; BAPTISTA NETO; BISPO, 2003). Esse aumento da desidrogenase, no estudo de Crapez e colaboradores (2003), apresentou grande relação com a quantidade de matéria orgânica disponível para as bactérias.

Os resultados de ETSA, obtidos no trabalho, sugerem que há quantidades pequenas de moléculas capazes de entrar na célula para produção de energia. Já os resultados de atividade enzimática das esterases, similares de outros ambientes impactados, sugerem uma maior disponibilidade de moléculas com peso molecular acima de 600 Da, tamanho que excede o

limite de absorção pelas células dos microrganismos (WEISS et al., 1991; FONTANA et al., 2010), ou uma busca por essas moléculas, devido à falta de moléculas menores, por isso há uma produção e necessidade de enzimas extracelulares que quebrem essas moléculas.

Os valores de DHA encontrados no biorreator foram 0,001 (mínimo) e 0,1544 (máximo)  $\mu\text{L INT-F.mL}^{-1}$ , valores inferiores aos do trabalho de Vasquez e colaboradores (2016), que estudaram 7 biorreatores em coluna de 5 L para o tratamento de uma AMD sintética baseada na AMD do Distrito de mineração de Zipaquirá, Colombia. Nesse trabalho foi alcançado a redução da quantidade de sulfato e metais da AMD e a concentração de DHA obteve uma mínima de 1,53 mg TPF.g<sub>dw</sub><sup>-1</sup> e máximo de 20,73 mg TPF.g<sub>dw</sub><sup>-1</sup>. O TPF (trifeniltetrazolium formazan), utilizado no trabalho de Vasquez, apresenta a mesma função do INT, um acceptor final de elétrons sintético. Possivelmente uma maior quantidade de matéria orgânica, estava disponível para os microrganismos o que reflete na alta concentração de DHA.

Um segundo biorreator foi montado no laboratório, com as mesmas condições descritas no tópico 6.2, com um consórcio de bactérias diferentes. Esse biorreator apresentou valores de atividade desidrogenase (mínimo= $6,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{L O}_2.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$  e máximo= $0,07 \mu\text{L O}_2.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) e esterase (mínimo= $0,019 \mu\text{g.fluoresceína}.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$  e máximo= $3,978 \mu\text{g.fluoresceína}.\text{h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ), próximos aos encontrados no biorreator estudado no trabalho apresentado aqui. Mostrando que além de valores baixos de ETSA e altas de atividade enzimática das esterases serem característicos de ambientes anóxicos (FONTANA et al., 2010), os dois biorreatores deviam estar em uma condição de estresse e os valores baixos de ETSA ao final do experimento coincidiram com os valores baixos de número de células totais, o que confirma uma possível falha no sistema e um maior requerimento de composto orgânico pelos microrganismos.

Os valores da atividade enzimática das esterases corrobora a necessidade de um maior fornecimento de composto orgânico. Uma alta atividade enzimática das esterases significa uma maior quantidade de enzimas liberadas capazes de quebrar moléculas, com massa molecular acima de 600 Da, que não podem ser assimiladas pelas células, devido ao limite imposto pela membrana plasmática (WEISS et al., 1991), o que indica que o consórcio necessitava de mais composto orgânico do que é fornecido.

Outro resultado que junto com ETSA e atividade enzimática das esterases, confirmam uma maior necessidade de alimento é a baixa redução de sulfato. Com concentrações mais altas de composto orgânico fornecido para os microrganismos uma maior quantidade de sulfato pode

ser reduzido (NANCUCHEO; JOHNSON, 2014). Uma maior quantidade de composto orgânico poderia ser fornecido para as bactérias do consórcio, aumentando a concentração de glicerol, para dessa forma analisar se há um aumento na atividade do sistema transportador de elétron, aumento na taxa de redução de sulfato e um melhor tratamento para a AMD.

### **7.5. Quantificação dos biopolímeros**

A matéria orgânica presente na forma de partículas ou dissolvida no ambiente é constituída de vários compostos orgânicos que fazem parte dos organismos vivos, como carboidratos, aminoácidos, lipídios, proteínas e outros (FONTANA et al., 2010). Esses compostos orgânicos são constituintes importantes da células, além de serem fonte de carbono para os microrganismos e funcionarem como alimentos de reserva, como é o caso dos lipídios (MADIGAN et al., 2010).

A quantificação de biopolímeros pode dar uma visão sobre a produção e o consumo de matéria orgânica e a possibilidade de relacionar com atividade metabólica do consórcio. Assim como o ensaio de ETSA e atividade enzimática das esterases, a quantificação de biopolímeros totais não foram mostrados em experimentos similares aos utilizados nesse trabalho, até a finalização do mesmo, sendo talvez o primeiro trabalho a analisar essas características em um consórcio de bactérias cultivado em um biorreator anaeróbio alimentado com AMD sintética.

Na quantificação de proteínas totais (Figura 16), foi observado um aumento entre os dias 41 a 160 de operação, de 0,010 a 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>, acompanhado de um aumento do número de células de 7,055\*10<sup>6</sup> para 1,5\*10<sup>7</sup> Células.mL<sup>-1</sup>. Após o 279 dia até o final do experimento, houve uma diminuição na quantidade de proteínas totais até 0,011 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 16).

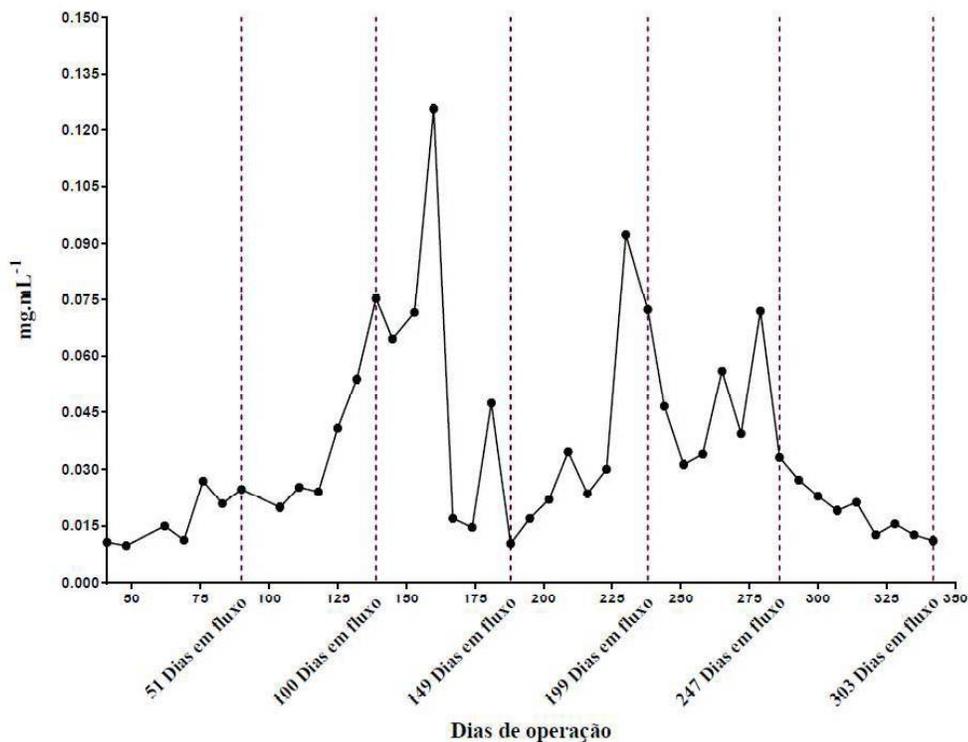


Figura 16. Quantificação de proteínas totais. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo, marcado pela linha descrita como Reator em Fluxo.

Entre 50 - 70% do peso seco de bactérias é formado por proteínas (AZAM; SIMON, 1989), uma diminuição na quantidade de proteínas está diretamente relacionada com uma diminuição celular, o que pode ser observado pelo baixo número de células totais (Figura 11). Uma relação entre o aumento de proteínas e o número de células pode ser observada pela variação numérica. Essa relação foi comprovada com o teste de Mann Whitney, utilizando  $p < 0,05$  para indicar relação entre as análises, onde mostra que existe uma relação entre células e proteínas ( $p = 5,03 \cdot 10^{-8}$ ).

O resultado da diminuição da concentração de proteínas totais ao final do experimento, junto com os resultados de ETSA, é mais uma confirmação que o sistema estava falho ao final e o consórcio estava morrendo.

A concentração de carboidratos totais variou de 0,02 a 0,04 mg.mL<sup>-1</sup> até o dia 223 de operação (Figura 17). Um aumento de 0,04 para 0,11 mg.mL<sup>-1</sup> de carboidratos foi observado

no dia 230 e um aumento para  $0,20 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi observado no 286º dia. Entre os dias 284 e 286, houve uma diminuição no número de células, o que explica uma maior concentração de carboidratos que não estão sendo consumidos pelas células.

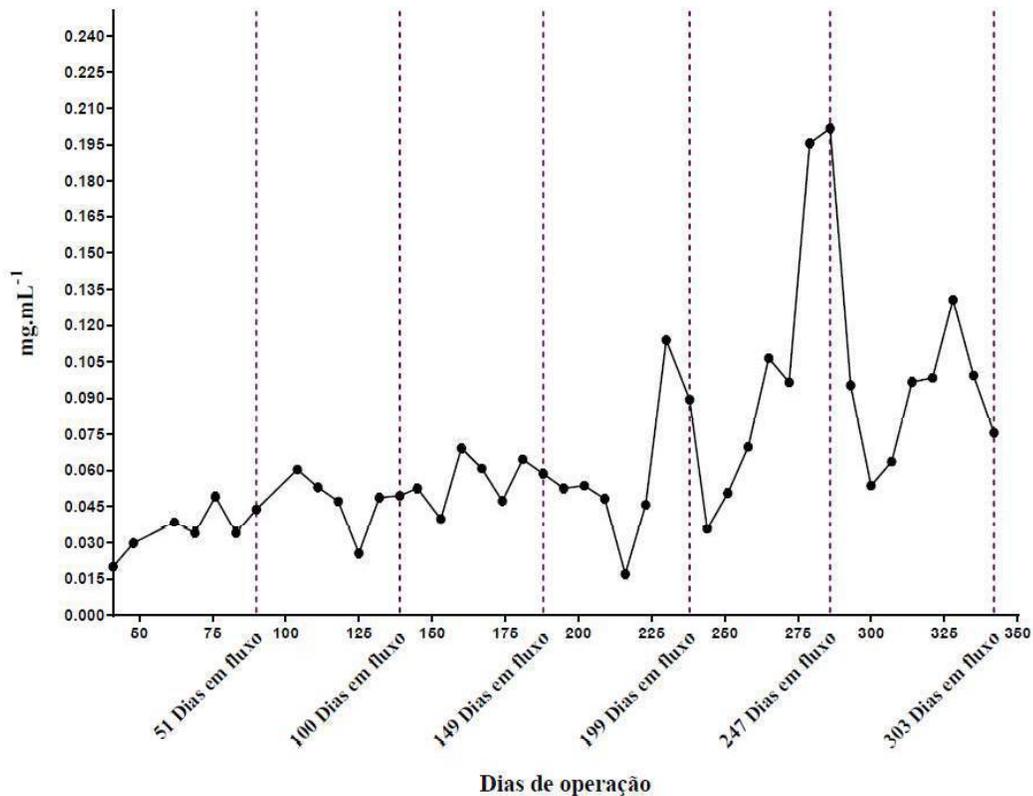


Figura 17. Quantificação de carboidratos totais. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo, marcado pela linha descrita como Reator em Fluxo.

A concentração de lipídios totais apresentou valores altos nas primeiras semanas de análise, possivelmente devido a adaptação do consórcio ao sistema (Figura 18). Uma alta taxa de lipídios representa uma condição de estresse por parte do consórcio, que produz uma maior quantidade de matéria orgânica para sobreviver em períodos que há uma escassa entrada de alimento (MADIGAN et al., 2010). A concentração de lipídios diminui nas semanas seguintes, porém ao longo do experimento apresentou uma grande variação ao longo dos dias. Essa grande variação da concentração de lipídios ao longo de todo o experimento, mostra que o sistema

estava em estresse, pois estava gastando mais energia para a produção de lipídios, possivelmente devido à falta ou limitada concentração de alimento fornecido para o consórcio.

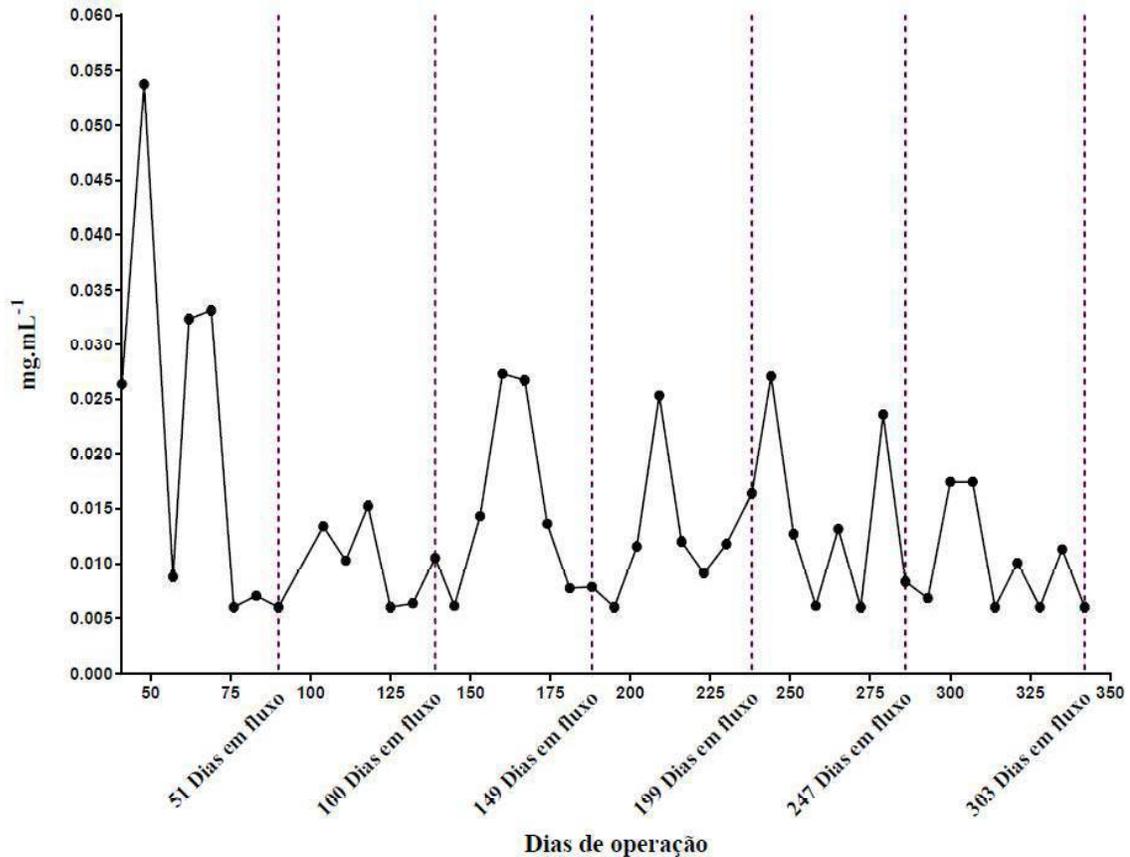


Figura 18. Quantificação lipídios totais. As linhas em roxo representam as mudanças dos dias, de 50 em 50 dias, desde o início do fluxo contínuo, marcado pela linha descrita como Reator em Fluxo.

### 7.6. Análise da diversidade de microrganismos

Para analisar a diversidade de microrganismos dentro do biorreator, foi utilizado como referência uma amostra do inóculo, microrganismos cultivados em 500 mL utilizados para iniciar o experimento, e seis amostras coletadas durante o fluxo contínuo, em um intervalo de 50 em 50 dias, sendo a primeira amostra referente aos primeiros 50 dias do fluxo contínuo. Utilizando o protocolo do QIIME para analisar a diversidade ao longo desse período, foi

constatado que as bactérias dominantes no biorreator nas datas coletadas foram as do gênero *Desulfosporosinus* e *Clostridium* (Figura 19).

Os microrganismos *Desulfosporosinus* são dominantes em relação aos *Clostridium* no inóculo e nos primeiros 50 dias. Após esse período, nos dias 105 e 156 há uma prevalência do microrganismo *Clostridium* e ao final do experimento há uma volta da prevalência de *Desulfosporosinus* (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem dos microrganismos *Desulfosporosinus* e *Clostridium* nas amostras de DNA, aferidas no QIIME. O dia 0, representa o inóculo. Cada dia é referente a uma amostra.

<b>Gênero \ Dias</b>	<b>0</b>	<b>56</b>	<b>105</b>	<b>156</b>	<b>210</b>	<b>252</b>	<b>303</b>
<b><i>Desulfosporosinus</i>(%)</b>	95,9	98,0	33,7	27,8	49,8	82,5	81,1
<b><i>Clostridium</i> (%)</b>	2,9	0,4	66,2	72,0	48,5	11,7	4,8

O gênero *Desulfosporosinus* pertence à família *Peptococcaceae*, ordem *Clostridiales* e filo *Firmicutes*. Esse grupo contém oito espécies descritas: *D. orientis*, *D. auripigmenti*, *D. meridiei*, *D. lacus*, *D. hippei*, *D. youngiae*, *D. acidiphilus*, *D. burensis*, *D. acididurans* (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015).

Os organismos desse gênero são anaeróbios esporulantes redutores de sulfato a sulfeto. São mesófilos, apresentam espécies neutrófilas e algumas com capacidade de viver em ambientes ácidos (ALAZARD et al., 2010; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015). *Desulfosporosinus* podem utilizar uma gama de compostos orgânicos como doador de elétrons, como ácidos orgânicos e álcoois (ROBERTSON et al., 2001; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015, podendo crescer autotroficamente utilizando hidrogênio como doador de elétrons e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono (ROBERTSON et al., 2001).

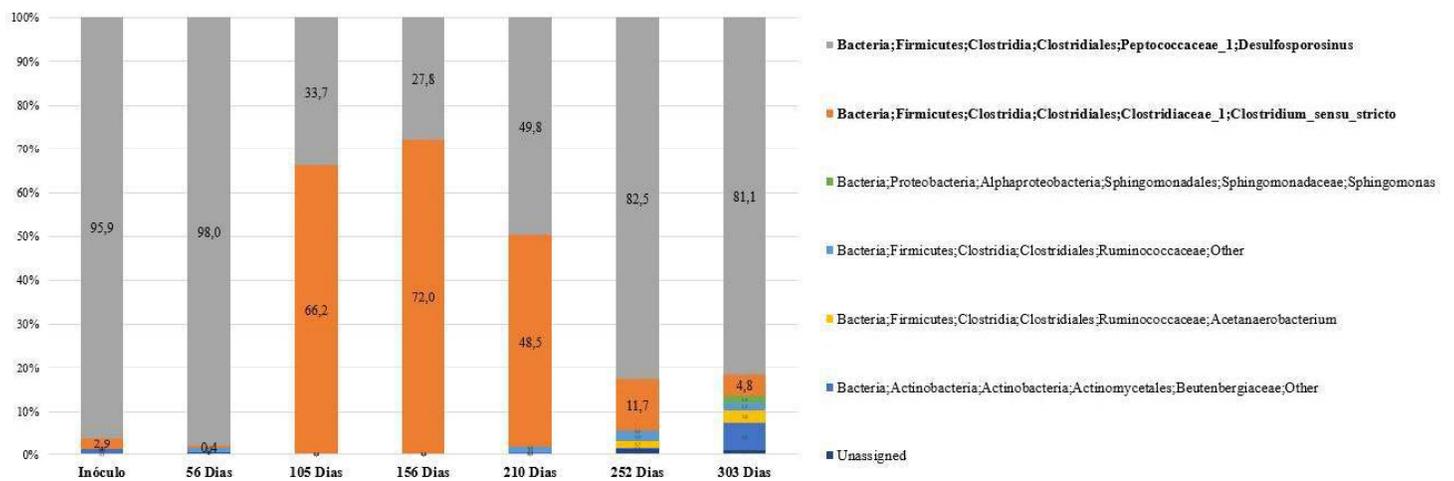


Figura 19. Gráfico de barras, gerado pelo QIIME, da análise de diversidade dos microrganismos. Cada barra representa uma amostra referente a cada dia de coleta, sendo a primeira barra referente ao inóculo. O gráfico mostra a dominância dos organismos *Desulfosporosinus* (em cinza) e *Clostridium* (em laranja).

O fragmento do gene 16S rRNA identificado como *Desulfosporosinus* pelo QIIME foi submetido ao banco de dados do NCBI e apresentou alta identidade com os genes dos organismos *Desulfosporosinus acididurans* e *Desulfosporosinus acidiphilus* (Tabela 5).

Tabela 5. Identidade da sequência identificada como *Desulfosporosinus* pelo QIIME com as sequências no NCBI.

Microrganismo	Cobertura	E-value	Identidade	Número de acesso
<i>D. acididurans</i> cepa USS-CCA2	100%	1e-98	100%	MF595567.1
<i>D. acididurans</i>	100%	1e-98	100%	HG316991.1
<i>D. acididurans</i> cepa M1	100%	1e-98	100%	NR_134719.1
<i>D. acidiphilus</i> cepa SJ4	100%	1e-98	100%	NR_074132.1

As *Desulfosporosinus acididurans* são organismos gram-positivos, podem crescer em uma temperatura entre 15 - 40 °C, com temperatura ótima em 30 °C, e crescem em um pH entre 3,8 e 7,0, com um crescimento ótimo em pH 5,5 (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015), devido essa característica esses organismos podem crescer em ambientes ácidos, como a AMD.

*D. acididurans* utilizam uma grande variedade de compostos como acceptor de elétron além do sulfato, tais como enxofre elementar, tiosulfato, ferro e nitrato, não podendo utilizar sulfeto, arseniato e fumarato. Reduzem sulfato a sulfeto utilizando uma variedade de compostos como doadores de elétrons como o hidrogênio molecular, ácidos orgânicos (formato, lactato, butirato, fumarato, malato e piruvato), álcoois (glicerol, metanol e etanol), extrato de levedura e açúcares (xilose, glicose e frutose). Oxidando esses compostos incompletamente a acetato e dióxido de carbono (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015).

Estudos com *D. acididurans* mostraram que esses microrganismos apresentaram a capacidade de sobreviver em ambientes ácidos (pH < 3), utilizando glicerol como doador de elétrons e estando em sintrofia a *A. aromatica*, microrganismo que consome acetato (KIMURA; HALLBERG; JOHNSON, 2006). A cepa M1<sup>T</sup> de *D. acididurans* apresentou nos estudos de Sánchez-Andrea e colaboradores (2015) uma tolerância a uma concentração de 50 mM de ferro ferroso e 10 mM de alumínio e sensibilidade a concentrações maiores do que 1 mM de cobre. Esses resultados corroboram que essa espécie de *Desulfosporosinus* é uma ótima candidata para

ser utilizada em tratamentos de efluentes de minas que apresentam pH ácido e metais dissolvidos.

O fragmento do gene 16S rRNA identificado como *Desulfosporosinus* pelo QIIME também apresentou alta identidade com o gene 16S rRNA da *D. acidiphilus*. *Desulfosporosinus acidiphilus* são SRBs acidófilas, podendo crescer em pH entre 3,6 e 5,5, com pH ótimo de crescimento em 5,2 e não sobrevivem em pH 7. Podem viver em temperaturas de 25 - 40 °C, com temperatura ótima de 30 °C. Utilizam como doador de elétrons na redução do sulfato o hidrogênio molecular, lactato, piruvato, glicerol, glicose e frutose. Os compostos orgânicos são oxidados incompletamente a acetato. Utiliza sulfato como acceptor de elétrons, porém não utiliza enxofre elementar, fumarato e arseniato (V) (ALAZARD et al., 2010).

Assim como *D. acididurans*, *D. acidiphilus* são uma ótima alternativa para serem utilizadas em tratamentos de AMD, porém como os dois organismos oxidam compostos orgânicos incompletamente produzindo acetato, tóxico para esses organismos (WANG; WANG, 1984; REIS et al., 1990), outro organismo que consome acetato deve ser utilizado para evitar a morte dessas SRBs pelo aumento da concentração de acetato.

Um dendrograma baseado nas sequências do gene 16S rRNA das *Desulfosporosinus* e outros microrganismos que reduzem sulfato (Figura 20) foi construído para verificar os dados obtidos pelo *blast*. A sequência identificada com *Desulfosporosinus* denominada de ITV\_BIODAM1 foi alinhada com outras sequências de microrganismos redutores de sulfato obtidas do banco de dados do NCBI. Foram selecionadas sequências de bactérias redutoras de sulfato pertencentes à classe Clostridia, Deltaproteobacteria, as termófilas Nitrospirae, Thermodesulfobacteria e Thermodesulfobiaceae. E de arqueias redutoras de sulfato da classe Euryarchaeota e Crenarchaeota.

A sequência do gene 16S rRNA ITV\_BIODAM1, identificada como *Desulfosporosinus* pelo QIIME, foi agrupado com outros *D. acididurans* e *D. acidiphilus*, com valor de bootstrap de 93. Corroborando os resultados do *blast*, onde mostra uma alta identidade da sequência ITV\_BIODAM1 com *D. acididurans*, porém mais análises precisam ser realizadas para afirmar que esse organismo pertence a essa espécie.

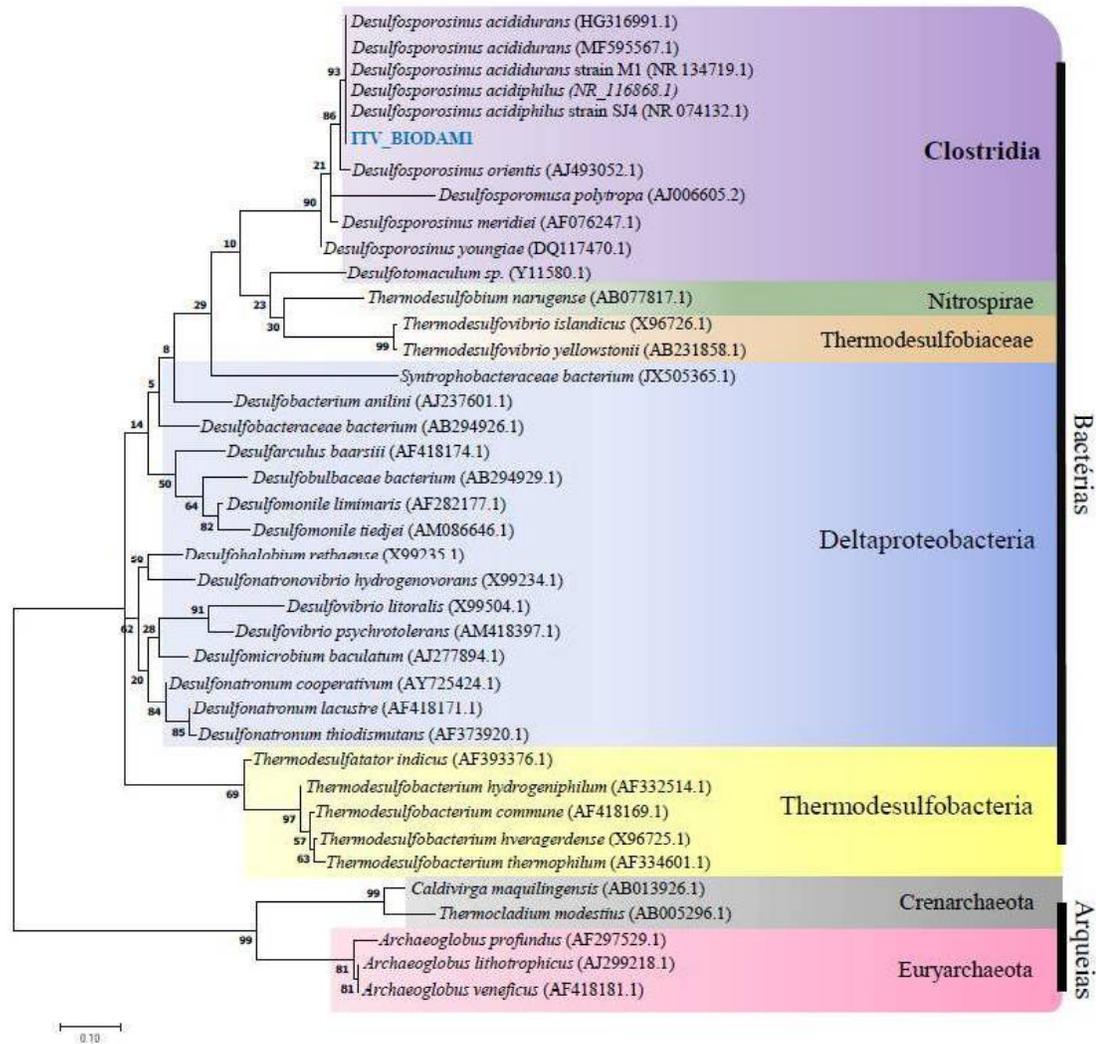


Figura 20. Dendrograma baseado em seqüências do gene 16S rRNA de bactérias e arqueias redutoras de sulfato. Dendrograma foi gerado pelo programa MEGA v7 construída com o método de Máxima verossimilhança (YANG, 1994) e o modelo Kimura 2-parameter (KIMURA, 1980), com 1000 replicatas de Bootstrap.

Outro microrganismo dominante no biorreator foi o do gênero *Clostridium*. Os organismos desse gênero são anaeróbios fermentadores, gram-positivos esporulantes. Apresentando 146 espécies descritas dentro do gênero, esses organismos podem fermentar uma variedade de substâncias como açúcares, aminoácidos, purinas e pirimidinas (STACKEBRANDT et al., 1999; BIEBL, 2001; MADIGAN et al., 2010).

Esse gênero apresenta espécies com capacidade de fixar nitrogênio, como a *Clostridium pasteurianum* (CARNAHAN et al., 1960) que também apresenta a capacidade de fermentar glicerol produzindo butanol, etanol e ácido acético (BIEBL, 2001). Apresenta também espécies produtoras de solventes, como a *Clostridium beijerinckii* e *Clostridium acetobutylicum* (QURESHI; SAHA; COTTA, 2007). Microrganismos do gênero *Clostridium* estão bastante difundidos no ambiente e já foram encontrados em reatores para tratamento de drenagem ácida de mina (SÁNCHEZ-ANDREA; TRIANA; SANZ, 2012).

Utilizando a ferramenta *blast* do NCBI a sequência identificada como *Clostridium* pelo QIIME apresentou alta identidade com sequências de *Clostridium beijerinckii* (Tabela 6).

Tabela 6. Identidade da sequência identificada como *Clostridium* pelo QIIME com as sequências no NCBI

Microrganismo	Cobertura	E-value	Identidade	Número de acesso
<i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598	100%	1e-98	100%	CP011966.3
<i>C. beijerinckii</i> cepa BE3.11	100%	1e-98	100%	MH681457.1

As bactérias *Clostridium beijerinckii* produzem acetona, butanol e etanol ao final da fermentação de compostos orgânicos (CHEN; BLASCHEK, 1999). Na sua fase exponencial de crescimento, produz ácido acético e ácido butanoico e com a diminuição do crescimento *C. beijerinckii* assimila o ácido e produz acetona, butanol e pequenas quantidade de etanol (CHEN; BLASCHEK, 1999). Esse organismo pode fermentar uma variedade de açúcares com glicose, xilose, arabinose, manose, sacarose, lactose, celobiose e amido, não apresentando a capacidade de fermentar glicerol como única fonte de carbono (LIYANAGE et al., 2001; SEDLAR et al., 2017).

Devido as suas características, o crescimento de *C. beijerinckii*, ou outras espécies de *Clostridium* que produzem ácido acético, junto com SRBs é bastante problemático, pois aumenta a concentração de ácido acético no meio, substância tóxica para SRBs (REIS et al., 1990). Além de, *Clostridium beijerinckii* pode provavelmente ter competido com as SRBs pelo composto orgânico dentro do biorreator, fermentando o extrato de levedura em conjunto com o glicerol, diminuindo a taxa de redução de sulfato.

## 7.7. Análise estatística

Para as análises estatísticas os dados foram analisados e agrupados em três conjuntos de dados, (i) utilizando os dados dos resultados de todas as análises realizadas durante os 342 dias de experimento, exceto a análise de diversidade de microrganismos, (ii) utilizando os dados normalizados de biopolímeros, atividade do sistema transportador de elétrons, atividade enzimática das esterases e crescimento populacional e (iii) utilizando os dados obtidos de todas as análises realizadas, selecionando apenas os dias utilizados para análise de diversidade dos microrganismos..

Para o primeiro conjunto de dados foram realizados o teste de Kruskal-Wallis e o teste de correlação de Spearman rs. O teste de Kruskal-Wallis para aferir mudanças significativas entre as médias das análises do experimento, utilizando  $p < 0,05$  para aquelas com mudanças significativas. O teste apresentou  $p$  de 0,99, mostrando que não houve mudança significativa durante o experimento. Podendo concluir que o sistema não sofreu mudanças significativas, e que apesar das mudanças na AMD sintética de alimentação do biorreator no começo do experimento (mudança de pH, no dia 144, de 2,1 para 2,5 e da concentração de glicerol, no dia 90, de 3 para 5mM), o sistema se manteve praticamente estável ao longo dos 342 dias e o consórcio conseguiu se adaptar para sobreviver em boa parte do experimento, mas não conseguiu se manter vivo ao final do experimento.

Com o teste de correlação de Spearman rs (Figura 21), foi possível observar uma relação entre as análises. Uma relação positiva entre o número de células e pH 1 e pH2 foi observada no gráfico de correlação, com rs igual a 0,52 e 0,49, respectivamente, relação já esperada já que os organismos redutores de sulfato podem aumentar o pH do meio (SANTOS; JOHNSON, 2017), apresentando dessa forma uma relação entre aumento de células e aumento de pH. Uma relação negativa entre número de células e glicerol também foi observado, com rs igual a -0,40, relação também esperada já que com o aumento do número de células há um aumento do consumo de glicerol e diminuição do mesmo.

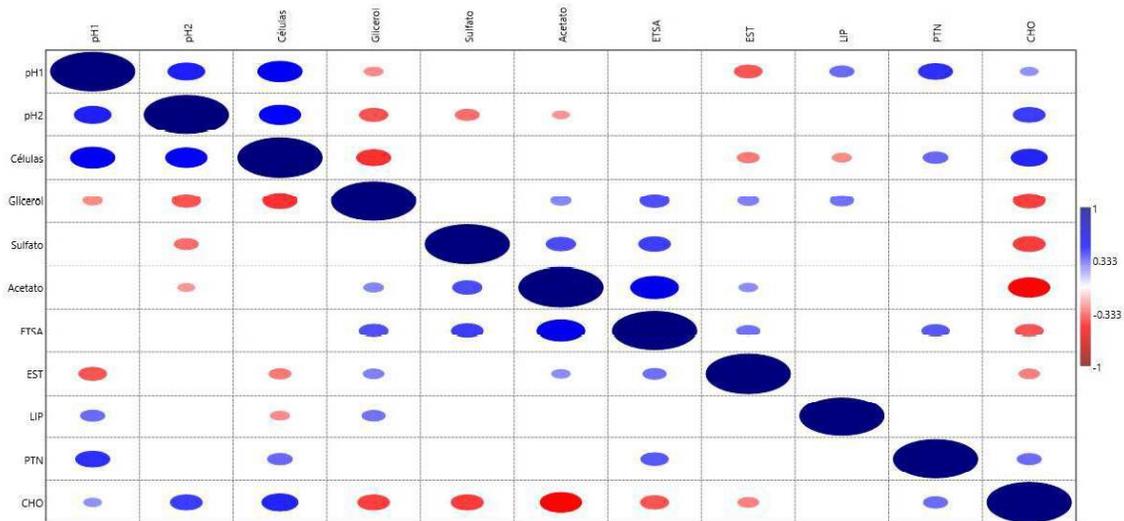


Figura 21. Correlação de Spearman rs. LIP: Lipídios; PTN: Proteínas; CHO: Carboidratos.

Uma relação positiva foi observada entre acetato e ETSA, com rs igual a 0,57. Como a ETSA ocorre devido a ação de conjunto de enzimas desidrogenase, que catalisam as reações de oxido-redução que ocorre na respiração (HOURI-DAVIGNON; RELEXANS, 1989; MAIER et al., 2009), a relação entre ETSA com o produto da oxidação do composto orgânico fornecido para geração de energia é plausível. Com o aumento do acetato, um dos produtos da oxidação de glicerol pelas SRBs, há um aumento da ETSA, devido a metabolização glicerol fornecido para as bactérias.

Já a concentração de lipídios totais mostrou uma relação negativa com o número de células pelo teste de Spearman rs, (Figura 21), com rs = -0,23, sugerindo que quando um aumenta o outro diminui. O que mostra uma maior produção de lipídios pelo consórcio quando o número de células é menor e um consumo de lipídios quando o número de células aumenta, possivelmente devido à falta de alimento fornecido.

Para o segundo conjunto de dados, onde foram utilizados os resultados normalizados da quantificação dos biopolímeros, ETSA, atividade enzimática das esterases e crescimento populacional para observar se houve mudança significativa entre essas análises. Esses dados foram escolhidos para serem analisados separadamente pois eles permitem observar como estão as condições dos microrganismos em relação a sua densidade celular, demanda de energia,

viabilidade celular e produção e consumo de matéria orgânica (CRAPEZ; BAPTISTA NETO; BISPO, 2003; FONTANA et al., 2010; PENNAFIRME et al., 2015; WAITE et al., 2016).

O teste de Kruskal-Wallis utilizado apresentou  $p$  de  $2,19 \cdot 10^{-13}$ , mostrando que houve mudança significativa entre as análises. O teste Mann-Whitney (Tabela 7) foi utilizado para observar onde, especificamente, ocorreram as diferenças significativas entre os dados, utilizando  $p < 0,05$  para determinar aquelas com diferenças significativas. Com o teste pode ser observada uma relação entre o número de células com ETSA, lipídios, proteínas e carboidratos relação esperada já que com o aumento do número de células há um aumento da metabolização de compostos orgânicos e produção de biopolímeros.

Tabela 7. Resultado do teste Mann Whitney, valores  $p < 0,05$ .

	ETSA	EST	LIP	PTN	CHO	CEL
ETSA	-	$1,6 \cdot 10^{-3}$	-	-	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$
EST	$1,6 \cdot 10^{-3}$	-	-	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-5}$	-
CEL	$2,3 \cdot 10^{-3}$	-	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$5,04 \cdot 10^{-5}$	$6,67 \cdot 10^{-10}$	-

\* EST: Atividade enzimática das esterases; LIP: Lipídios; PTN: Proteínas; CHO: Carboidratos

Uma relação entre desidrogenase e biopolímeros é descrita em sedimentos de ambientes marinhos (RELEXANS, 1996), porém no trabalho, utilizando o teste de Mann Whitney, foi observado apenas uma relação entre carboidrato e ETSA, com  $p$  de 0,0035.

Com o terceiro conjunto de dados foi realizada o teste de Kruskal-Wallis que apresentou  $p = 0,43$ , mostrando que não houve mudança significativa analisando somente esses dias.

Foi realizado também a análise de PCA, para verificar quais análises tinham relação com os organismos dominantes encontrados no biorreator. Uma correlação entre acetato e *Clostridium* foi observada pela análise de PCA (Figura 22). Conforme a concentração de acetato vai aumentando (Figura 23) é possível observar uma prevalência de *Clostridium*, em vez de *Desulfosporosinus* (Figura 19 e Tabela 4), confirmando a análise de PCA.

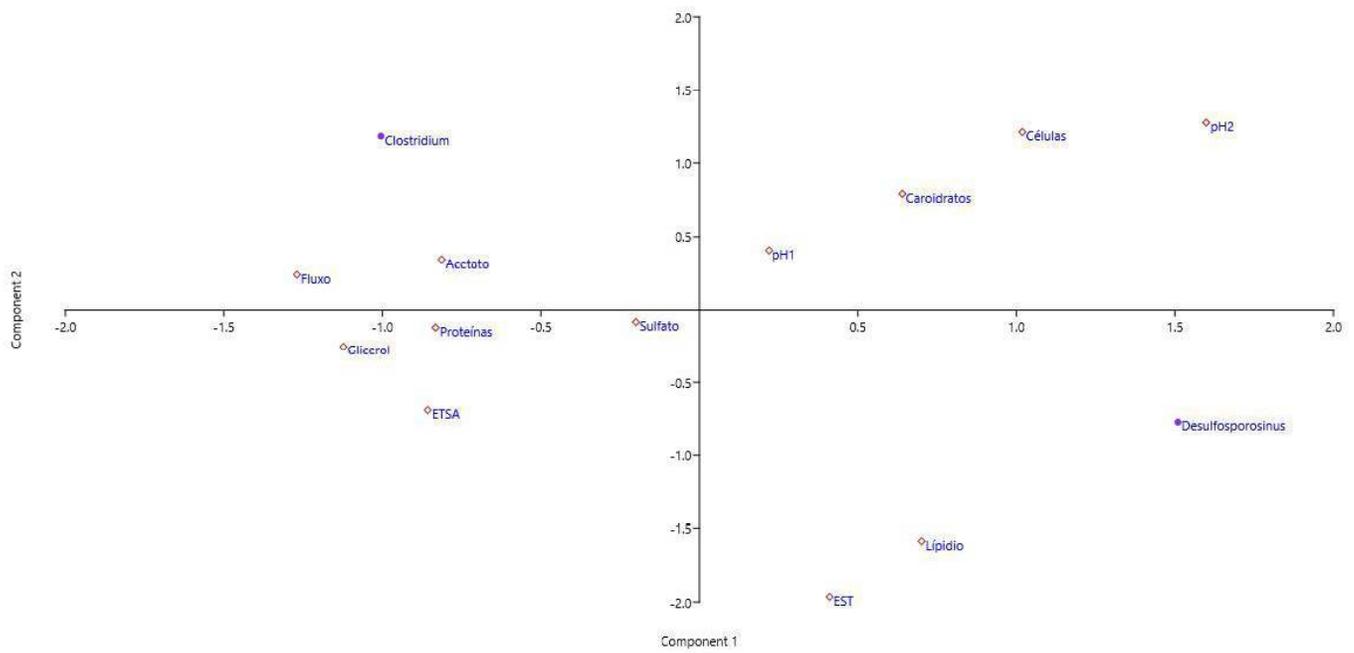


Figura 22. Análise das componentes principais (PCA) utilizando os dados referentes as datas das amostras utilizadas na análise de diversidade dos microrganismos. PC1 explica 40 % da variância total dos dados e PC2 25 %. ETSa: Atividade do sistema transportador de elétrons; EST: Atividade enzimática das esterases.

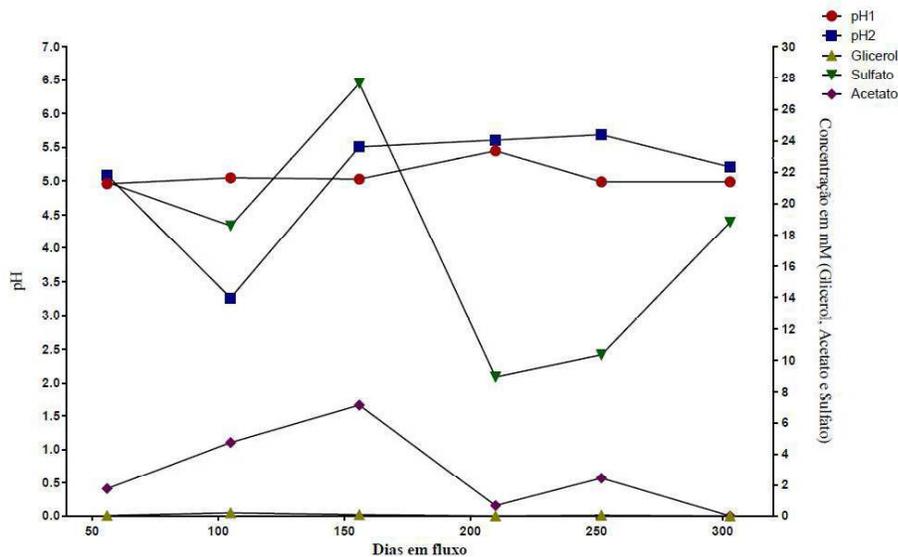


Figura 23. Concentração de Glicerol, Acetato e Sulfato e valores de pH1 e pH2 nos dias escolhidos para análise de diversidade dos microrganismos.

Três possíveis explicações podem ser obtidas com essa correlação, (i) o aumento da concentração de acetato pode estar favorecendo o crescimento de *Clostridium*. Essa relação de benefício do uso de acetato em cultivo de *Clostridium* já foi observada, mostrando uma diminuição da taxa de degeneração da célula e um aumento da produção de butanol, produzido por esses microrganismos (CHEN; BLASCHEK, 1999). Ou (ii) como algumas espécies desse gênero podem produzir ácido acético (CHEN; BLASCHEK, 1999), com o aumento da dominância dos microrganismos *Clostridium*, há um aumento da liberação de ácido acético por esses microrganismos, mostrando dessa forma a relação entre os microrganismos *Clostridium* e a concentração de acetato. E (iii) como o acetato é tóxico para SRBs, um aumento de acetato pode diminuir a dominância desses microrganismos e favorecer o crescimento de *Clostridium*.

Com a PCA, foi possível observar uma maior correlação entre os microrganismos do gênero *Desulfosporosinus* com a atividade enzimática das esterases e lipídios totais (Figura 22) e uma relação entre esterases e lipídios totais. Analisando os dados, um aumento da dominância de *Desulfosporosinus* foi observada quando há um aumento na atividade enzimática das esterases e uma diminuição lipídios totais.

Como o ensaio de atividade enzimática das esterases, estima atividade de enzimas que quebram moléculas maiores que 600 Da (FONTANA et al., 2010), a relação diretamente

proporcional entre *Desulfosporosinus* com a atividade enzimática das esterases é um reflexo de que o ambiente está com moléculas maiores que 600 Da ou os organismos precisa de mais alimento para sobreviver do que é fornecido.

O aumento da atividade enzimática das esterases relacionada com esse microrganismo pode sinalizar que uma maior concentração de composto orgânico deve ser fornecido para o microrganismo, para diminuir a taxa de procura por moléculas maiores. Já que o glicerol apresenta apenas 92,02 Da, única fonte externa fornecida para o consórcio, pode ser assimilado pela célula sem precisar ser metabolizado por uma enzima extracelular. Um aumento da produção dessas enzimas fará com que haja um gasto de energia, desperdiçando uma energia necessária para a célula em um ambiente de estresse.

A correlação inversa entre *Desulfosporosinus* e lipídios totais, pode indicar que o aumento de *Desulfosporosinus* pode estar acarretando na diminuição de lipídios no reator. Esses lipídios que são produzidos pelos próprios microrganismos do reator, estão, provavelmente, sendo consumidos pelos microrganismos do gênero *Desulfosporosinus*, o que explica essa correlação entre os dois e o aumento da atividade enzimática das esterases, necessária para quebrar essas moléculas. Outro indicativo que um maior fornecimento de composto orgânico deve ser administrado para esse microrganismo.

### **7.8. Análise do metal recuperado**

Devido a problemas técnicos, não foi possível analisar a taxa de remoção do metal dissolvido (cobre) contido na AMD sintética do frasco lavador e a diminuição dos metais presentes dentro do biorreator (como Zn). Porém foi observado no frasco lavador um precipitado azul escuro ao longo do experimento, provavelmente sulfeto de cobre (CuS).

Os pesquisadores do Instituto SENAI de Inovação em Tecnologias Mineraias, realizaram um ensaio com o biorreator onde a AMD sintética do frasco lavador foi substituída por uma AMD natural retirada de uma mina de cobre da região Amazônica. Essa AMD apresentava pH = 5,1 e uma quantidade de 325 mg.L<sup>-1</sup> de cobre. O ensaio facilitou a precipitação seletiva do metal sulfeto de cobre. Nesse ensaio houve a formação de um precipitado azul escuro dentro do frasco lavador (Figura 24). Esse precipitado foi caracterizado por Difractometria de Raios-X (DRX), confirmando que o precipitado era covellita (CuS) (SILVA et al., 2018).



Figura 24. Frasco lavador que foi acoplado ao biorreator para o ensaio com AMD natural retirada de uma mina de cobre da região Amazônica. No fundo do frasco um precipitado de cor azul escura pode ser observado.

O difratograma do precipitado (Figura 24), apresenta todos os picos (101) (102) (103) (006) (110) (108) (203) identificados e característicos do mineral covellita ( $\text{CuS}$ ), estando de acordo com o banco de dados ICDD [01-075-2233]. Não foram observadas as fases acessórias de sulfeto de cobre, como  $\text{Cu}_2\text{S}$  (calcocita),  $\text{Cu}_{1.96}\text{S}$  (dijurleita),  $\text{Cu}_{1.8}\text{S}$  (digenita),  $\text{Cu}_{1.75}\text{S}$  (anilita),  $\text{Cu}_{1.12}\text{S}$  (yarrowita) e  $\text{CuS}$  (covellita); ou de zinco,  $\text{ZnS}$  (esfarelita), corroborando a presença de uma única fase de  $\text{CuS}$  (SILVA et al., 2018).

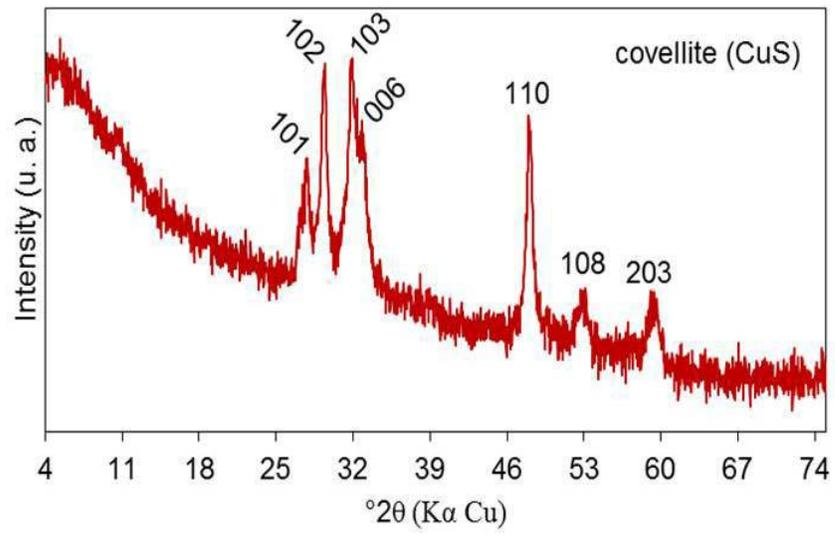


Figura 25. Difratoograma de DRX do precipitado (SILVA et al, 2018).

## **8. CONCLUSÃO**

O consórcio apresenta a capacidade de sobreviver em um ambiente ácido e desfavorável, como AMD sintética. As bactérias apresentaram a capacidade de aumentar o pH da AMD sintética e apesar dos problemas técnicos foi observado a formação de um precipitado azul escuro no frasco lavador. E com o trabalho de Silva e colaboradores (2018), foi confirmada a precipitação do mineral covellita, mostrando que o consórcio reduziu sulfato e produziu sulfeto de hidrogênio que reagiu com o cobre presente na solução. Com os resultados obtidos, dois procedimentos devem ser realizados para aumentar a eficiência do sistema, o primeiro seria o cultivo de um outro microrganismo que consuma acetato junto com o consórcio para diminuir a quantidade desse composto tóxico para SRBs. O segundo seria um maior fornecimento de composto orgânico para SRBs, aumentando a concentração de glicerol, para aumentar a taxa de redução de sulfato a sulfeto. Apesar disso, o consórcio microbiano mostrou ser uma boa alternativa para ser utilizado em tratamentos de AMD, possibilitando o aumento do pH e precipitação de metais de interesse econômico.

## 9. REFERÊNCIAS

ALAZARD, D.; JOSEPH, M.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; CAYOL, J. L.; OLLIVIER, B. Desulfosporosinus acidiphilus sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. **Extremophiles**, v. 14, n. 3, p. 305–312, 2010.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; DOS SANTOS, A. DE A. S. **Manual Biostat - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas Desenvolvimento**. 5ª Edição ed. Belém, PA: [s.n.].

AZAM, F.; SIMON, M. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. **Marine ecology progress series**, v. 51, p. 201-213, 1989.

BANKS, D.; YOUNGER, P. L.; ARNESEN, R. T.; IVERSEN, E. R.; BANKS, S. B. Mine-water chemistry: The good, the bad and the ugly. **Environmental Geology**, v. 32, n. 3, p. 157–174, 1997.

BAPTISTA NETO, J. A.; CRAPEZ, M.; MCALISTER, J. J.; GUTTERRES VILELA, C. Concentration and Bioavailability of Heavy Metals in Sediments from Niterói Harbour (Guanabara Bay/S.E. Brazil). **Journal of Coastal Research**, v. 21, n. 21, p. 811–817, 2005.

BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 53, 18 de março de 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 92, 16 de maio de 2011. p. 89.

BEEDER, J.; TORSVIK, T.; LIEN, T. Thermodesulforhabdus norvegicus gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 5, p. 331–336, 1995.

BIANCONI, A.; GOVONE, J. S.; ZUBEN, C. J. V; PIÃO, A. C. S.; PIZANO, M. A.; ALBERTI, L. F. Transformação de Dados e Implicações da Utilização do Teste de Kruskal-Wallis em Pesquisas Agroecológicas. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, p. 27–34, 2008.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by Clostridium pasteurianum - Batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18–26, 2001.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOONSTRA, J.; LIER, R. V; JANSSEN, G.; DIJKMAN, H.; BUISMAN, C. J. N. Biological treatment of acid mine drainage. **Process Metallurgy**, v. 9, p. 559–567, 1999.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

CARNAHAN, J. E.; MORTENSON, L. E.; MOWER, H. F.; CASTLE, J. E. Nitrogen Fixation in Cell-Free Extracts of Clostridium Paste Urianum. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 44, p. 520–535, 1960.

CHEN, C. K.; BLASCHEK, H. P. Effect of acetate on molecular and physiological aspects of Clostridium beijerinckii NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 499–505, 1999.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 633–642, 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7 ed. [s.l.] UNICAMP, 1997.

COULTON, R.; BULLEN, C.; HALLETT, C. The design and optimisation of active mine water treatment plants. **Land Contamination & Reclamation**, v. 11, n. 2, p. 273–279, 2003.

CRAPEZ, M. A. C. .; BAPTISTA NETO, J. A.; BISPO, M. G. S. Bacterial Enzymatic Activity and Bioavailability of Heavy Metals in Sediments From Boa Viagem Beach (Guanabara Bay). **Anuário Instituto Geociências - UFRJ**, v. 26, p. 60–68, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nat. Methods**, v. 10, p. 996–998, 2013.

EVANGELOU, V. P. Pyrite Chemistry: The Key for Abatement of Acid Mine Drainage BT - Acidic mining lakes. *In: Acidic mining lakes*. [s.l.: s.n.]. p. 197–222.

FELIZZOLA, J. F.; PIRES, C. DA S. **Guia Prático do Peaknet 6 Cromatografia de Íons Dionex**. Belém, PA: ISSN 1983-0513. Embrapa Amazônia Oriental, 2012.

FONTANA, L. F.; MENDONÇA FILHO, J. G.; PEREIRA NETTO, A. D.; SABADINI-SANTOS, E.; DE FIGUEIREDO JR, A. G.; CRAPEZ, M. A. C. Geomicrobiology of cores from Suruí Mangrove - Guanabara Bay - Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1674–1681, 2010.

GERCHACOV, S. M.; HATCHER, P. G. Improved technique for analysis of carbohydrates in sediment. **Limnology and Oceanography**, v. 17, p. 938–943, 1972.

HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology Software Review. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011.

HALLBERG, K. B. New perspectives in acid mine drainage microbiology. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 3–4, p. 448–453, 2010.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.

HARTREE, E.F. Determination of Protein:A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422- 427, 1972.

HOURI-DAVIGNON, C.; RELEXANS, J. C. Measurement of Actual Electron Transport

System (ETS) Activity in Marine Sediments by Incubation With INT. **Environmental Technology Letters**, v. 10, p. 91–100, 1989.

JAMESON, E.; ROWE, O. F.; HALLBERG, K. B.; JOHNSON, D. B. Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria. **Hydrometallurgy**, v. 104, p. 488–493, 2010.

JOHNSON, D. B. Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 3, p. 47–66, 2003.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: A review. **Science of the Total Environment**, v. 338, p. 3–14, 2005.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Carbon, Iron and Sulfur Metabolism in Acidophilic Micro-Organisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 54, n. 8, p. 201–255, 2009.

JOHNSON, D. B.; JAMESON, E.; ROWE, O. F.; WAKEMAN, K.; HALLBERG, K. B. Sulfidogenesis at Low pH by Acidophilic Bacteria and its Potential for the Selective Recovery of Transition Metals from Mine Waters. **Advanced Materials Research**, v. 71–73, p. 693–696, 2009.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

KIMURA, S.; HALLBERG, K. B.; JOHNSON, D. B. Sulfidogenesis in low pH (3.8–4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. **Biodegradation**, v. 17, n. 2, p. 159–167, 2006.

KLEINMANN, R. L. P.; HEDIN, R. S.; NAIRN, R. W.; Treatment of mine drainage by anoxic limestone drains and constructed wetlands. In: Geller A, Klapper H, SalomonsW, editors.

Acidic Mining Lakes: Acid Mine Drainage, Limnology and Reclamation. Berlin Springer; p. 303–19, 1998.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LIYANAGE, H.; KASHKET, S.; YOUNG, M.; KASHKET, E. R. Clostridium beijerinckii and Clostridium difficile Detoxify Methylglyoxal by a Novel Mechanism Involving Glycerol Dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2004–2010, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A., 2010.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. 2. ed. Oxford, UK: Elsevier Inc., 2009.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal Lipids Research**, v. 7, p. 574-576, 1966.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews | Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 441–454, 2008.

NANCUCHEO, I.; BITENCOURT, J. A. P.; SAHOO, P. K.; ALVES, J. O.; SIQUEIRA, J. O.; OLIVEIRA, G. Recent Developments for Remediating Acidic Mine Waters Using Sulfidogenic Bacteria. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-17, 2017.

NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using

low pH sulfidogenic bioreactors. **Hydrometallurgy**, v. 150, p. 222–226, 2014.

NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 34–44, 2012.

NANCUCHEO, I.; ROWE, O. F.; HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. Solid and liquid media for isolating and cultivating acidophilic and acid-tolerant sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 10, p. 1–6, 2016.

NORDSTROM, D. K. Advances in the Hydrogeochemistry and Microbiology of Acid Mine Waters. **International Geology Review**, v. 42, p. 499–515, 2000.

ODUM, E. P. The strategy of ecosystem development. **Science**, v. 164, p. 262–270, 1969.

PEER, Y. V. D.; CHAPELLE, S.; WACHTER, R. D. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 17, p. 3381–3391, 1996.

PENNAFIRME, S.; LIMA, I.; BITENCOURT, J.; CRAPEZ, M.; LOPES, R. Organic Matter Biodegradation by Bacterial Consortium under Metal Stress. *In: **Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies***. Rio de Janeiro, Brasil: Intechopen, 2015. p. 67–84.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; MORAIS, D. K.; CLARK, I. M.; HIRSCH, P. R.; TÓTOLA, M. R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.

QURESHI, N.; SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 419–427, 2007.

REIS, M. A. M.; LEMOS, P. C.; ALMEIDA, J. S.; CARRONDA, M. J. T. Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 2, p. 145–148, 1990.

RELEXANS, J. C. Measurement of the respiratory electron transport system (ETS) activity in marine sediments: state-of-the-art and interpretation. II. Significance of ETS activity data. **Marine Ecology Progress Series**, v. 136, p. 289–301, 1996.

RICE, D. L. The Detritus Nitrogen Problem: New Observations and Perspectives from Organic Geochemistry. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 9, p. 153–162, 1982.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 303–304, 2008.

ROBERTSON, W. J.; BOWMAN, J. P.; FRANZMANN, P. D.; MEE, B. J. *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 133–140, 2001.

ROWLEY, M.; WARKENTIN, D. D.; SICOTTE, V. Site demonstration of the biosulfide process at the former Britannia mine. **Proceedings of the Fourth International Conference on Acid Rock Drainage**, Vancouver, vol. IV, p. 1531–1548, 1997.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; STAMS, A. J. M.; HEDRICH, S.; NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 39–47, 2015.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; TRIANA, D.; SANZ, J. L. Bioremediation of acid mine drainage coupled with domestic wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 11, p. 2425–2431, 2012.

SANTOS, A. L.; JOHNSON, D. B. The effects of temperature and pH on the kinetics of an acidophilic sulfidogenic bioreactor and indigenous microbial communities. **Hydrometallurgy**, v. 168, p. 116–120, 2017.

SASS, H.; BERCHTOLD, M.; BRANKE, J.; KÖNIG, H.; CYPIONKA, H.; BABENZIEN, H. D. Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 212–219, 1998.

SEDLAR, K.; KOLEK, J.; PROVAZNIK, I.; PATAKOVA, P. Reclassification of non-type strain *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 as *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598. **Journal of Biotechnology**, v. 244, p. 1–3, 2017.

SEN, A. M.; JOHNSON, D. B. Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage. **Process Metallurgy**, v. 9, n. 21, p. 709–718, 1999.

SILVA, P. M. P.; LUCHETA, A. R.; DO CARMO, A. L. V.; BITENCOURT, J. A. P.; SANTOS, W. C. B.; FREDERICO, T. D.; OLIVEIRA, G. C.; NANUCHEO CUEVAS, I. P. N.; SIQUEIRA, J. O.; ALVES, J. O. Caracterização de covellita obtida por biosul-fetogênese da drenagem ácida de mina. 73º Congresso Anual da ABM – Internacional; 02 a 04 out. de 2018, São Paulo, SP. 2018.

SIMATE, G. S.; NDLOVU, S. Acid mine drainage: Challenges and opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1785–1803, 2014.

STACKEBRANDT, E.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; HIPPE, H. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, p. 253–258, 1999.

STEUDEL, R. The chemical sulfur cycle. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineering*. Ed: Lens, P., and Hulshoff Pol, L. London, UK:

International Association on Water Quality, p. 1–31. 2000.

STUBBERFIELD, L. C. E.; SHAW, P. J. A. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 12, p. 151–162, 1990.

TARPGAARD, I. H.; BOETIUS, A.; FINSTER, K. *Desulfobacter psychrotolerans* sp. nov., a new psychrotolerant sulfate-reducing bacterium and descriptions of its physiological response to temperature changes. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 109–124, 2006.

Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. PORTAL ACTION. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/tecnicas-nao-parametricas/teste-de-wilcoxon-mann-whitney-amostras-independentes>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

THEODORSSON-NORHEIM, E. Kruskal-Wallis test : BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 23, p. 57–62, 1986.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TREVORS, J. Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O<sub>2</sub> concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. **Water Research**, v. 77, p. 285–293, 1984

TUTTLE, J. H.; DUGAN, P. R.; MACMILLAN, C. B.; RANGLES, C. I. Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 2, p. 594–602, 1969.

VASQUEZ, Y.; ESCOBAR, M. C.; NECULITA, C. M.; ARBELI, Z.; ROLDAN, F. Biochemical passive reactors for treatment of acid mine drainage: Effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, composition of reactive mixture, and microbial activity. **Chemosphere**, v. 153, p. 244–253, 2016.

WAITE, C. C. DA C.; DA SILVA, G. O. A.; BITENCOURT, J. A. P.; SABADINI-SANTOS, E.; CRAPEZ, M. A. C. Copper and lead removal from aqueous solutions by bacterial consortia acting as biosorbents. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, p. 386–392, 2016.

WANG, G.; WANG, D. I. C. Elucidation of Growth Inhibition and Acetic Acid Production by *Clostridium thermoaceticum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 294–298, 1984.

WEISS, M. S.; ABELE, U.; WECKESSER, J.; WELTE, W.; SCHILTZ, E.; SCHULZ, G. E. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1627–1630, 1991.

WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. **IN Zender AJB (ed) Biology of anaerobic microorganisms. Wiley, New York**, p. 469–585, 1998.

WOESE, C. R.; FOX, G. E.; ZABLEN, L.; UCHIDA, T.; BONEN, L.; PECHMAN, K.; LEWIS, B. J.; STAHL, D. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. **Nature**, v. 254, p. 83–86, 1975.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, p. 1–8, 2016.

YANG, Z. Maximum Likelihood Phylogenetic Estimation from DNA Sequences with Variable Rates over Sites : Approximate Methods. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 306–314, 1994.

ZELLNER, G.; STACKEBRANDT, E.; KNEIFEL, H.; MESSNER, P.; SLEYTR, U. B.;  
MACARIO, E. C. DE; ZABEL, H. P.; STETTER, K. O.; WINTER, J. Isolation and  
Characterization of a Thermophilic, Sulfate Reducing Archaeobacterium, *Archaeoglobus*  
*fulgidus* Strain Z. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 151–160, 1989.