



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**ENGENHARIA AMBIENTAL**

**CULTIVO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO**  
**(BRS) E SUA APLICAÇÃO NA BIOREMEDIAÇÃO DE**  
**EFLUENTES ÁCIDOS CONTENDO METAIS**

Autor: Leonardo de Paiva Barbosa

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão

OUTUBRO DE 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Ouro Preto  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Engenharia  
Ambiental

**Leonardo de Paiva Barbosa**

**“CULTIVO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO  
(BRS) E SUA APLICAÇÃO NA BIOREMEDIAÇÃO DE  
EFLUENTES ÁCIDOS CONTENDO METAIS”**

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

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão

Ouro Preto, MG

Outubro de 2009

B238c

Barbosa, Leonardo de Paiva.

Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na biorremediação de efluentes ácidos contendo metais [manuscrito] / Leonardo de Paiva Barbosa. - 2009.

ix, 116f.: il., color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra.Mônica Cristina Teixeira.  
Co-orientador: Prof. Dr. Versiane Albis Leão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Engenharia Ambiental.  
Área de concentração: Saneamento ambiental.

1. Bactérias - Sulfato - Teses. 2. Biorremediação - Teses.  
3. Metais - Teses. 4. Biohidrometalurgia - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 579.846.2

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

*“As ciências estão todas unidas entre si, é mais fácil  
aprender todas juntas que separar uma das  
outras”*

*René Descarte*

*Ao meu filho, eis o resultado de  
nossas lágrimas e saudade.*

# AGRADECIMENTOS

- A Deus, por se fazer presente sempre em minha vida, me dando saúde para persistir na compreensão de sua complexa obra.
- Aos professores doutores Mônica Cristina Teixeira e Versiane Albis Leão pela credibilidade depositada, pelo apoio intelectual e profissional, pela amizade, pelos conselhos e por ter acreditado na concretização desse trabalho.
- Aos meus pais, Sérgio e Aparecida, pela confiança, carinho, companheirismo, dedicação, pelo apoio ao longo dessa caminhada. Aos meus irmãos, Raphael e Tiago, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo, acreditando e ajudando durante os momentos mais adversos. A Cecília, que também esteve presente, obrigado pela amizade e apoio.
- À doutoranda Sueli Bertolino que foi muito importante na realização desse trabalho. Obrigado pela amizade, pela dedicação, pelo apoio técnico e profissional.
- À bióloga Patrícia Freitas Costa pelo apoio incondicional, por sempre estar disposta a me ajudar, pela sua fundamental participação.
- À minha namorada, Patrícia, companheira de todas as horas, que sempre esteve ao meu lado me dedicando muito carinho, amor e paciência. Muito obrigado linda!
- Aos amigos, alunos e funcionários do laboratório NVMM: Sergio, Victor, Flávio, Flávia Pires, Marcio, Rodrigo, Gabriela, Flavinho, Daniel, Damares, Bruno, Mariana, Roberta e Camila. Obrigado pelo apoio, pela ajuda e pelos momentos de descontração.
- Ao corpo técnico do laboratório de Geoquímica Ambiental do departamento de Geologia da Universidade Federal de Ouro Preto pela realização das análises.
- Aos pesquisadores do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP pela identificação dos microrganismos.
- Ao pesquisador Júlio Cesar Cardoso do laboratório de Caracterização Molecular da UFOP pela realização das análises químicas.
- À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à Companhia Vale pelo financiamento do projeto de pesquisa.
- Aos meus grandes amigos e irmãos da república Área 51, que me acompanharam em mais essa jornada. Obrigado pelos momentos inesquecíveis, pelas lições de vida, pela amizade e aceitabilidade.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 TAXONOMIA DE PROCARIOTAS REDUTORES DE SULFATO (PRS).....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 METABOLISMO MICROBIANO DO SULFATO .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1 Redução dissimilativa do sulfato .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2 Redução assimilativa do sulfato.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 DOADORES DE ELÉTRONS E CONSERVAÇÃO DE ENERGIA NA REDUÇÃO</b> <b>DISSIMILATIVA DO SULFATO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DE BRS .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 BIOTECNOLOGIA DE TRATAMENTO DE EFLUENTES COM BRS .....</b>	<b>28</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 ÁREA DE COLETA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 ENRIQUECIMENTO DAS CULTURAS DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO ..</b>	<b>36</b>
<b>4.2.1 Curva de crescimento das culturas bacterianas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ESTUDO .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 CINÉTICA DE REMOÇÃO DE SULFATO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE</b> <b>CULTIVO.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 CRESCIMENTO DE BRS EM MEIOS DE CULTIVO CONTENDO METAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.1 Seleção de culturas de BRS tolerantes a metais .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.2 Crescimento bacteriano e redução de sulfato pelas BRS na presença de</b> <b>metais .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 CRESCIMENTO BACTERIANO E MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CULTURAS DE BRS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS DE BRS .....</b>	<b>44</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>ENRIQUECIMENTO E CULTIVO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS).....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Enriquecimento de culturas de BRS .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Curva de crescimento bacteriano .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Efeito da fonte de carbono e do pH inicial.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Seleção das culturas bacterianas .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Seleção do meio de cultivo .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO BIOLÓGICA DE SULFATO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Remoção biológica de sulfato em condições neutras e moderadamente ácidas.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Crescimento da cultura mista LG01 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Crescimento da cultura mista UASB01 .....</b>	<b>66</b>
<b>5.4</b>	<b>REMOÇÃO BIOLÓGICA DE SULFATO EM RAZÃO DQO/SULFATO TEÓRICA ÓTIMA.....</b>	<b>71</b>
<b>5.5</b>	<b>CINÉTICA DE REMOÇÃO BIOLÓGICA DE SULFATO EM DIFERENTES RAZÕES DQO/SULFATO .....</b>	<b>74</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Cinética de remoção biológica de sulfato utilizando lactato como substrato orgânico.....</b>	<b>74</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Cinética de remoção biológica de sulfato utilizando-se etanol como substrato orgânico.....</b>	<b>79</b>
<b>5.6</b>	<b>CRESCIMENTO DE BRS EM MEIOS CONTENDO METAIS .....</b>	<b>83</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Seleção de culturas de BRS tolerantes a metais .....</b>	<b>83</b>
<b>5.6.2.</b>	<b>Remoção de sulfato e precipitação de metais pesados por BRS .....</b>	<b>85</b>
<b>5.7.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA CULTURA LG01 .....</b>	<b>94</b>
<b>5.8.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DAS BRS DA CULTURA LG01 .....</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação esquemática da transferência de elétrons na redução dissimilativa do sulfato, com compostos carbônicos como fonte de energia e sulfato como acceptor de elétrons. Adaptado a partir de Matias <i>et al.</i> (2005).....	11
Figura 2.2 - Representação esquemática da redução assimilativa do sulfato até a síntese do aminoácido cisteína. Extraído com adaptações de Shen e Buick (2004). .....	14
Figura 2.3 - Rota metabólica do hidrogênio proposta por Odum e Peck (1981) para explicar a conservação de energia durante o crescimento de <i>Desulfovibrio</i> em sistema lactato/sulfato.. .....	18
Figura 2.4 - Desenho esquemático das reações de oxidação de etanol e lactato em BRS. Adaptado a partir de Rabbus <i>et al.</i> , (2006). .....	22
Figura 2.5 - Vias de degradação microbiana de matéria orgânica em ambientes anóxicos na presença (a) e na ausência de sulfato (b). Extraído e adaptado a partir de Myers e Stams (2008). .....	26
Figura 4.6 - Vista da Lagoa do Gambá, cidade de Ouro Preto – MG.....	33
Figura 4.7 - Registro fotográfico dos reatores anaeróbios onde foram coletadas as amostras denominadas UASB. (a) Reator UASB situado na ETE Arrudas, na cidade de Belo Horizonte; (b) reator UASB experimental da UFOP. ....	34
Figura 4.8 - Vista de um afloramento de pirita em uma região de drenagem ácida de mina na cidade de Ouro Preto – MG.....	35
Figura 4.9 - Frascos para cultivo de BRS em condições anaerobiose.....	41
Figura 5.10 - Enriquecimento de BRS das amostras coletadas em meio líquido Postgate C “modificado”. (a) Enriquecimento e cultivo das amostras e (b) crescimento das culturas de BRS: (1) inóculo em t = 0 h, (2) inóculo em t = 24 h e, (3) inóculo em t = 72 h.....	47
Figura 5.11 - Taxa de crescimento em meio Postgate C “modificado” em pH 7,0, variando a fonte de carbono das culturas mistas de BRS coletadas na Lagoa do Gambá (LG), dos lodos dos reatores UASB (UASB) e da drenagem ácida de mina (DAM).....	51
Figura 5.12 - Remoção de sulfato para as culturas LG01, LG02, UASB01, UASB02 e DAM nos quatro meios de cultura avaliados, variando a fonte de carbono (lactato ou etanol) e o pH (7,0 ou 5,5). .....	58
Figura 5.13 - Cultivo das culturas LG01 e UASB01 em meios de cultura Postgate B e Postgate C, com lactato como substrato orgânico, em pH 7,0 e a 35° C. (a) Eficiência de remoção de sulfato e, (b) crescimento bacteriano. ....	60

Figura 5.14 - Variação do pH nas culturas LG01 em diferentes substratos orgânicos (lactato ou etanol) durante 216 horas de cultivo e a 35° C. ....	63
Figura 5.15 - Influência da fonte de carbono e do pH inicial na remoção de sulfato durante o cultivo da amostra LG01: (a) lactato, pH 7,0 e 5,5; (b) etanol, pH 7,0 e 5,5. Concentração inicial de sulfato de 3000 mgL <sup>-1</sup> , a 35° C e em razão DQO/sulfato igual a 1,0 para lactato e 3,6 para etanol. ....	65
Figura 5.16 - Variação do pH nas culturas UASB01 em diferentes substratos orgânicos (lactato ou etanol) durante 216 horas de cultivo a 35° C. ....	68
Figura 5.17 - Influência da fonte de carbono e do pH inicial na remoção de sulfato durante cultivo da amostra UASB01: (a) lactato, pH 7,0 e 5,5; (b) etanol, pH 7,0 e 5,5. Concentração inicial de sulfato de 3000 mgL <sup>-1</sup> , a 35° C e em razão DQO/sulfato igual a 1,0 para lactato e 2,0 para etanol. ....	70
Figura 5.18 - Remoção biológica de sulfato em meio Postgate C, em condições neutras e diferentes substratos orgânicos, com razão DQO/sulfato 0,67. (a) Cultura LG01 e (b) cultura UASB01. ....	72
Figura 5.19 - Efeitos da razão DQO/sulfato no consumo de sulfato e no crescimento bacteriano da cultura LG1 em sistema batelada com meio Postgate C contendo lactato a 35° C. (a) Consumo biológico de sulfato e, (b) crescimento bacteriano. Símbolos: razão DQO/sulfato (□) 0,67, (♦) 1,1, (○) 1,5 e (Δ) 2,0. ....	75
Figura 5.20 - Variação da concentração de ácidos orgânicos durante a degradação de lactato e redução de sulfato por BRS em razão DQO/SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 2,0 e a 35° C pela cultura LG01. ....	78
Figura 5.21 - Efeitos da razão DQO/sulfato no consumo de sulfato e no crescimento bacteriano da cultura LG1 em sistema batelada em meio Postgate C contendo etanol a 35° C. (a) Consumo biológico de sulfato e, (b) crescimento bacteriano. Símbolos: razão DQO/sulfato (□) 0,67, (♦) 1,6, (○) 2,0 e (Δ) 3,6. ....	80
Figura 5.22 - Perfil de crescimento da cultura LG01 em meio Postgate C, em pH 7,0, em diferentes concentrações dos metais cobre, manganês e níquel (condições 1, 2 e 3) e em diferentes substratos orgânicos, (a) lactato e (b) etanol. ....	87
Figura 5.23 - Cinética de remoção de sulfato da cultura LG01 em meio Postgate C, em pH 7,0, em diferentes concentrações dos metais cobre, manganês e níquel (condições 1, 2 e 3) e em diferentes substratos orgânicos, (a) lactato e (b) etanol. ....	90
Figura 5.24 - Eficiência de remoção de metais durante o cultivo da amostra LG01 em diferentes fontes de carbono: (a) e (b) lactato; (c) e (d) etanol. ....	93

Figura 6.25 - Micrografias de células bacterianas da cultura LG01 fixadas e coradas pelo método de Gram, (a) e (b) cultura LG01 cultivada com lactato e; (c) e (d) cultura LG01 cultivadas em etanol..... 96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Energia livre de reações sulfidogênicas com diferentes doadores de elétrons. Adaptado segundo Thauer <i>et al.</i> (1977) e Liamleam e Annachhatre (2007). .....	23
Tabela 4.2 - Composição do meio de cultura Postgate C “modificado” segundo Cheung e Gu (2003). .....	36
Tabela 4.3 - Composição dos meios de cultura ( $\text{gL}^{-1}$ ) para análise do crescimento e consumo de sulfato das culturas de bactérias redutoras de sulfato. ....	39
Tabela 4.4 - Componentes utilizados na reação de PCR.....	45
Tabela 5.5 - Parâmetros de crescimento para as culturas de BRS em meio Postgate C “modificado”, em pH 7,0, com variação na fonte de carbono das culturas mistas de BRS provenientes da Lagoa do Gambá (LG), dos lodos dos reatores UASB (UASB) e de uma drenagem ácida de mina (DAM). ....	49
Tabela 5.6 - Remoção biológica de sulfato e crescimento celular dos cultivos mistos de BRS em diferentes meios de cultura contendo lactato como fonte de carbono durante 55 horas de cultivo a 35° C.....	53
Tabela 5.7 - Remoção biológica de sulfato e crescimento celular dos cultivos mistos de BRS em diferentes meios de cultura contendo etanol como fonte de carbono durante 55 horas de cultivo a 35° C.....	54
Tabela 5.8 - Remoção biológica de sulfato por número de gerações ( $\text{mgL}^{-1}$ por geração) produzidas pelas culturas BRS em diferentes meios de cultura contendo lactato como fonte de carbono durante 55 horas de cultivo a 35° C.....	57
Tabela 5.9 - Parâmetros de crescimento para a cultura LG01 em meio Postgate C em valores de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ igual a 1,0 para lactato e 3,6 para etanol, em diferentes condições de pH inicial. ....	62
Tabela 5.10 - Parâmetros de crescimento para a cultura de UASB01 em meio Postgate C em valores de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ igual a 1,0 para lactato e 2,0 para etanol, em diferentes condições de pH inicial. ....	67
Tabela 5.11 - Eficiência de remoção absoluta de sulfato e taxa de crescimento da cultura LG01 em meio contendo lactato em diferentes razões DQO/sulfato.....	76
Tabela 5.12 - Eficiência de remoção absoluta de sulfato e taxa de crescimento da cultura LG01 em meio contendo etanol em diferentes razões DQO/sulfato.....	82

Tabela 5.13 - Crescimento de culturas de BRS na presença de metais pesados (20 mgL <sup>-1</sup> níquel, 10 mgL <sup>-1</sup> cobre e 10 mgL <sup>-1</sup> manganês) em diferentes substratos orgânicos e pH. ....	84
Tabela 5.14 - Parâmetros de crescimento para a cultura LG01 em meio Postgate C na presença de metais: condição (1) – controle sem metais; condição 2 - concentrações iniciais de 10 mgL <sup>-1</sup> de Cu, 10 mgL <sup>-1</sup> de Mn e 20 mgL <sup>-1</sup> de Ni e; condição 3 - concentrações iniciais de 20 mgL <sup>-1</sup> de Cu, 20 mgL <sup>-1</sup> de Mn e 50 mgL <sup>-1</sup> de Ni. ....	88
Tabela 5.15 - Alinhamento com as seqüências depositadas no banco de dados. Amostras das culturas LG01 cultivadas em lactato. ....	97
Tabela 5.16 - Alinhamento com as seqüências depositadas no banco de dados. Amostras das culturas LG01 cultivadas em etanol. ....	97

## RESUMO

A utilização de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em tratamentos passivos de efluentes ácidos com metais pesados tem se mostrado uma atraente alternativa biotecnológica. A eficiência do tratamento pode estar vinculada com as condições do efluente (pH e concentração de metais) e com a concentração e origem do substrato orgânico. A variação na razão entre a concentração do substrato orgânico e do sulfato parece interferir na remoção biológica deste ânion em culturas mistas de BRS. O presente trabalho teve como objetivo cultivar culturas mistas de BRS mesófilas em sistema batelada com diferentes substratos orgânicos e em condições variadas de pH, avaliando o consumo biológico de sulfato e a tolerância a metais pesados. As culturas de BRS foram cultivadas a 35° C em meio de cultura líquido Postgate C com 3,0 gL<sup>-1</sup> de sulfato, em pH 5,5 e 7,0. O lactato e o etanol foram os substratos orgânicos disponíveis para o metabolismo das BRS. As culturas cultivadas em condições ácidas com lactato como substrato orgânico promoveram a neutralização do meio ao longo do cultivo. A maior eficiência de remoção de sulfato foi de 98% na presença de lactato em pH 7,0, em uma razão DQO/sulfato de 2,0. Quando o etanol foi utilizado, a eficiência de remoção de sulfato foi de 50% em uma razão DQO sulfato de 3,6. Acúmulo de acetato no meio foi observado durante o cultivo de BRS devido à oxidação do lactato e do etanol. Concentrações variadas de metais pesados foram adicionadas ao sistema em condições neutras, havendo proliferação celular e consumo de sulfato na presença de cobre (10 e 20 mgL<sup>-1</sup>), manganês (10 e 20 mgL<sup>-1</sup>) e níquel (20 e 50 mgL<sup>-1</sup>). A presença de metais pesados dissolvidos no meio de cultivo interferiu na remoção biológica de sulfato, entretanto, a concentração de sulfeto produzido foi o bastante para remover acima de 95% dos metais presentes no meio. A caracterização morfológica e molecular revelou que a diversidade de espécies de BRS das culturas cultivadas em meio contendo lactato ou etanol era diferente. Os resultados deste trabalho indicam que essas culturas de BRS apresentam alto potencial para neutralização e remoção de sulfato e metais de efluentes contaminados.

## ABSTRACT

Sulfate Reducing Bacteria (SRB) can be used as a promise and attractive biotechnology based alternative to promote passive treatment of industrial effluents. Sulfate is reduced to sulfide while organic matter is oxidized producing carbonate and bicarbonate ions. Treatment efficiency however depends on pH and metals content of the selected effluent and also on the quantity of organic matter available in the system (measured by means of COD-Chemical Oxygen Demand). As the COD/sulfate ratio varies, there are also different sulfate consumption degrees. It is commonly assumed that the optimal COD/sulfate ratio is approximately 0.67. The aim of this work was to optimize the growing and sulfate reduction capacity of mixed bacterial cultures obtained from different natural environments. Samples were cultured in batch reactors using liquid Postgate C medium containing sodium sulfate,  $3.0 \text{ gL}^{-1}$ , different pH values (5.5 and 7.0) and different electron donors (sodium lactate and ethanol) at  $35^{\circ}\text{C}$ . In some experiments it was also added copper ( $10$  and  $20 \text{ mgL}^{-1}$ ), manganese ( $10$  and  $20 \text{ mgL}^{-1}$ ) and nickel ( $20$  and  $50 \text{ mgL}^{-1}$ ) in order to study bacterial resistance to these metals. Lactate growing samples promoted pH neutralization and shown the capacity of reducing 43% of the initial sulfate content. Maximum sulfate reducing performance (98%) was achieved by the sample cultured in lactate containing medium, pH 7.0. However, when growing with ethanol as organic carbon source a sulfate reduction of about 50% was achieved. Production of acetate was observed as a consequence of the oxidation of both, lactate and ethanol. The obtained results shown that, under the experimental conditions adopted, sodium lactate was more efficient in promoting biological reduction of sulfate and neutralizing the pH of the medium when compared to ethanol. In addition SRB could be potentially used for reducing sulfate from acid wastewaters even though metals are present.

# 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, há uma crescente conscientização, ao nível global, sobre o uso racional dos recursos naturais e o desenvolvimento de tecnologias menos impactantes ao ambiente. O modelo atual de “desenvolvimento sustentável” tem gerado uma série de discussões multidisciplinares entre pesquisadores, acadêmicos e sociedade devido à dificuldade em se estabelecer um equilíbrio entre o crescimento econômico e populacional sem comprometer o ambiente natural. Dentre os recursos naturais, os corpos hídricos sofrem a maior carga de impactos antrópicos devido a sua primordial participação nos processos econômicos e biológicos que estruturam a sociedade. Nesse contexto, o presente trabalho busca aprimorar técnicas biotecnológicas para o tratamento de efluentes industriais ricos em sulfato utilizando bactérias redutoras de sulfato (BRS). O emprego dessa biotecnologia visa promover a mitigação dos impactos ambientais nos corpos hídricos e produzir um menor volume de subprodutos originados nas etapas de tratamento.

O ácido sulfúrico é utilizado em vários processos industriais, que resultam no aumento da concentração de sulfato em águas residuárias (Muyzer e Stams, 2008). A produção e descarga desse ânion são observadas em algumas indústrias como as de refino de petróleo, de produção de alimentos, no processamento de polpa e papel, em plantas de extração de carvão mineral e em jazidas de extração de minerais sulfetados. Uma técnica amplamente empregada na remoção do sulfato nesses efluentes industriais é o tratamento químico com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Todavia, a utilização dessa técnica tem gerado problemas devido ao alto custo dos reagentes, à produção de um grande volume de lodo, à necessidade de tratamento do lodo gerado e à ineficiência na remoção de sulfato do efluente (Maree *et al.*, 2004). A utilização de tratamento químico em conjunto com tratamento biológico pode ser uma estratégia econômica e ambientalmente viável na remoção de poluentes em efluentes industriais.

A utilização de BRS em processos biotecnológicos pode ser benéfica na remoção de sulfato, de metais e de matéria orgânica presentes em efluentes industriais. A remoção de metais pesados é uma das maiores vantagens dessa tecnologia. O sulfeto gerado pela redução biológica do sulfato precipita quimicamente os metais dissolvidos como sulfetos metálicos. A baixa solubilidade dos sulfetos metálicos formados permite a recuperação e reutilização desses metais de efluentes contaminados (Metcalf, 2003). Além da remoção

de metais, o tratamento biológico de efluentes com BRS permite a redução dos valores de sulfato para limites muito inferiores aos observados nos processos de tratamento químico.

O presente estudo disponibiliza informações sobre o cultivo de culturas mistas de BRS em sistema batelada com variações nas condições de cultivo (pH, substrato orgânico e concentração de metais pesados). A compreensão holística dos fatores que influenciam a atividade de BRS favorece sua aplicação nos processos de biorremediação. No presente trabalho, as pesquisas com BRS foram conduzidas da seguinte maneira: enriquecimento de amostras naturais de BRS; seleção de um meio de cultivo apropriado para o crescimento do grupo; avaliação da influência do pH e do substrato orgânico no metabolismo do sulfato; definição das melhores razões DQO/sulfato para promover o consumo de sulfato; tolerância e remoção de metais em variadas concentrações por BRS; identificação morfológica e molecular das culturas de BRS mais adaptadas às condições estudadas. Os resultados, as discussões e as conclusões aqui contidos disponibilizam informações úteis para a realização de trabalhos de pesquisa que abordam os aspectos básicos da atividade de BRS e a aplicação dessa biotecnologia em tratamento de efluentes industriais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Taxonomia de Procariotas Redutores de Sulfato (PRS)

A diversidade de espécies e a semelhança eco-fisiológica entre grupos distintos de bactérias redutoras de sulfato (BRS) dificultam a sua classificação taxonômica e a definição de uma sistemática filogenética (Gibson, 1990). Até a década de 1980, os estudos taxonômicos de BRS eram fundamentados em suas características fenotípicas (Widdel e Pfennig, 1984). Aspectos como a morfologia celular, o metabolismo, a produção de esporos e a capacidade de adaptação aos habitats eram utilizados na descrição de táxons específicos (Castro *et al.*, 2000). Contudo, a presença de espécies de BRS em ambientes variados e sua capacidade de metabolização de substratos orgânicos distintos questiona os critérios taxonômicos do grupo fundamentada unicamente em caracteres fenotípicos, principalmente quanto a classificação em gêneros e espécies. Por exemplo, Oyaizu e Woese (1985) realizaram estudos genéticos com a espécie *Desulfovibrio desulfuricans* e concluíram que esta bactéria heterotrófica apresentava alta similaridade genética com bactérias fototróficas púrpuras e *Myxococcus*.

Recentemente, um conjunto de várias técnicas microbiológicas têm sido utilizado para identificar as BRS, incluindo a morfologia celular, a mobilidade e localização do flagelo, conteúdo de guanina mais citosina (G+C) no DNA, tipo da proteína sulfito redutase (desulfoviridina, P582, desulforubidina, desulfofusicidina), complexo de proteínas de transferência de elétrons (citocromo), menaquinonas respiratórias, condições de crescimento e capacidade de metabolizar acetato (Kaksonen *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2000). Porém, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento genético tem substituído a todas essas análises devido a sua maior especificidade e segurança na classificação, além da identificação *in situ* da diversidade de espécies de BRS em ecossistemas naturais ou de biorremediação (Muyzer e Stams, 2008).

A técnica de sequenciamento genético comumente utilizada na taxonomia de Procariotas Redutores de Sulfato (PRS) se baseia no sequenciamento dos genes da subunidade 16S do RNA ribossomal (RNAr) 16S. Segundo Castro *et al.* (2000), os PRS podem ser classificados em cinco linhagens filogenéticas distintas, sendo quatro grupos dentro do domínio *Eubacteria* (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Thermodesulfobacteria*, *Nitrospira*) e um grupo do domínio *Archea* (*Euryarcheota*). Baseados nesta mesma técnica

de identificação molecular, Muyzer e Stams (2008) propõem uma sistemática com sete linhagens, adicionando um grupo à *Eubacteria* (*Thermodesulfobiacea*) e um filo a *Archea* (*Crenarchaeota*). Os PRS apresentam em comum a enzima sulfito redutase, responsável pela via dissimilativa na respiração do sulfato (Gupta, 2000a). A origem filogenética desta enzima ainda não é clara, podendo ter sido herdada de um ancestral comum a *Archea* e *Eubacteria* ou por meio da transferência paralela entre os membros destes domínios após a sua divergência evolutiva (Wagner *et al.*, 1998).

As BRS mesófilas Gram negativas apresentam a maior diversidade de espécies dentre as BRS. Este grupo pertence ao Filo *Proteobacteria*, a classe  $\delta$  – *Proteobacteria*. As famílias *Desulfovibrionaceae* e *Desulfobacteriaceae* agrupam a maioria das espécies da classe. O gênero mais estudado deste grupo é o *Desulfovibrio*, devido principalmente a sua ampla distribuição geográfica e facilidade de cultivo em condições laboratoriais (Scheid e Stubner, 2001). Estas bactérias são predominantemente Gram negativas e oxidam incompletamente o substrato orgânico a acetato na respiração do sulfato. Contudo, no gênero *Desulfonema* as espécies são Gram positivas e oxidam completamente o acetato a dióxido de carbono (Fukui *et al.*, 1999). A morfologia varia de cocos a bacilos, havendo predomínio de espécies mesófilas, porém há espécies psicrófilas e termófilas (Shen e Buick, 2004; Sass *et al.*, 1998).

Os outros grupos de BRS são menos representativos em diversidade, contudo não são menos importantes. O filo *Firmicutes* reúne BRS com baixo conteúdo de citosina e guanina (C+G) no DNA (aproximadamente 38%), presença de parede celular espessa, produção de endósporos e tolerância a temperatura moderadamente alta (65°C). Os representantes são, na grande maioria, Gram positivos, havendo algumas espécies Gram negativas (Castro *et al.*, 2000). Os integrantes deste grupo são classificados fisiologicamente como não oxidantes de acetato. Vários autores têm identificado representantes do gênero *Desulfotomaculum* em minas de extração mineral, jazidas de hidrocarbonetos ou em plantas de extração de petróleo (Chockalingam e Subramanian, 2006; Nakagawa *et al.*, 2002; Leu *et al.*, 1998; Isaksen *et al.*, 1994).

As linhagens *Thermodesulfobiacea*, *Thermodesulfobacteria* e *Nitrospira* possuem, basicamente, BRS termófilas. A família *Thermodesulfobiacea* apresenta um único gênero, *Thermodesulfobium*, capaz de crescer quimioautotroficamente com H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> com sulfato comoceptor de elétrons (Mori *et al.*, 2003). Este gênero era classificado no grupo

Nitrospora, sendo atualmente classificado na família *Thermodesulfobiacea* a partir do seu sequenciamento genético (Mori *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2000). O principal grupo de *Thermodesulfobacteria* é o gênero *Thermodesulfobacterium*, caracterizado por crescer em temperaturas extremamente elevadas (80° C), serem imóveis, não formadoras de esporos, Gram negativas e não oxidantes de acetato (Jeanthon *et al.*, 2002). A linhagem *Nitrospira* é representada pelo gênero *Thermodesulfovibrio*. Espécies deste gênero são termófilas (70° C), móveis, não formadoras de esporos, Gram negativas, capazes de reduzir metabolicamente o sulfato via oxidação de hidrogênio ou substratos orgânicos (não oxidantes de acetato) (Haouari *et al.*, 2008). A semelhança fisiológica, morfológica e ecológica entre estas linhagens de termófilos dificulta sua identificação, sendo a análise do conteúdo genético (C+G no DNA) uma estratégia para a classificação taxonômica (Haouari *et al.*, 2008).

As *Archaeas* termófilas constituem dois grupos de microrganismos redutores de sulfato, classificados como filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*. Há uma alta similaridade fenotípica entre os microrganismos classificados nestes filos. Os representantes de *Euryarchaeota* são caracterizados por uma fina parede celular de peptidoglicano, o envelope celular é constituído por uma única camada superficial de glicoproteínas, são halófilos moderados (1,5-1,8% de NaCl) e termófilos extremos (80° C) (Kunow *et al.*, 1995). O gênero *Archeoglobus* é o único que apresenta atividade redutora de sulfato dentro do filo *Euryarchaeota* (Castro *et al.*, 2000). As enzimas responsáveis pelo metabolismo do sulfato estão ativas e a oxidação do lactato ocorre por uma via utilizada normalmente por bactérias metanogênicas (Radianingtyas e Wright, 2003). Os microrganismos classificados no filo *Crenarchaeota* se diferenciam das espécies de outros filos principalmente pelo conteúdo de guanina e citosina (G+C) em seu RNAr 16S (60 a 69%) (Buckley *et al.*, 1998). O estudo de comunidades microbianas de ambientes com altas temperaturas, como sistemas hidrotermais marinhos e terrestres, são complexos e fastidiosos devido a dificuldade em se cultivar estas espécies em condições artificiais. A utilização de técnicas de biologia molecular é fundamental para a identificação e classificação destes grupos (Buckley *et al.*, 1998).

O emprego de técnicas de sequenciamento genético tem promovido a construção de novos cladogramas para o estudo das relações filogenéticas de táxons de BRS e PRS. O avanço destas técnicas tem facilitado a compreensão da história evolutiva do grupo. Contudo, os estudos fenotípicos não são menos necessários ou importantes. É por meio da

caracterização morfológica, fisiológica e ecológica dos grupos que compreenderemos a influência destes microrganismos no ambiente natural, facilitando assim sua possível aplicação nos processo de biorremediação.

## **2.2 Metabolismo microbiano do sulfato**

No ambiente, o enxofre é encontrado em diferentes estados de oxidação nas formas inorgânicas e orgânicas (Stumm e Morgan, 1996). A influência dos microrganismos no ciclo geoquímico do enxofre promove profundas modificações ambientais, principalmente em sedimentos marinhos, onde está a maior reserva de sulfato da biosfera (Bottrell e Newton, 2006). A alteração do potencial redox, o acúmulo de pirita em sedimentos oceânicos e a ciclagem de matéria orgânica em ambientes anóxicos são algumas dessas modificações ambientais realizadas pelos microrganismos envolvidos no ciclo do enxofre (Shen e Buick, 2004). A principal rota de remoção de enxofre em ambientes aquáticos ou alagados é por meio da redução biológica do sulfato a sulfeto, processo realizado pelos Procariotas Redutores de Sulfato (PRS) (Gibson, 1990). Cerca de 80 a 90% do sulfeto produzido biologicamente é reoxidado no ambiente pelo oxigênio ou pelo Fe (III) e Mn (IV) sedimentares (Jorgensen e Bak, 1991).

Os PRS são responsáveis por reduzir metabolicamente íons sulfato ou outras espécies oxidadas do enxofre (sulfito, tiosulfato ou enxofre elementar) a sulfeto de hidrogênio (Gibson, 1990). A redução biológica do enxofre está associada à respiração anaeróbica do sulfato, havendo armazenamento de energia celular a partir da oxidação de um substrato (Madigan *et al.*, 2004). Na respiração anaeróbica, compostos orgânicos ou hidrogênio (H<sub>2</sub>) são oxidados havendo transferência de elétrons através de um complexo enzimático celular, conhecido como cadeia respiratória, até um aceptor inorgânico, que não o oxigênio (Madigan *et al.*, 2004). No metabolismo biológico, o sulfato é transportado para o interior da célula através da membrana citoplasmática (Kramer e Cypionka, 1989). O processo biológico de produção de sulfeto a partir da redução do sulfato é chamado de “redução dissimilativa do sulfato”.

O enxofre é de fundamental importância na constituição de moléculas orgânicas nas células. Quantitativamente, o enxofre constitui cerca de 1% da massa seca dos organismos vivos (Shen e Buick, 2004). Além dos procariotas, os fungos, as algas e as plantas também

são capazes de assimilar sulfato inorgânico para a síntese de moléculas orgânicas (Kopriva e Koprivova, 2005). O sulfato é assimilado biologicamente principalmente para síntese do aminoácido cisteína (Bick *et al.*, 2000). Todavia, o enxofre também desempenha função essencial em cofatores enzimáticos incluindo biotina, coenzima A, coenzima M, tiamina e ácido lipóico, e nos processos redox de uma variedade de complexos protéicos celulares (Kertesz, 2001). O processo metabólico realizado pelos seres vivos capazes de incorporar sulfato inorgânico a moléculas orgânicas é chamado de “redução assimilativa do sulfato”.

### 2.2.1 Redução dissimilativa do sulfato

O metabolismo dissimilativo do sulfato está representado na figura 2.1. O processo se inicia com o transporte de sulfato para o interior da célula. O complexo enzimático responsável pela transferência de elétrons na respiração está localizado no citoplasma celular e na membrana interna da célula (Cypionka, 1989). O transporte do sulfato transmembrana comumente ocorre a partir de um gradiente iônico, havendo evidências para um sistema de troca iônica com  $H^+/Na^+$ , a partir de um gradiente de sódio ao longo da membrana celular das bactérias redutoras de sulfato (Cypionka, 1989). Neste processo não há gasto energético, contudo quando em baixas concentrações de sulfato no meio, ATP pode ser consumido para produzir um gradiente iônico favorável para o transporte de sulfato (Krekeler e Cypionka, 1995). O transporte de sulfato pode ser reversível, havendo saída de sulfato intracelular em condições de alta concentração interna (Cypionka, 1989).

A ativação do sulfato citoplasmático ocorre a partir da sua fosforilação pela enzima ATP sulfurilase (uma fosforilação ao nível do substrato), havendo produção de adenosina-5'-fosfosulfato (APS), também conhecida como adenilsulfatase (Kramer e Cypionka, 1989). Neste processo, há consumo de um mol de ATP por mol de sulfato ativado, e produção de pirofostato (equação 2.1):



$$\Delta G^{\circ'} = +46 \text{ KJ/mol}$$

Onde, APS = adenosina-5'-fosfosulfato e PPi= pirofosfato inorgânico.

O PPi formado é hidrolisado por uma pirofosfatase. Essa enzima interfere na atividade da ATP sulfurilase, favorecendo a formação de APS (Cypionka, 1995) (equação 2.2):



$$\Delta G^{\circ'} = -22 \text{ KJ/mol}$$

Onde, Pi= ortofosfato.

A soma das reações (2.1) e (2.2):



$$\Delta G^{\circ'} = +24 \text{ KJ/mol}$$

APS formado é o aceptor de elétrons imediato, sendo convertido a sulfito e AMP (equação 2.4). A redução de APS é catalizada por uma redutase (APS redutase), encontrada em várias espécies de BRS (Kramer e Cypionka, 1989). O caráter anaeróbio das BRS pode estar relacionado com essa enzima devido a sua atividade em condições anóxicas estrita (Baumgartner *et al.*, 2006). O AMP formado é convertido em duas moléculas de ADP por uma adenil quinase dependente de ATP.



$$\Delta G^{\circ'} = -68,6 \text{ kJ/mol}$$

Onde,  $HSO_3^-$  = sulfito e AMP= adenosina 5' - monofosfato.

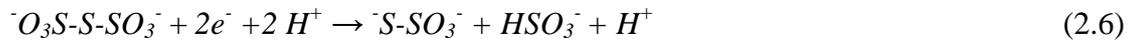
O mecanismo de transferência de elétrons ao sulfito para a formação de sulfeto pode ocorrer por dois caminhos: pela via do tritionato ou pela redução direta de sulfito a sulfeto (Thebrath *et al.*, 1989). A via do tritionato promove a redução do sulfito por três reduções progressivas de 2 elétrons, formando tritionato e tiosulfato como intermediários (Akagi, 1983). Na redução direta, 6 elétrons são transferidos para sulfito sem formação de algum intermediário. A redução de sulfito a sulfeto pode estar acoplada a síntese de 3 ATPs (Badziong e Thauer. 1978).

A via do tritionato se inicia com a redução de sulfito a tritionato ( $^-\text{O}_3\text{S-S-SO}_3^-$ ) por uma sulfito redutase (Rabus *et al.*, 2006), como na equação (2.5) abaixo:

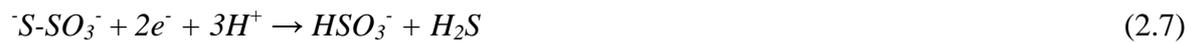


$$\Delta G^{\circ'} = -46,3 \text{ kJ/mol}$$

A seguir, uma tritionato redutase promove a transferência de 2 elétrons para o tritionato formando tiosulfato, que é posteriormente reduzido a sulfeto por uma tiosulfato redutase (Rabus *et al.*, 2006) (equações 2.6 e 2.7):



$$\Delta G^{\circ'} = -123 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^{\circ'} = -2.1 \text{ kJ/mol}$$

A reação 2.5 é exergônica o bastante para acoplar a síntese de 1 mol de ATP e a reação 2.6 garante a síntese de 2 mols de ATP (Badziong e Thauer, 1978). O saldo energético final na redução dissimilativa de sulfato é de 1 mol de ATP por mol de sulfato reduzido.

A síntese destes intermediários na redução de sulfito a sulfeto foi verificada por Fitz e Cypionka (1991). Neste trabalho, o tritionato e tiosulfato foram produzidos por BRS durante a redução de sulfito, com doadores de elétrons específicos. Há relação entre a produção destes intermediários e a concentração dos doadores e aceptores de elétrons, indicando uma rota ativa no metabolismo dissimilativo do sulfato.

A redução do sulfito (+IV) a sulfeto (-II) por uma sulfito redutase é um processo sem gasto energético, que envolve a transferência de seis elétrons (Rabus *et al.*, 2006) (equação 2.8):



$$\Delta G^{\circ'} = -171.1 \text{ kJ/mol}$$

As sulfito redutases dissimilatórias podem ser distinguidas em quatro grupos: desulfovordina, desulforubidina, desulfofuscidina e P582 (Fauque *et al.*, 1990). A presença de classes específicas destas enzimas pode indicar táxons exclusivos de BRS. Postgate *et al.* (1984) propuseram que a enzima desulfovordina era comum às espécies de *Desulfovibrio*, indicando uma característica taxonômica relacionada ao gênero.

A redução dissimilativa do sulfato produz uma grande quantidade de sulfeto livre como principal produto final (Hansen, 1994). Na natureza, os processos metabólicos

dissimilativos do sulfato pelas BRS superam quantitativamente em várias ordens outros processos de redução de enxofre (Bottrell e Newton, 2006).

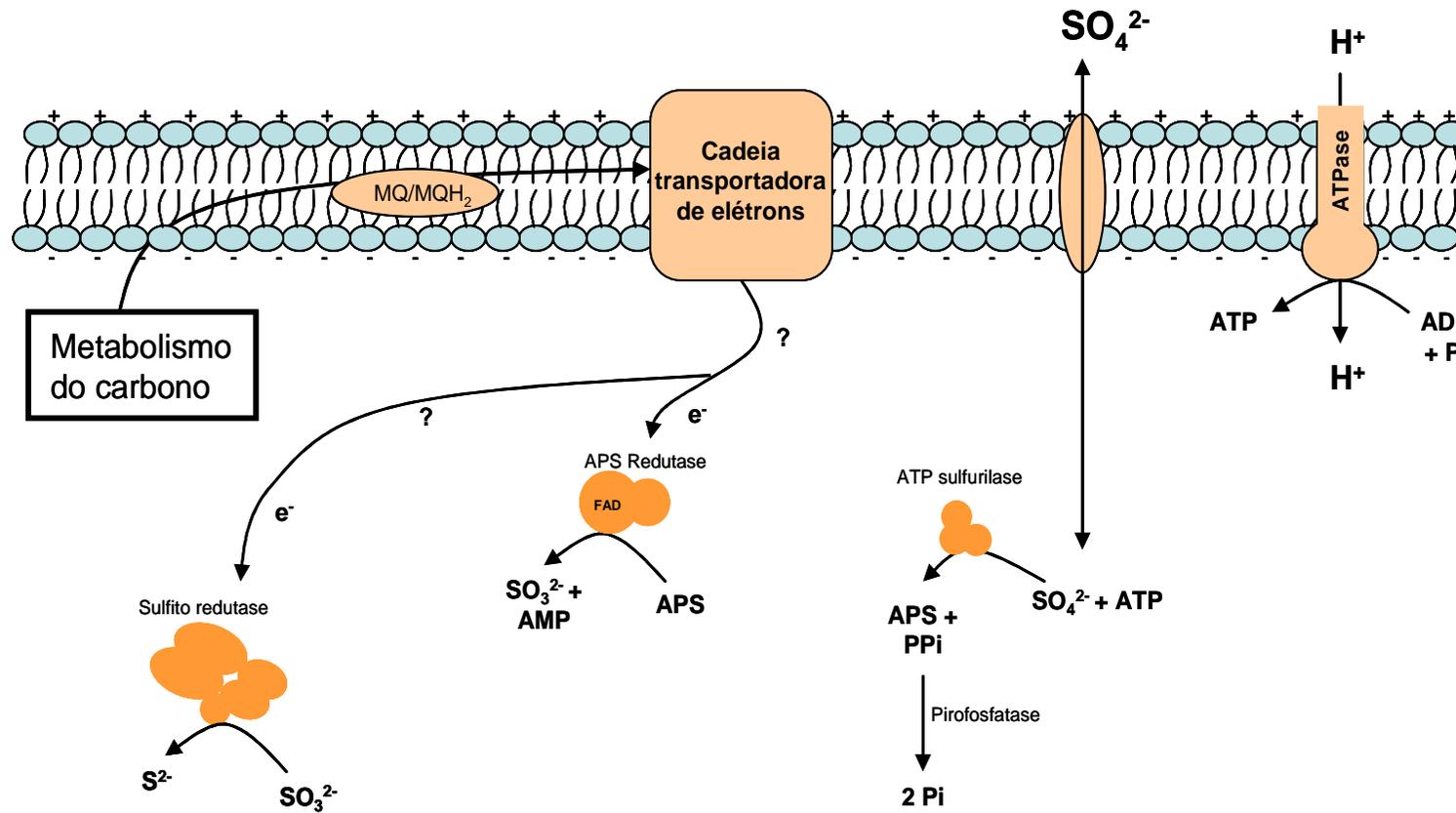


Figura 2.1 - Representação esquemática da transferência de elétrons na redução dissimilativa do sulfato, com compostos carbônicos como fonte de energia e sulfato como aceptor de elétrons. Adaptado a partir de Matias *et al.* (2005).

### 2.2.2 Redução assimilativa do sulfato

Os processos de assimilação de sulfato para a biossíntese de moléculas orgânicas estão representados na figura 2.2. O sulfato é transportado transmembrana para o interior da célula. Este mecanismo é diferente dos processos de redução dissimilativa. O sulfato é transportado unidirecionalmente para o citoplasma a partir de proteínas de membrana localizadas no periplasma bacteriano (Sirko *et al.*, 1990) (figura 2.2, passo 1). O transporte de sulfato intracelular é facilitado por um sistema de transporte tipo ABC, que requer gasto energético, envolvendo a utilização de 1 mol de ATP por mol de sulfato transportado (Kertesz, 2001).

O sulfato citoplasmático é ativado pelos mesmos processos descritos para a redução dissimilativa. O sulfato é fosforilado a adenosina-5'-fosfosulfato (APS) pela ATP sulfúrilase, consumindo energia (ATP) e produzindo pirofosfato (PPi) (Kramer e Cypionka, 1989) (figura 2.2, passo 2).

A APS formada pode ser reduzida a sulfeto por duas vias, dependendo das características bioquímicas do organismo (Gilmore *et al.*, 1989): uma via de redução direta de APS (via APS) (figura 2.2, passo 3b) e uma via de fosforização a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (via PAPS) (figura 2.2, passo 3a). A via para síntese de cisteína a partir da APS pelos procariotas, fungos e organismos fotossintetizante é peculiar a cada grupo, em algumas espécies podem ser empregadas ambas as vias (Kopriva e Koprivova, 2005). Contudo, a via PAPS é comumente utilizada pelos procariotas para a assimilação de sulfato (Bick *et al.*, 2000).

A redução direta de APS a sulfito é realizada a partir da doação de elétrons de um grupo tiolato. Neste mecanismo, um ânion tiolato (glutationina ou tireodoxina) se liga ao grupo sulfonato da APS, para produzir tiosulfonato orgânico e AMP (Rabus *et al.*, 2006). O tiosulfonato orgânico é reduzido a sulfito e posteriormente a sulfeto por uma sulfito redutase (Kopriva e Koprivova, 2005) (figura 2.2, passos 4b e 5).

Na via de formação de PAPS um grupo fosforila é envolvido em uma reação catalizada por uma APS quinase, produzindo PAPS e ADP (figura 2.2, passo 3a). A PAPS é reduzida a sulfito pela PAPS redutase, produzindo adenosina-3'-5'-difosfato (PAP como subproduto) (Sekowska *et al.*, 2000). Subseqüentemente, o sulfito é reduzido a sulfeto por uma sulfito redutase dependente de NADPH (figura 2.2, passos 4a e 5).

O sulfeto gerado é imediatamente incorporado a síntese do aminoácido cisteína pela *O*-acetilserina sulfidrilase, sem perda de sulfeto para o meio extracelular (Shen e Buick 2004) (figura 2.2, passo 6). A cisteína formada será precursora do aminoácido metionina e de alguns cofatores enzimáticos (como coenzima A), de acordo com as características metabólicas do organismo.

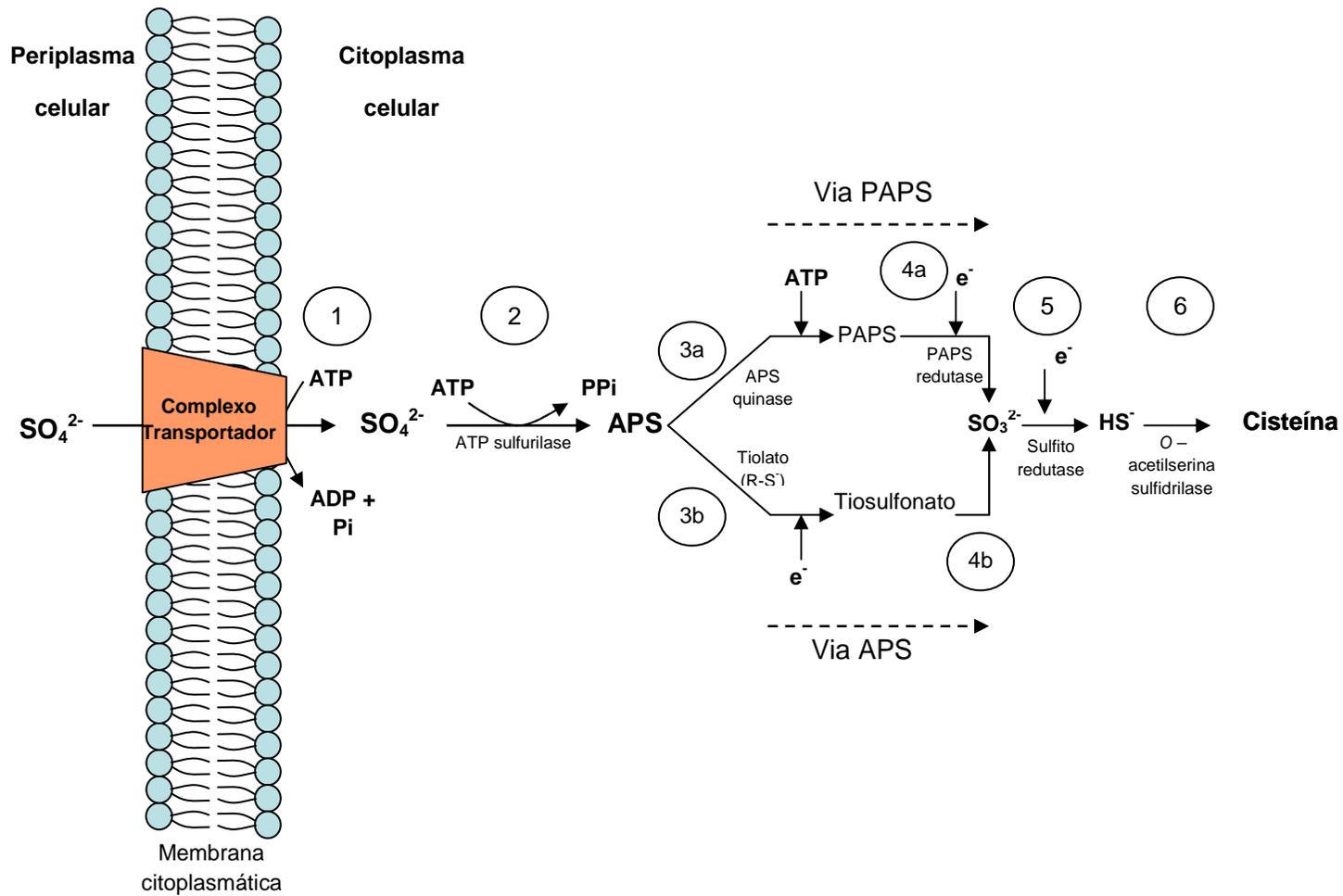


Figura 2.2 - Representação esquemática da redução assimilativa do sulfato até a síntese do aminoácido cisteína. Extraído com adaptações de Shen e Buick (2004).

## **2.3 Doadores de elétrons e conservação de energia na redução dissimilativa do sulfato**

A participação das BRS é indispensável nos processos de alteração dos compostos orgânicos no ciclo geoquímico do carbono (Baumgartner *et al.*, 2006). As BRS são as principais responsáveis pela mineralização da matéria orgânica em sedimentos marinhos, respondendo por aproximadamente 80% da oxidação do carbono (Canfield e Thamdrup, 1996). A oxidação desses compostos estará vinculada a redução do sulfato nos processos bacterianos de respiração anaeróbia. As rotas metabólicas de oxidação dos substratos orgânicos na respiração anaeróbia do sulfato ainda não estão bem entendidas, havendo a descrição de reações intermediárias que podem estar envolvidas no processo de geração de energia celular (Voordouw, 2002).

A necessidade nutricional das bactérias redutoras de sulfato (BRS) é relativamente simples. Primeiramente é necessário, para muitas espécies, um acceptor externo de elétrons (por exemplo, sulfato ou nitrato). Na ausência do acceptor, algumas BRS podem fermentar o substrato como piruvato, formato ou lactato. As fontes de carbono e elétrons utilizados para a redução de um acceptor externo variam de acordo com os gêneros das BRS. Essencialmente, estes doadores consistem em ácidos graxos (acetato, propionato, butirato), ácidos com 3 e 4 carbonos (lactato, piruvato, malato), álcoois (metanol, etanol, propanol), H<sub>2</sub> e, ocasionalmente, açúcares e ácidos de cadeia longa (Gibson, 1990).

As rotas de produção energética nas BRS são determinadas a partir da disponibilidade de aceptores de elétrons (Hao *et al.*, 1996). A oxidação de doadores de elétrons acoplada a um acceptor eletrônico externo oferece significativas vantagens energéticas sobre o metabolismo fermentativo (Rabus *et al.*, 2006). Com aceptores externos, os doadores de elétrons são oxidados em várias reações metabólicas, havendo maior ganho energético por mol de molécula oxidada. Além disso, a redução do acceptor externo estará associada a uma cadeia transportadora elétrons e a síntese de ATP quimiosmótico (Pohorelic *et al.*, 2002). No caso das BRS, uma série de enzimas que catalisam reações redox, de proteínas carreadoras de elétrons e de complexos menaquinonas envolvidos nos processos de transporte de elétrons celular têm sido estudadas em detalhes (Matias *et al.*, 2005), contudo, uma via padrão para o transporte de elétrons em BRS ainda não foi proposta.

BRS capazes de utilizar hidrogênio molecular ( $H_2$ ) como único substrato para a redução de sulfato são classificadas como quimioautotróficas (Madigan *et al.*, 2004). O hidrogênio é um substrato inorgânico efetivo para redução de sulfato porque, em condições padrão, fornece elétrons para o metabolismo celular ( $2 H^+/H_2$ ,  $E^{\circ}_0 = -0,414V$ ) (Badziong e Thauer, 1978). Muitas espécies de vários gêneros de BRS utilizam o  $H_2$  como único doador de elétrons na redução de sulfato a sulfeto, com acetato e  $CO_2$  como fontes de carbono (Badziong e Thauer, 1978). Quando o hidrogênio é o único doador de elétrons, quatro moles de hidrogênio são necessários para reduzir um mol de sulfato, havendo produção de 0,7 mol de ATP (Badziong e Thauer, 1978), de acordo com a equação abaixo:



Contudo, o hidrogênio também pode ser formado como produto metabólico durante o crescimento fermentativo na ausência de sulfato (Postgate, 1984). Além disso, no metabolismo de alguns compostos orgânicos (como lactato), o hidrogênio é produzido e consumido nos processos de redução dissimilativa do sulfato (Voordouw, 2002). Este processo pode ser essencial para a geração de energia necessária para o crescimento celular (Odom e Peck, 1981).

Uma rota para o metabolismo do hidrogênio foi proposta para explicar a conservação de energia em células de *Desulfovibrio* em sistema lactato/sulfato (Odom e Peck, 1981). Nessa rota, o hidrogênio produzido pela oxidação do lactato é utilizado em uma série de reações de síntese de energia e elétrons. Dois grupos enzimáticos são fundamentais nesses processos, as hidrogenases e as proteínas de membrana transportadoras de elétrons (Matias *et al.*, 2005). As hidrogenases foram isoladas de uma série de gêneros de BRS (Brugna *et al.*, 1999; Kremer e Hansen, 1988; Odom e Peck, 1981), e são responsáveis por catalisar a oxidação reversível de hidrogênio molecular, como na equação seguinte:



Essas enzimas podem estar localizadas no citoplasma, no periplasma ou associadas à membrana celular, com funções fisiológicas distintas (Wu e Mandrand, 1993). As proteínas de membrana transportadoras de elétrons são formadas por uma cadeia complexa com menaquinona, citocromos e proteínas redox transmembranas (Pereira *et*

*al.*, 2008; Matias *et al.*, 2005; Haveman *et al.*, 2004). Esses complexos protéicos são responsáveis pelo transporte de elétrons transmembrana do periplasma ao citoplasma celular, além disso, sua composição e estrutura variam entre as espécies de BRS (Matias *et al.*, 2005).

O modelo proposto para utilização de hidrogênio por *Desulfovibrio* nos processos dissimilatórios do sulfato se inicia com a oxidação do lactato, gerando prótons e elétrons que são transferidos a uma hidrogenase citoplasmática (figura 2.3) (Odom e Peck, 1981). Essas enzimas, posteriormente, produzem H<sub>2</sub> a partir desses prótons e elétrons. O H<sub>2</sub> citoplasmático se difunde ao periplasma através da membrana, onde é reoxidado pelas hidrogenases periplasmáticas. Os elétrons produzidos são transferidos para o complexo de proteínas de membrana, responsáveis pelo seu transporte ao citoplasma, onde ocorrerá a redução do sulfato a sulfeto. Estes elétrons podem ser transferidos para as enzimas APS redutase ou sulfito redutase ou podem reduzir carreadores de elétrons como flavodoxinas (Voordouw, 1994). Os prótons gerados pelas hidrogenases periplasmáticas produzem um gradiente iônico para a síntese quimiosmótica de ATP (transporte vetorial de prótons) (Rabbus *et al.*, 2006). O fluxo de prótons via ATPase para o citoplasma produz uma força próton motiva capaz de gerar energia e conservá-la na formação de ATP a partir do ADP (Voordouw, 2002).

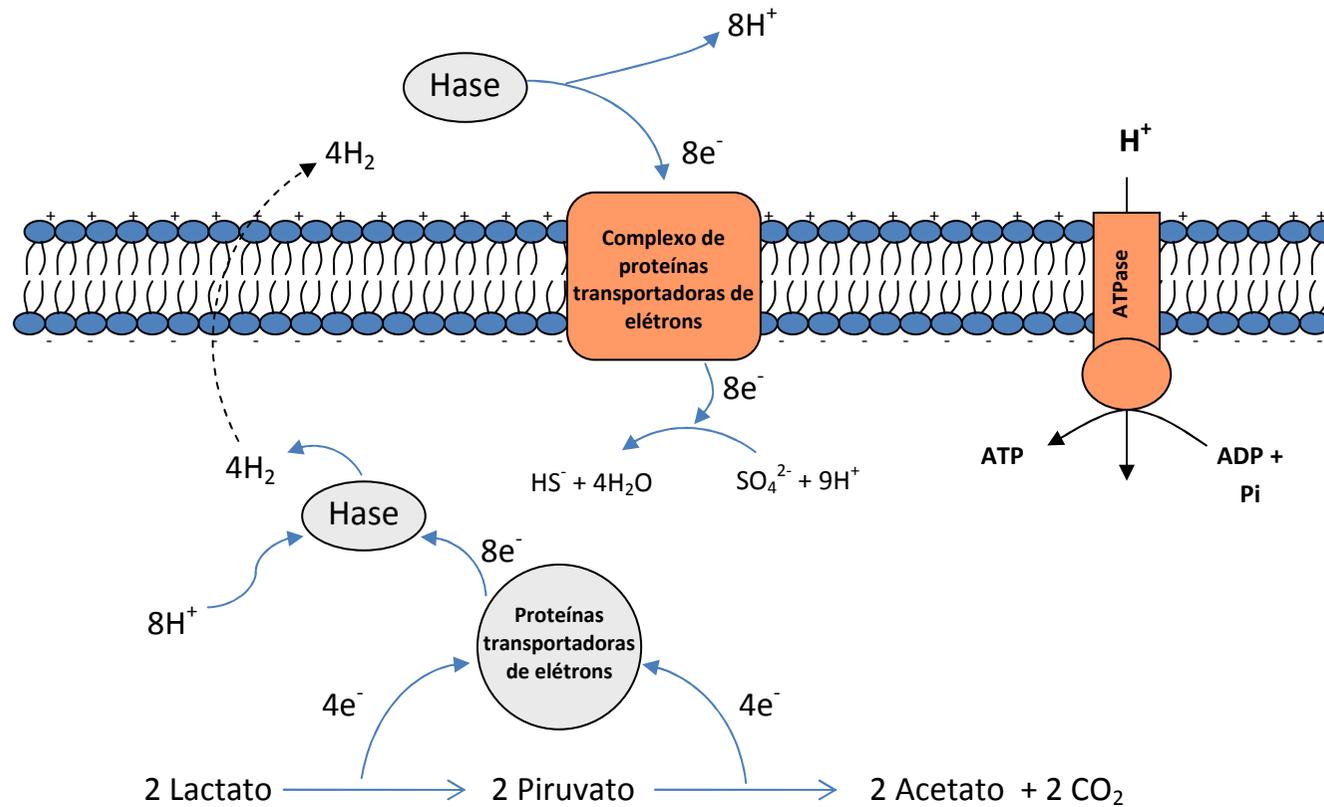


Figura 2.3 - Rota metabólica do hidrogênio proposta por Odum e Peck (1981) para explicar a conservação de energia durante o crescimento de *Desulfovibrio* em sistema lactato/sulfato. As hidrogenases (Hase) citoplasmáticas e periplasmáticas estão indicadas na figura.

Todavia, dentre as BRS predominam as espécies quimioheterotróficas, capazes de degradar substratos orgânicos para redução do sulfato (Gibson, 1990). Estes microrganismos, ao oxidar compostos orgânicos e reduzir sulfato, podem produzir acetato como intermediário nas reações metabólicas (figura 2.4). O acetato é um composto chave nos processos dissimilativos do sulfato em BRS. As BRS podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com suas características fisiológicas de consumo ou produção de acetato: i) bactérias que oxidam completamente acetato a CO<sub>2</sub> e, ii) bactérias que oxidam o substrato orgânico incompletamente a acetato. Ao primeiro grupo pertencem, dentre outras, bactérias dos gêneros *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Archaeoglobus* e ao segundo, *Desulfobacterium*, *Desulfovibrio*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus*, *Desulfotomaculum* (Hao, 1996). Compostos orgânicos com 1 carbono, como formato e metanol, e alguns com 2 carbonos, como glicina, podem ser oxidados completamente por BRS sem a formação de acetato como intermediário (Balk *et al.*, 2007).

A oxidação completa de acetato a CO<sub>2</sub> em condições anaeróbias envolve as seqüências de reações do ciclo do ácido cítrico (figura 2.4) (Rabbus *et al.*, 2006). As enzimas envolvidas nesse ciclo em BRS diferem em alguns aspectos das enzimas responsáveis pela oxidação do acetato em mitocôndrias e em bactérias aeróbias (Rabbus *et al.*, 2006). No ciclo do ácido cítrico, uma seqüência de reações do citrato a succinil-CoA promovem a oxidação do acetato a CO<sub>2</sub> e a produção de 1 ATP por mol de acetato oxidado. O ganho de energia livre na redução do sulfato com acetato está exibido na equação abaixo:



$$\Delta G^{\circ'} = -47,3 \text{ Kj/mol}$$

A baixa produção energética na oxidação de acetato via ciclo do ácido cítrico é insuficiente para suportar o crescimento celular a partir da redução do sulfato. A produção de 1 ATP pela fosforilação ao nível do substrato contrasta com a necessidade de 2 ATPs para ativação do sulfato. Assim, para suprir a redução do sulfato e o crescimento celular, mais que 1 ATP tem que ser sintetizado por quimiosmose via ATPase, a partir de um transporte vetorial de prótons ao longo da membrana (Thauer *et al.*, 1988).

Na oxidação incompleta de substratos orgânicos, o acetato é formado como produto metabólico final das reações de oxidação de acetil-CoA (Voordouw, 2002). Pereira *et al.* (2008) observaram que a síntese de 1 mol de acetato promove a fosforilação de 1 mol de ADP a ATP (figura 2.4). Os intermediários metabólicos produzidos até a formação de acetil-CoA estarão relacionados com a origem do composto orgânico oxidado (Rabbus *et al.*, 2006).

O lactato é um substrato clássico para o cultivo de bactérias redutoras de sulfato (Postgate *et al.*, 1984), podendo ser utilizado por várias espécies e, metabolicamente, oxidado completa ou incompletamente por espécies de um mesmo gênero (Hansen, 1994). Porém, várias espécies do gênero *Desulfobacter* (Widdel e Pfening, 1984), algumas espécies do gênero *Desulfobacterium* e *Desulfonema* (Widdell *et al.*, 1983) e *Desulfotomaculum* (Widdel e Pfening, 1984) não utilizam lactato como fonte de elétrons no metabolismo.

A oxidação incompleta do lactato a acetato em espécies de *Desulfovibrio* indica que a oxidação de substratos orgânicos em BRS está associada com a conservação de energia quimiosmótica, em adição à fosforilação ao nível do substrato (Pankhania *et al.*, 1988). O saldo energético resultante da fosforilação ao nível do substrato via oxidação do lactato e redução de sulfato de *Desulfovibrio* é zero (Pohorelic *et al.*, 2002). Duas moléculas de lactato oxidadas por molécula de sulfato reduzido produzem dois ATPs durante a liberação de acetato, via acetato quinase; estes dois ATPs são consumidos para a ativação do sulfato, sendo 1 ATP para a reação da ATPsulfurilase e 1 ATP para regeneração de ADP de AMP (reação da adenilato quinase) formado durante a redução do APS (Voordouw, 2002). Dessa forma, a geração de energia para o crescimento celular de BRS pode estar relacionada com a rota metabólica de produção e oxidação de hidrogênio (Pereira *et al.*, 2008; Voordouw, 2002; Pohorelic *et al.*, 2002; Odom e Peck, 1981; Badziong e Thauer, 1978).

O etanol é outro doador de elétrons e fonte de carbono comumente utilizado na redução de sulfato por BRS. O etanol pode ser oxidado completamente ou incompletamente pelas BRS. Segundo Kremer *et al.* (1988), a degradação de etanol ocorre via sua oxidação a acetaldeído por uma álcool desidrogenase e posterior oxidação a acetato, conforme esquematizado na figura 2.4. Em *Desulfovibrio vulgaris*, a alteração na atividade de hidrogenases periplasmáticas ocasiona inibição da enzima

alcool desidrogenase, diminuindo o crescimento celular (Haveman *et al.* 2004). Assim como na oxidação do lactato, a degradação do etanol também pode estar relacionada com o metabolismo do hidrogênio (Pereira *et al.*, 2008).

Uma série de doadores de elétrons pode ser utilizada nos processos de remoção biológica de sulfato (tabela 2.1) (Liamleam e Annachrate, 2007). Substratos orgânicos como acetato, lactato, propionato, piruvato, butirato e alguns alcoóis como metanol e etanol são aplicados no cultivo de espécies de BRS e podem ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes contaminados com sulfato (Muyzer e Stam, 2008; Kaksonem *et al.*, 2006; Nagpal *et al.*, 2000; Hao, 1996). No ambiente natural, esses compostos são produtos do metabolismo fermentativo de carboidratos, proteínas e outros constituintes da matéria orgânica por bactérias (Hao, 1996). Com isso, substratos orgânicos complexos como celulose, lodo de águas residuárias, extratos vegetais, excretas animais e outros resíduos agrícolas podem ser utilizados como fonte de carbono e energia para consórcios bacterianos com BRS para o tratamento de ambientes ricos em sulfato (Suzuki *et al.*, 2007).

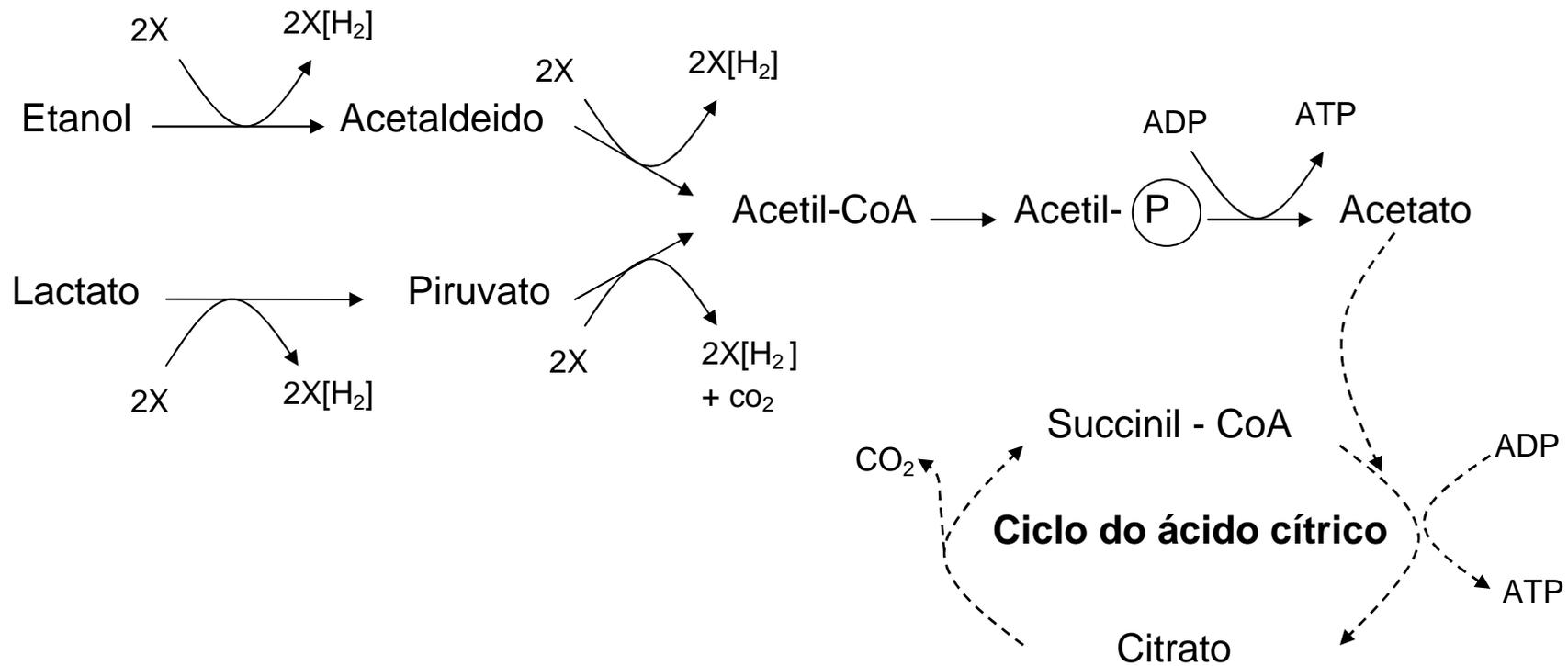


Figura 2.4 - Desenho esquemático das reações de oxidação de etanol e lactato em BRS. O “X” pode ser um transportador de elétrons ou carreador de hidrogênio. As reações indicadas pelas linhas contínuas propõem a rota de oxidação incompleta do substrato orgânico a acetato. As reações indicadas pelas linhas pontilhadas indicam a oxidação completa de acetato a  $CO_2$  via ciclo do ácido cítrico. Adaptado a partir de Rabbus *et al.* (2006).

Tabela 2.1 - Energia livre de reações sulfidogênicas com diferentes doadores de elétrons. Adaptado segundo Thauer *et al.* (1977) e Liamleam e Annachhatre (2007).

Equação nº	Substrato	Produto	$\Delta G^{\circ}$ (Kj/reação)
<i>Ácidos carboxílicos</i>			
1	4Formato + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HS <sup>-</sup> + 4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-146.7
2	Acetato + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HS <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-47.3
3	Propionato + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + H <sub>2</sub>	HS <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + Acetato + H <sub>2</sub> O	-75.8
4	Propionato + 2SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + H <sub>2</sub>	2HS <sup>-</sup> + 3HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	-122.7
5	Butirato + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + H <sub>2</sub>	3HS <sup>-</sup> + 4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 5H <sub>2</sub> O	-198.4
6	Butirato + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2H <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	HS <sup>-</sup> + 2Acetato	-103.8
<i>Álcool</i>			
7	4Metanol + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3HS <sup>-</sup> + 4HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	-361.7
8	2Metanol + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HS <sup>-</sup> + 2 Formato + 2H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	-108.3
9	2Etanol + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2Acetato + HS <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	-132.7
<i>Açúcares</i>			
10	Glicose + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HS <sup>-</sup> + 2Acetato + 3HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3H <sup>+</sup>	-358.2
11	Glicose + 3SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3HS <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3H <sup>+</sup>	-452.5
<i>Ácidos insaturados</i>			
12	2Lactato + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HS <sup>-</sup> + 2Acetato + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	-159.6

A diversidade de doadores de elétrons disponível ao metabolismo das BRS proporciona diferentes rotas metabólicas de oxidação e diferentes estratégias podem ser utilizadas pelos microrganismos para produção de energia (Pereira *et al.*, 2008). A compreensão destas rotas metabólicas de remoção de sulfato pode ser uma ferramenta essencial para aperfeiçoar os processos de biorremediação com BRS, porque pode-se disponibilizar um doador de elétron capaz de reduzir e remover o sulfato minimizando a presença de outros poluentes no efluente e reduzir o custo do doador de elétrons por mol de sulfato reduzido a sulfeto (van Houten *et al.*, 2006; Hamilton, 1998).

## **2.4 Aspectos biológicos e ecológicos de BRS**

O envolvimento de microrganismos nos processos biogeoquímicos no ambiente natural é primordial para a manutenção das formas vivas como as conhecemos. Em ambientes anaeróbios, as bactérias redutoras de sulfato são fundamentais nos processos relacionados aos ciclos do enxofre e do carbono (Muyzer e Stams, 2008). Além da variedade de substratos orgânicos utilizados por esse grupo na dissimilação do sulfato, ele se destaca quanto à variedade de ambientes em que podem ser encontrados. BRS foram detectadas e isoladas de ambientes com temperaturas extremas como fontes hidrotermais e domo de lama vulcânica (Elsgaard *et al.*, 1994), em locais com alta pressão como fendas oceânicas, jazidas de petróleo e sedimentos marinhos (Jeanthon *et al.*, 2002), em ambientes ácidos como drenagem ácida de minas (Johnson, 1995) ou em locais extremamente alcalinos, como em lagos de soda (Pikuta *et al.*, 1997). Todavia, a grande maioria do grupo habita regiões bentônicas de lagos, rios e mares, áreas alagadas e pantanosas, além de plantas de tratamento de águas residuárias (Gibson, 1990). A capacidade de habitar nichos ecológicos específicos em ambientes peculiares exhibe a complexidade biológica do grupo e estimula a busca de sua aplicação científica em processos biotecnológicos de remediação.

Microrganismos desempenham uma função ecológica primordial nos processos de ciclagem e mineralização de compostos na natureza. As modificações das espécies químicas do enxofre no ambiente estão vinculadas com a participação de microrganismos e plantas (Madigan *et al.*, 2004). Contudo, as reações de assimilação-dissimilação do enxofre inorgânico em ambientes sedimentares anaeróbios são de responsabilidade prioritária das bactérias redutoras de sulfato (Fauque *et al.*, 1990).

Como descrito anteriormente, os processos biológicos de assimilação promovem a conversão do enxofre inorgânico na estrutura celular bacteriana; já a dissimilação do sulfato propicia a síntese de energia celular via produção de sulfeto. O sinergismo entre os ciclos do enxofre e do carbono disponibiliza recursos essenciais para o metabolismo celular de BRS.

Os mecanismos de redução bacteriana de sulfato estão relacionados diretamente com a oxidação de matéria orgânica. Em ambientes anaeróbios, a mineralização de carbono orgânico envolve uma série complexa de degradação e requer a interação de diferentes grupos de microrganismos (Gibson, 1990). Essas interações durante a metabolização dos substratos orgânicos na comunidade bacteriana de sedimentos anaeróbios se estabelecem basicamente entre BRS, bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas (Schink, 1997). O sucesso das espécies de BRS nessas comunidades estará relacionado com a origem e com a concentração de substrato orgânico e de íons sulfato presentes no meio.

Os caminhos de mineralização da matéria orgânica no ciclo do carbono em ambientes anaeróbios estarão relacionados com os intermediários sintetizados pelas espécies bacterianas que compõem a cadeia alimentar (figura 2.5). Macromoléculas, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos são hidrolisados por microrganismos fermentadores (bactérias e fungos). Na seqüência, os monômeros – aminoácidos, açúcares e ácidos graxos – são fermentados por bactérias fermentativas que produzem variados substratos de baixo peso molecular como acetato, propionato, butirato, lactato e hidrogênio. Na presença de sulfato, bactérias redutoras de sulfato consomem, prioritariamente, os produtos da fermentação (figura 2.5a). Contudo, na ausência de sulfato, o hidrogênio e o acetato – sendo o acetato produto direto da fermentação ou indireto da acetogênese – são consumidos por bactérias metanogênicas (figura 2.5b). A compreensão das relações ecológicas de competição e mutualismo no consórcio microbiano favorece o cultivo “in vitro” e a utilização de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato em processos biotecnológicos (Stams *et al.*, 2006).

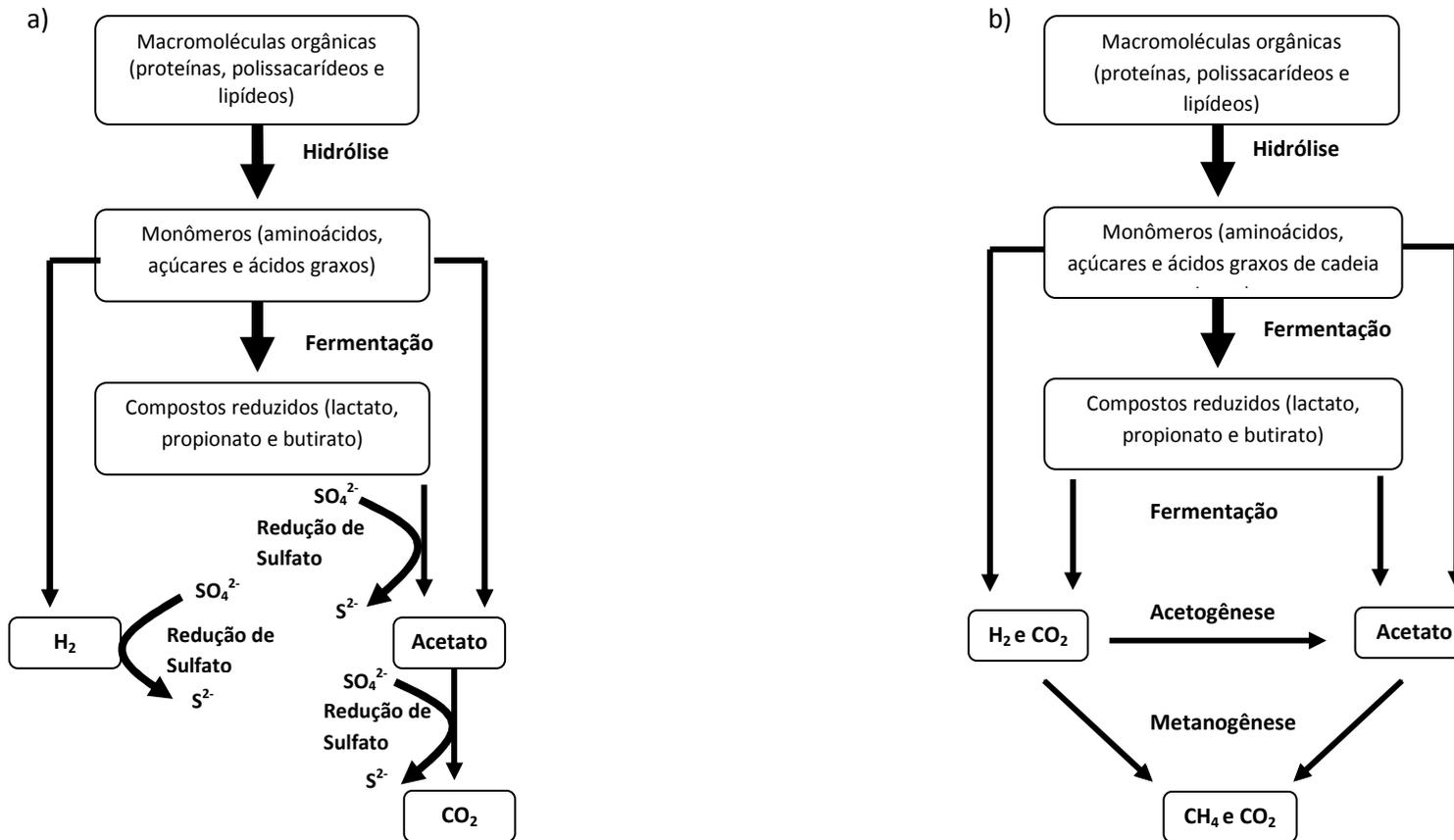


Figura 2.5 - Vias de degradação microbiana de matéria orgânica em ambientes anóxicos na presença (a) e na ausência de sulfato (b). Extraído e adaptado a partir de Myers e Stams (2008).

Em contraste com as BRS, bactérias metanogênicas utilizam um número restrito de substratos metabólicos (Schink, 1997). Espécies de BRS podem competir com metanogênicas por fontes de carbono e elétrons como acetato e hidrogênio, sendo a concentração de sulfato o fator determinante nessa competição (Oremland e Polcin, 1982). Em teoria, em condições onde prevalece alta concentração de doadores de elétrons de baixo peso molecular e íons sulfato, o desenvolvimento de grupos de BRS é favorecido. Já em condições limitantes de sulfato, há predomínio de bactérias metanogênicas (Lens *et al.*, 1998).

A intensidade das relações mutualísticas entre as espécies de uma comunidade microbiana é primordial para a manutenção da estrutura e diversidade funcional do ecossistema (McInerney *et al.*, 2008). Interações interespecíficas entre células procariontas têm sido estudadas intensamente, principalmente com respeito à cooperação sintrófica envolvendo bactérias metanogênicas e redutoras de sulfato (Scholten *et al.*, 2007; Zellner *et al.*, 2006). Sintrofismo é um caso especial de cooperação simbiótica entre bactérias que produzem diferentes tipos metabólicos onde o produto do metabolismo de uma é utilizado como substrato energético para outra (Schink, 1997). Por exemplo, a metanogênica *Methanosarcina barkeri* pode crescer sintroficamente com a BRS *Desulfovibrio vulgaris* quando lactato está presente como único substrato orgânico (Scholten *et al.*, 2007). A degradação do lactato na respiração anaeróbia do sulfato por *Desulfovibrio vulgaris* produz acetato que será fonte de elétrons e carbono no metabolismo de *Methanosarcina barkeri*. Porém, em consórcios bacterianos naturais, a variedade dos substratos orgânicos disponíveis e a diversidade de espécies presentes tornam complexas as interações entre as espécies. A compreensão dos aspectos que favorecem o sintrofismo em consórcios microbianos é chave para o aperfeiçoamento dos processos de biorremediação e de tratamento de efluentes (Stams *et al.*, 2006; Zellner *et al.*, 2006)

Além dos aspectos bióticos, as características abióticas do ecossistema são fatores decisivos para o crescimento e atividade dos microrganismos (Hao *et al.*, 1996). Bactérias redutoras de sulfato crescem melhor em condições moderadamente alcalinas (pH 7,0 – 7,8), mesófilas (28 – 38° C) e em ambientes redutores cujo os valores de Eh se encontrem na faixa de -150 a 200 mV (Madigan *et al.*, 2004). Contudo, a redução dissimilativa de sulfato por BRS foi observada em ambientes ácidos de drenagens ácidas de minas (Johnson *et al.*, 2002; Kussel *et al.*, 2001; Johnson, 1995), em ambientes alcalinos (Kjeldsen *et al.*, 2007; Pikuta *et al.*, 1997; Fry *et al.*, 1997), termófilos (Domingues *et al.*,

2006; Jeanthon *et al.*, 2002; Elsgaard *et al.*, 1994) e psicrófilos (Vandieken *et al.*, 2006; Knoblauch *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 1998).

Um fator ambiental determinante no desenvolvimento de BRS é a sua capacidade de sobreviver em condições aeróbias. BRS são tradicionalmente classificadas como heterótrofos anaeróbios e como organismos incapazes de tolerar oxigênio molecular, sendo assim restritos a ambientes anóxicos (Hao *et al.*, 1996; Gibson, 1990). Porém, diversos estudos têm relatado a capacidade de BRS sobreviver em condições aeróbias e metabolizar sulfato na presença de oxigênio (Marschall *et al.*, 1993). Algumas espécies de BRS possuem enzimas capazes de evitar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio como radicais superóxidos e peróxidos (Pereira *et al.*, 2008; Santana, 2008; Dolla *et al.*, 2006) ou podem criar micronichos anóxicos em zonas óxicas (Kjeldsen *et al.* 2004; Krekeler *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 1998).

## **2.5 Biotecnologia de tratamento de efluentes com BRS**

A utilização e o aprimoramento de biotecnologias anaeróbias no tratamento de efluentes domésticos e industriais vêm despertando grande interesse de pesquisadores e empresários. Comparado aos métodos convencionais de tratamento aeróbio, processos anaeróbios apresentam diversos benefícios ambientais e econômicos (Lens *et al.*, 1995). O tratamento de efluentes ricos em matéria orgânica fundamentado em técnicas anaeróbias se destaca pela produção de biogás, por gerar baixo volume de lodo no interior das plantas de tratamento, por requerer uma pequena área para implantação e poder ser aplicado em diversos locais, por apresentar baixo custo para a construção e manutenção dos reatores e por ser utilizado com outros métodos de pós-tratamento para recuperação de compostos de interesse (Lens *et al.*, 1998).

Tratamentos biológicos que utilizam bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem ser alternativas eficazes e economicamente viáveis para a remoção de sulfato, precipitação de metais e alcalinização de efluentes industriais (Kaksonen *et al.*, 2003). As características fisiológicas deste grupo de microrganismos permitem uma efetiva remoção de poluentes dissolvidos nos efluentes, principalmente de íons sulfato. As BRS se destacam pelo fato de crescerem em ampla faixa de pH, entre 5,0 e 9,0; serem predominantemente mesófilas (a temperatura ideal para o crescimento está entre 20° C e 40° C); utilizarem substratos

orgânicos simples como fontes de carbono (por exemplo o acetato, o etanol, o propionato e o lactato); e apesar de serem anaeróbias, apresentarem alguma tolerância ao oxigênio (Lens *et al.*, 1998; Cypionka *et al.*, 1995).

Porém, a utilização de biorreatores anaeróbios com BRS pode não ser uma técnica eficaz para o tratamento de águas residuárias. A produção de sulfeto por BRS em plantas de tratamento anaeróbio de efluentes residenciais causa alguns problemas como toxicidade, corrosão, odor, aumento da DQO do efluente e redução na qualidade e na quantidade de biogás (Lens *et al.*, 1998). Segundo Nagpal *et al.* (2000), os seguintes fatores devem ser considerados para a criação de modelos de reatores com BRS: utilização de substratos carbônicos e de sulfato e produção de biomassa; síntese de sulfeto, de substratos carbônicos secundários ou de dióxido de carbono; dissociação/associação de espécies dissolvidas; transferência de massa gás/liquido de compostos voláteis; precipitação de metais (quando presentes no sistema) como sulfetos metálicos; e características hidrodinâmicas adequadas ao tipo de reator que será utilizado.

A eficiência do tratamento biológico de efluentes industriais com elevada concentração de sulfato ainda é influenciada diretamente pelo volume de biomassa e pela estrutura da comunidade de BRS no interior do biorreator. Efluentes industriais normalmente apresentam baixa concentração de substratos orgânicos, havendo necessidade de adicionar matéria orgânica ao efluente para beneficiar os processos de tratamento biológicos heterotróficos. A seleção de um substrato orgânico adequado para o cultivo de BRS tem dificultado a implantação desta biotecnologia em escala industrial. Os grupos de BRS são formados principalmente por microrganismos que utilizam moléculas orgânicas de baixo peso molecular e hidrogênio (Liamlean e Annachhatre, 2007). Entretanto, o cultivo de consórcios bacterianos com BRS utilizando substratos orgânicos mais complexos como celulose, lodo de esgotos domésticos e excretas animais tem sido também estudado (Neculita e Zagury, 2008).

Estudos sobre a aplicabilidade de reatores anaeróbios na remoção de sulfato e metais em efluentes industriais ainda são poucos e a tecnologia esta em desenvolvimento. Maree *et al.* (2004) descreveram um processo de tratamento biológico com BRS para remoção de sulfato em um sistema com reatores de mistura completa, com concentração inicial de  $12,4 \text{ g de SO}_4^{2-} \text{ por l}^{-1}\text{d}^{-1}$  no efluente. A concentração de sulfato posterior ao tratamento estava abaixo de  $200 \text{ mg l}^{-1}$ . Kaksonen *et al.* (2006) utilizaram um reator de leito fluidizado

com BRS para o tratamento de efluente ácido rico em metais com pH inicial 2,5-3,0 e com concentração de 2290 mg de sulfato por  $l^{-1}d^{-1}$ , 600 mg de Zn por  $l^{-1}d^{-1}$  e 300 mg de Fe por  $l^{-1}d^{-1}$ , em um tempo de retenção hidráulica de 6,5 h. Após o tratamento, o pH do efluente apresentava valores de pH superiores a 7,5 e a concentração dos metais foi inferior a  $0,1 mg l^{-1}$ .

Informações holísticas sobre os processos de redução de sulfato por BRS devem ser produzidas previamente como base para aplicação dessa biotecnologia em escala industrial. Geralmente, esse conhecimento é gerado a partir da utilização prévia de experimentos em sistema batelada em escala laboratorial. De acordo com as características bioquímicas das comunidades de BRS estudadas, examinaremos a viabilidade em empregar essa técnica no tratamento de efluentes contaminados com sulfato e com metais pesados.

### 3 OBJETIVOS

No presente trabalho foram testados métodos para o enriquecimento e o cultivo de amostras naturais de culturas de bactérias redutoras de sulfato (BRS). A seleção de um meio de cultivo apropriado para o desenvolvimento de grupos de BRS e a interferência dos doadores de elétrons no metabolismo dissimilativo do sulfato foram estudados como parâmetros fundamentais para quantificar o crescimento bacteriano e a remoção de sulfato por comunidades de BRS. A partir do desenvolvimento de culturas de BRS adaptadas às condições avaliadas, a tolerância ao pH e a variadas concentrações de metais foram analisadas. A compreensão das condições abióticas na atividade metabólica das BRS é primordial para a aplicação desse grupo nos processos biotecnológicos de tratamento biológico de efluentes industriais. Para alcançar esses objetivos gerais, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Enriquecer e isolar culturas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) provenientes de sedimentos ou corpos d'água naturais contaminados com sulfato e/ou com metais em meio de cultura líquido seletivo Postgate C “modificado”.
- Avaliar a capacidade das culturas de BRS em crescer e metabolizar sulfato em valores de pH 7,0 e 5,5 e na presença de diferentes substratos orgânicos (lactato ou etanol) nos meios de cultivo Postgate C “modificado”, Postgate C, Postgate B e meio Mínimo.
- Avaliar a possibilidade de emprego deste tipo de microrganismo em tratamento de efluentes ácidos.
- Selecionar as culturas de BRS que apresentem os melhores resultados de crescimento e que sejam capazes de remover sulfato nas condições e nos meios de cultivo avaliados.
- Selecionar um meio de cultivo líquido onde haja maior eficiência de remoção biológica de sulfato.
- Selecionar uma razão DQO/sulfato ótima para o crescimento e remoção de sulfato pelas culturas de BRS e definir parâmetros ideais de cultivo.
- Analisar as características bioquímicas das culturas de BRS cultivadas em meio de cultivo contendo lactato ou etanol, a partir da produção de ácidos orgânicos intermediários do metabolismo desses substratos.

- Avaliar a remoção biológica de sulfato em meio de cultivo contendo variadas concentrações dos metais níquel, cobre e manganês em diferentes pH e utilizando diferentes substratos orgânicos.
- Identificar microrganismos presentes nas culturas usando técnicas de caracterização morfológicas e moleculares.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de coleta

As culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) utilizadas nos experimentos foram coletadas nos seguintes ambientes: (i) sedimentos de uma lagoa urbana, (ii) de reatores de manta de lodo de fluxo ascendente (UASB) e (iii) sedimentos de uma área de drenagem ácida. Todos os locais de coleta apresentavam condições ambientais propícias para o desenvolvimento deste grupo de microrganismos. As áreas de coleta de amostras de BRS estão descritas a seguir.

i. Sedimento da lagoa do Gambá, Ouro Preto, MG. A Lagoa do Gambá está localizada no centro de um loteamento na cidade de Ouro Preto, em Minas Gerais, a  $20^{\circ}43'51.11''$  de latitude S e  $43^{\circ}30'0.63''$  de longitude O (figura 4.6). Esta lagoa recebe grande quantidade de esgoto residencial e do escoamento superficial de áreas periféricas. A borda da lagoa apresenta cobertura vegetal marginal de espécies botânicas exóticas. As amostras foram coletadas do sedimento, em dois pontos diferentes no interior da lagoa, denominados de LG01 (de uma margem) e LG02 (margem oposta a LG01). A distância entre os locais de coleta foi de aproximadamente 200 m.



Figura 4.6 - Vista da lagoa do Gambá, cidade de Ouro Preto – MG.

ii. Lodo anaeróbio proveniente de dois reatores UASB utilizados no tratamento de esgoto doméstico e efluente industrial. Uma amostra foi extraída do lodo de um reator UASB localizado na estação de tratamento de esgoto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), responsável pelo tratamento do esgoto doméstico da cidade de Belo Horizonte, denominada UASB01 (figura 4.7a). Uma segunda amostra foi coletada de um reator UASB em escala de laboratório, localizado no laboratório de Tratamento de Efluentes do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da UFOP, tratando efluente de uma indústria moveleira da cidade de Ubá - MG. Esta amostra foi denominada UASB02 (figura 4.7b).

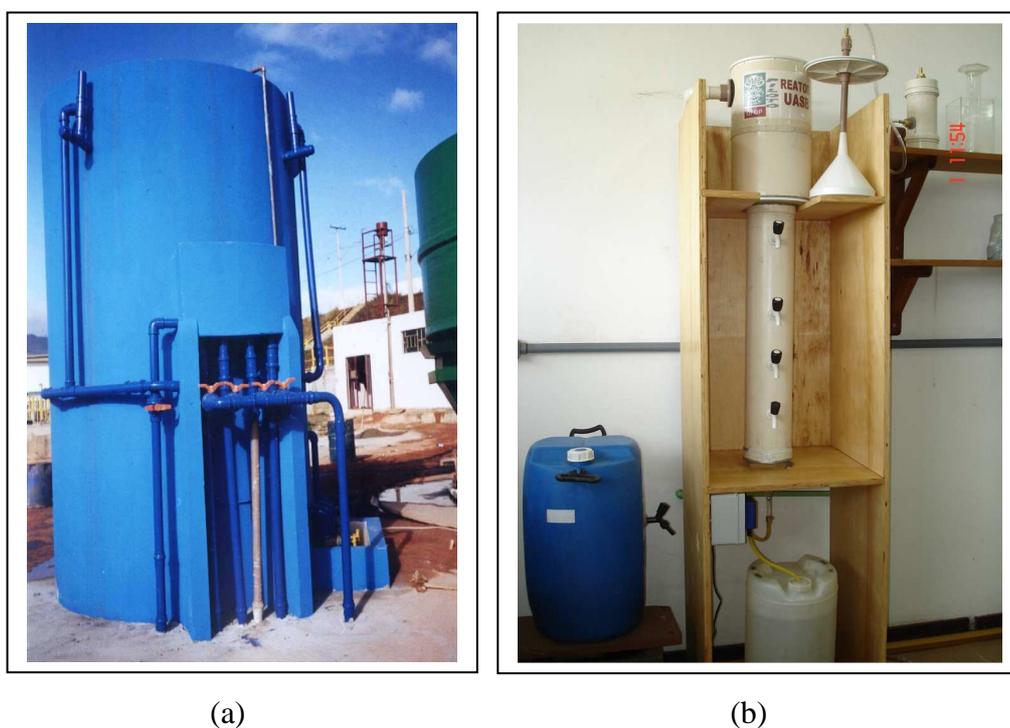


Figura 4.7 - Registro fotográfico dos reatores anaeróbios onde foram coletadas as amostras denominadas UASB. (a) Reator UASB situado na estação de tratamento de esgotos do rio Arrudas (ETE Arrudas), na cidade de Belo Horizonte; (b) reator UASB experimental da UFOP.

iii. Região de drenagem ácida de mina (DAM). A drenagem ácida está localizada em uma mina de pirita desativada no bairro Padre Faria, no município de Ouro Preto – MG, a  $20^{\circ}23'48.37''$  de latitude S e  $43^{\circ}29'25.88''$  de longitude O (figura 4.8). A drenagem ocorre em períodos de chuvas, época em que foi realizada a coleta das amostras. A água presente

nesta DAM apresentava pH próximo a 4,0. As amostras foram extraídas da água, denominada de DAM 01, e do sedimento, denominada DAM 02.



Figura 4.8 - Vista de um afloramento de pirita em uma região de drenagem ácida de mina na cidade de Ouro Preto – MG.

Em cada ponto de coleta, uma amostra foi retirada e armazenada no interior de sacos plásticos ou frascos âmbar devidamente identificados e lacrados. Imediatamente após as coletas, o material foi conduzido ao Laboratório de Hidrometalurgia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), para o enriquecimento das culturas de BRS.

## 4.2 Enriquecimento das culturas de Bactérias Redutoras de Sulfato

O enriquecimento das BRS presentes nas amostras coletadas foi realizado em meio de cultura líquido Postgate C “modificado” segundo Cheung e Gu (2003), cuja composição está representada na tabela 4.2. Este meio de cultura foi eficaz para o cultivo de BRS por apresentar todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento deste grupo de microrganismos. Para diminuir a concentração de oxigênio no interior do meio de cultura e manter a condição de anaerobiose foi adicionado tioglicolato de sódio ao mesmo. O pH da solução foi ajustado para  $5,5 \pm 0,2$  e  $7,0 \pm 0,2$ . A fonte de carbono e elétrons também foi modificada, sendo adicionados ao meio de cultura lactato ou etanol. A escolha da fonte de carbono foi fundamental para avaliar o crescimento das culturas de BRS cultivadas. Em seguida, as soluções foram autoclavadas em calor úmido ( $120^{\circ}\text{C}$ , 1,5 atm, 20 minutos). A solução de sulfato ferroso foi autoclavada separadamente em pH 7,0 ou 5,5 e depois adicionada à solução de sais.

Tabela 4.2 - Composição do meio de cultura Postgate C “modificado” segundo Cheung e Gu (2003).

<i>Composição</i>	<i>Quantidade (gL<sup>-1</sup>)</i>
Lactato de sódio	0,6
Citrato de sódio	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,06
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0
Extrato de levedura	1,0
EDTA	0,3
Tioglicolato de sódio	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Agar	0,5

Para avaliar o crescimento de culturas mistas de BRS em diferentes fontes de carbono, o lactato de sódio foi substituído por etanol no meio de cultura. O volume de 6,7 mL (5,12 g) de etanol (95% concentrado) foi adicionado a 1 litro de meio de cultura, com o objetivo de enriquecer espécies de BRS capazes de metabolizar sulfato com esse substrato.

As amostras provenientes dos sedimentos e do lodo dos reatores foram agitadas individualmente em um 1 litro de água destilada até a formação de uma solução homogênea. Alíquotas em triplicatas de 12 mL (5% v/v) de cada amostra foram adicionadas a Erlenmeyers de vidro contendo 250 mL de meio de cultura com variações no pH inicial (5,5 ou 7,0) e no substrato orgânico (lactato ou etanol). Os frascos foram incubados e mantido em estufa microbiológica a 35° C, durante sete dias ou até a detecção do crescimento das culturas a partir do escurecimento do meio.

#### 4.2.1 Curva de crescimento das culturas bacterianas

Os parâmetros de crescimento celular calculados para as culturas bacterianas foram o tempo de duração da fase de crescimento exponencial, o tempo de geração, o número de gerações e taxa de crescimento. A partir dessas variáveis foi possível estimar as condições mais apropriadas para o cultivo das amostras de BRS. Os cálculos referentes ao número de gerações (N) foi calculado a partir da equação abaixo (Madigan *et al.*, 2004):

$$N = 3,3*(\log DO_f - \log DO_o)$$

onde,  $DO_o$  significa a absorbância inicial e  $DO_f$  o valor da absorbância final. Quando o crescimento foi quantificado por contagem direta de células, as variáveis  $DO_o$  e  $DO_f$  foram substituídas pelo número inicial ( $N_o$ ) e número final ( $N_f$ ) de células, respectivamente. Os valores referentes ao número de gerações e a taxa de crescimento foram relacionados com o período de crescimento exponencial da cultura bacteriana avaliada.

Para analisar os parâmetros de crescimento, uma alíquota de 15 mL de cada cultura previamente enriquecida foi adicionada a frascos âmbar de 1 litro contendo 285 mL de meio de cultura líquido Postgate C “modificado” sem sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ), em pH 7,0. Os cultivos foram realizados em duplicata, mantidos em estufa microbiológica a 35° C, durante aproximadamente 50 horas, período suficiente para a cultura alcançar o fim da fase exponencial de crescimento.

Após o enriquecimento das culturas de BRS foi sintetizado meio de cultura sem sulfato ferroso para evitar a alteração nos valores de densidade óptica do meio. O meio de cultura também apresentou variação quanto à fonte de carbono e elétrons (lactato ou etanol) disponível. Esta variação permitiu avaliar a influência do substrato orgânico sobre a proliferação celular nas amostras de bactérias presentes nas culturas.

### 4.3 Definição das condições de estudo

As culturas enriquecidas capazes de crescer e produzir sulfeto em meio Postgate C “modificado” foram submetidas a novas condições de cultivo. A atividade das bactérias foi avaliada em quatro meios de cultura líquido, monitorando-se a produção celular (a partir da densidade ótica) e o consumo de sulfato ao longo do período correspondente a fase de crescimento exponencial.

Os meios de cultura líquidos testados foram os meios Postgate B (Cabrera *et al.*, 2006), Postgate C (Cabrera *et al.*, 2006), Postgate C “modificado” (Cheung e Gu, 2003) e meio Mínimo (Merdicio *et al.*, 2007) cujas composições estão apresentadas na tabela 4.3. Cada meio de cultura ainda apresentou variação quanto à fonte de carbono e elétrons (etanol ou lactato) e quanto ao pH inicial ( $7,0 \pm 0,2$  e  $5,5 \pm 0,2$ ).

O etanol foi adicionado, em concentração de  $5,12 \text{ gL}^{-1}$ , em substituição ao lactato de sódio nos meios de cultura Postgate B, Postgate C e Postgate C “modificado”. No meio Mínimo, a concentração de etanol utilizada foi de  $0,55 \text{ gL}^{-1}$ .

As culturas foram inoculadas em frascos âmbar de 1 litro com volume útil de 300 ml. Antes da inoculação, as culturas foram enriquecidas nos meios de cultivo e nas condições correspondentes às submetidas para as análises. Uma alíquota de 15 ml de cultura enriquecida foi adicionada a 285 mL de cada meio de cultura líquido sem sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). As inoculações foram realizadas em duplicatas, mantidas em estufa a  $35^\circ \text{C}$ , durante 55 horas. Alíquotas de 7 mL foram retiradas dos frascos nos intervalos de 0, 22, 30, 45 e 55 horas. O crescimento bacteriano foi medido pelo método indireto baseado no aumento da turbidez (DO) do meio. A concentração de sulfato foi medida por espectrofotometria de emissão atômica com fonte plasma.

Tabela 4.3 - Composição dos meios de cultura ( $\text{gL}^{-1}$ ) para análise do crescimento e consumo de sulfato das culturas de bactérias redutoras de sulfato.

<i>Composição (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</i>		<i>Postgate B</i>	<i>Postgate C</i>	<i>Postgate C "modificado"</i>	<i>Meio Mínimo</i>
Lactato de sódio		3,5	6,0	0,6	1,1
Citrato de sódio		-	-	0,3	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$		0,5	0,5	0,5	0,05
$\text{NH}_4\text{Cl}$		1,0	1,0	1,0	0,126
$\text{Na}_2\text{SO}_4$		-	4,5	4,5	3,0
$\text{CaCl}_2$		0,06	-	0,06	0,02
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		2,0	0,06	2,0	0,1
Extrato de levedura		1,0	0,25	0,1	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,5	-	0,5	0,01
Tioglicolato		0,1	-	0,5	-
Ácido ascórbico		0,1	-	-	-
Agar		-	-	0,5	-
EDTA		-	-	0,3	-
KCl		-	-	-	0,1
$\text{CoCl}_2$		-	-	-	0,005
Razão	Lactato	3,1	1,8	0,3	0,5
DQO/sulfato teórica	Etanol	7,5	3,0	2,2	0,5

#### 4.4 Cinética de remoção de sulfato em diferentes condições de cultivo

O meio de cultivo utilizado para avaliar a cinética de remoção de sulfato e crescimento bacteriano das culturas de BRS em diferentes valores de pH e razão DQO/sulfato foi o meio líquido Postgate C (Cabrera *et al.*, 2006) sem sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Para calcular a razão DQO/sulfato desejada, houve modificações nas concentrações dos sais de sulfato e dos substratos orgânicos dos meios de cultivo. A concentração inicial de sulfato utilizada nos meios de cultivo variou entre 2,5 e 3,0  $\text{gL}^{-1}$  de sulfato. A concentração do substrato orgânico (lactato ou etanol) foi representada pela demanda química por oxigênio (DQO). A DQO pode ser definida como a quantidade de oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica biodegradável, ou seja, avalia a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) em  $\text{mgL}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  que será consumido para degradação completa de matéria orgânica a  $\text{CO}_2$ .

A metodologia de cultivo das culturas de BRS sofreu algumas modificações. Os testes para acompanhamento do crescimento bacteriano, da cinética de remoção de sulfato e da variação no pH durante os cultivos foram realizados em frascos âmbar com volume de 500 mL. Alíquotas de 20 mL (5% v/v) de inóculo previamente enriquecido foram adicionadas aos frascos contendo meio líquido Postgate C. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e lacrados com fita tipo “silver tape” (Figura 4.9). Em seguida, ocorreu a retirada do oxigênio no *headspace* com a adição de nitrogênio gasoso durante 5 minutos. Os ensaios foram realizados em duplicata, mantidos em estufa microbiológica a 35° C, por um período de 216 horas. Uma torneira de três vias de plástico acoplada a uma agulha de seringa foi mantida na superfície da rolha de borracha dos frascos de cultivo. Essa torneira funcionou como uma válvula para o controle dos gases e para a retirada de inóculo do interior dos frascos. Alíquotas de 4 mL foram retiradas periodicamente, com auxílio de uma seringa de 10 mL, no período de 216 horas de cultivo, para medir a concentração de sulfato, o pH e a contagem de células. Para a cultura LG01 em razão DQO/sulfato igual a 2,0, contendo lactato ou etanol e em pH 7,0, a produção de ácidos orgânicos também foi quantificada durante o período de cultivo.



Figura 4.9 - Frascos para cultivo de BRS em condições de anaerobiose.

## 4.5 Crescimento de BRS em meios de cultivo contendo metais

### 4.5.1 Seleção de culturas de BRS tolerantes a metais

Para avaliar a tolerância das culturas de BRS a metais, as culturas LG01, LG02, UASB01 e UASB02 foram inoculadas em meio de cultura líquido Postgate C “modificado” (Cheung e Gu, 2003), contendo níquel, cobre e manganês. O meio de cultura sofreu modificações quanto ao substrato orgânico (etanol ou lactato) e ao valor do pH inicial ( $7,0 \pm 0,02$  e  $5,5 \pm 0,02$ ). A concentração inicial dos metais foi de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  para níquel ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e  $10 \text{ mgL}^{-1}$  para cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Tais concentrações excedem o valor mínimo estabelecido pela Legislação Nacional, resolução CONAMA nº 357/05, para lançamento de efluentes em corpos hídricos.

A metodologia de inoculação direta com volume fixo foi evitada para minimizar a interferência do sulfeto de hidrogênio presente no meio de cultura enriquecido, na concentração inicial de metais presentes no frasco de cultivo. A técnica para inoculação consistiu na filtração das culturas mistas em membrana Milipore estéril com  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade. Uma alíquota de 5% (v/v) de meio enriquecido com BRS foi filtrada e em seguida a membrana foi lavada com solução salina (0,9%). O volume de meio enriquecido filtrado poderia ser menor, desde que houvesse completa saturação da membrana. A lavagem da membrana permitiu a possível retirada do sulfeto de hidrogênio aderido às células bacterianas e à própria membrana. As membranas provenientes das filtrações foram

adicionadas a Erlenmeyers de vidro contendo 300 mL de meio de cultura líquido com sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). As inoculações foram realizadas em duplicatas, acondicionadas em estufa microbiológica a  $35^\circ\text{C}$ , durante sete dias. A atividade bacteriana foi avaliada a partir da capacidade de crescer e produzir sulfeto nessas condições. A produção de sulfeto foi estimada qualitativamente a partir do escurecimento do meio de cultura, comparada com uma amostra controle sem microrganismos, que manteve a coloração inicial do meio de cultura avermelhada.

#### **4.5.2 Crescimento bacteriano e redução de sulfato pelas BRS na presença de metais**

Para avaliar a influência dos metais níquel, cobre e manganês no crescimento bacteriano e na remoção de sulfato, a cultura LG01 foi inoculada em meio de cultura Postgate C, em pH neutro. Esta cultura foi selecionada por apresentar os melhores resultados de crescimento e consumo de sulfato dentre as culturas e nas condições de cultivo estudadas. O meio de cultura sofreu modificações quanto à fonte de carbono (etanol ou lactato), com valor de  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  igual a 2,0. Foram adicionadas  $300\text{ mgL}^{-1}$  dos quelantes EDTA e citrato de sódio, a fim de garantir a solubilidade dos metais em pH inicial igual a 7,0. A concentração inicial dos metais foi de 20 ou  $50\text{ mgL}^{-1}$  para o níquel; 10 ou  $25\text{ mgL}^{-1}$  para o cobre e o manganês.

A inoculação da cultura LG01 foi realizada a partir da filtração da amostra previamente enriquecida em membrana, como descrito no item 4.5.1. O cultivo foi realizado em frascos âmbar com volume de 500 mL. A membrana proveniente da filtração da cultura LG01 previamente enriquecida foi adicionada aos frascos contendo meio líquido Postgate C com metais. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e lacrados com fita tipo “silver tape” (Figura 4.9). Em seguida, ocorreu a retirada do oxigênio no *headspace* com a adição de nitrogênio gasoso durante 5 minutos. Os ensaios foram realizados em duplicata, mantidos em estufa microbiológica a  $35^\circ\text{C}$ , por um período de 480 horas.

O desempenho da cultura LG01 em meio de cultivo contendo metais foi avaliado pelos seguintes parâmetros: crescimento da população bacteriana por meio da contagem celular direta e pela densidade óptica (DO), variação de pH do meio, variação na concentração de metais e sulfato dissolvidos remanescentes na solução. As metodologias para análise destas variáveis estão descritas a seguir.

## 4.6 Crescimento bacteriano e métodos analíticos

O crescimento bacteriano foi estimado pelos métodos indireto e direto. O método indireto de crescimento consiste na medida da turbidez do meio ao longo do cultivo bacteriano. Esta técnica detecta a variação na absorvância da amostra analisada no comprimento de onda de 600 nm, causada pelo aumento do número de células. A densidade óptica ( $DO_{600}$ ) foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi – U2800A). Já o método direto consistiu na contagem microscópica direta das células bacterianas. Amostras líquidas foram extraídas do meio e com o auxílio de câmaras especiais de contagem (câmara de Neubauer) e de microscópio óptico (Leica – DM 2500M), o número total de células foi quantificado.

A determinação da concentração de sulfato nas amostras foi realizada em Espectrofotômetro de Emissão Atômica com fonte Plasma, marca – Spectro/Modelo – Ciro CCD com Visão Radial, pelo laboratório de Geoquímica Ambiental do Departamento de Geologia da UFOP. As amostras foram diluídas inicialmente 10 vezes em água MiliQ e adicionado cloreto de cobre à solução. Esta técnica evita a reoxidação química de sulfeto de hidrogênio a íons sulfato durante a preparação das amostras para análise. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g durante 5 minutos em centrífuga, marca – Labmed, modelo – SPECTRAFUGE 16M. O sobrenadante foi retirado e as devidas diluições realizadas para as análises no espectrofotômetro.

As medidas de pH foram realizadas em um medidor digital de pH/milivolt DIGIMED, modelo DM-20 com eletrodo combinado de platina modelo DMR-CP1. Para os ajustes do pH inicial dos meios de cultivo foram utilizadas soluções de HCl 1 N e NaOH 6 N.

As análises de DQO foram realizadas segundo o “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” 20<sup>a</sup> edição. As amostras foram preparadas com auxílio de um termorreator, marca – Marconi, modelo – Dry Block MA 4004 e analisadas em espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi – U2800A).

A determinação da concentração de metais dissolvidos nos meios de cultivo foi realizada em Espectrofotômetro de Emissão Atômica com fonte Plasma, marca – Spectro/Modelo – Ciro CCD com Visão Radial, pelo laboratório de Geoquímica Ambiental do Departamento de Geologia da UFOP. As amostras foram diluídas inicialmente 10 vezes em água MiliQ e adicionado acetato de zinco à solução. Esta técnica

auxilia na sedimentação dos cristais de sulfeto metálicos suspensos na solução. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g durante 5 minutos em centrífuga, marca – Labmed, modelo – SPECTRAFUGE 16M. O sobrenadante foi retirado e as devidas diluições realizadas para as análises no espectrofotômetro.

As análises dos ácidos orgânicos foram realizadas em cromatógrafo HPLC (high performance liquid chromatography), marca *Shimadzu - Serie 1050*, utilizando-se uma coluna de troca iônica *Aminex HPX-87H* 300 mm x 7.8 mm da *Bio-Rad*. As curvas de calibração foram realizadas com padrões dos principais ácidos orgânicos (fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico). A mistura de ácidos foi analisada em comprimento de onda de 210 nm e foram obtidos os cromatogramas para a construção das curvas de calibração. As concentrações dos padrões foram de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 mgL<sup>-1</sup>. A fase móvel empregada foi ácido sulfúrico 0,01 molL<sup>-1</sup>, com uma vazão de 0,6 mLmin<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi mantida em 50°C e o volume de injeção empregado foi de 10 µL. As amostras de ácidos orgânicos foram filtradas em membrana Milipore com porosidade de 0,22 µm, e acondicionadas em geladeira até o momento das análises.

#### **4.7 Características morfológicas das culturas de BRS**

As bactérias das culturas LG01 cultivadas em meio Postgate C contendo lactato ou etanol foram caracterizadas quanto a forma e coloração da estrutura celular pela técnica de coloração de Gram (Madigan *et al.*, 2004). Aproximadamente 100 µL de cultura enriquecida foram fixadas em lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio óptico, marca Leica, modelo DM 2500M, com aumento de 10x pelas oculares e 100x pela objetiva.

#### **4.8 Caracterização molecular das culturas de BRS**

Após a filtragem das amostras crescidas nas condições descritas anteriormente, o DNA das amostras foi extraído e purificado utilizando-se o Kit Wizard<sup>®</sup> - Purificação de DNA Genômico (Promega).

Para as reações da PCR foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificar fragmentos do RNAr 16S e da região 16S, intergênica e 23S. Os iniciadores da região 16S, intergênica e 23S foram construídos com o objetivo de comparar a população microbiana existente nas amostras enriquecidas. Iniciadores: DSR16Sense 5' ACACTGGGACTGGAACACG 3'; DSR16Antisense 5' GGCTATCACTCGCTATGG 3; DSRBSense: 5'ACGCCACTGGAAGCACG-3'; e DSR-BAntisense 5'GTGTAGCAGTTACCGCA3'.

Para amplificar os fragmentos do gene RNAr 16S e da região 16S, intergênica e 23S, foi utilizada a técnica da PCR. Em um tubo tipo Eppendorf com capacidade para 500 µL foi adicionada a mistura da reação da PCR com um volume final de 50 µL. Os componentes da reação estão descritos na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Componentes utilizados na reação de PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>
Tampão da reação (10x e sem Mg <sup>2+</sup> )	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µL
dNTPs (10 M)	1,0 µL
Solução de oligonucleotídeos específicos diretos e inversos (10 mM)	2,0 µL
Platinum Taq DNA polimerase (5 u/µL)	1,0 µL
H <sub>2</sub> O Milli-Q Estéril	37,5 µL
DNA genômico ou DNA plasmidial (200 ng)	2,0 µL

A mistura reacional foi incubada em um termociclador (Thermo Hybaid Px2) a 94° C, durante 4 minutos para desnaturação do DNA e ativação da Platinum Taq DNA polimerase. Após a desnaturação, a reação de amplificação consistiu de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94° C durante 1 minuto, uma etapa de hibridização durante 1 minuto a 60° C, e uma etapa de extensão a 72° C durante 1 minuto. Ao final dos ciclos a reação foi mantida a 72° C durante 6 minutos e resfriada a 4° C.

Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1,2% e purificados posteriormente pelo método direto com acetato de sódio e metanol e pelo método “Freeze-Squeeze” de acordo com Tauts e Renz (1983).

Na seqüência, o material genômico purificado foi empregado na clonagem e transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes utilizando-se o vetor pGEM-T Easy (Promega). Para a confirmação da clonagem, vinte das colônias recombinantes foram transferidas, individualmente, para 1,5 mL de caldo LB/ampicilina, durante 14 horas e submetidas à amplificação por PCR como descrito anteriormente. A seguir, 5 $\mu$ L da reação foram analisadas em gel de agarose 1,2%. Os amplicons foram corados com brometo de etídeo e visualizados com auxílio de um transiluminador em UV (Vilber Lourmat). O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por comparação com um padrão de massa molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). O DNA plasmidial foi extraído por meio de lise alcalina e, a seguir, purificado e seqüenciado.

Após o seqüenciamento, as seis seqüências de nucleotídeos foram trimadas para retirada da seqüência corresponde ao vetor, e em seguida submetidas ao programa CAP3 (“Sequence Assembly Program”) para a busca de um consenso. O consenso obtido foi submetido a uma busca por similaridades de nucleotídeos com uso do algoritmo BLASTn no banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Todo este procedimento de caracterização ao nível molecular das BRS da cultura LG01 aqui resumido foi realizado pelos pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Ouro Preto.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Enriquecimento e cultivo de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

#### 5.1.1 Enriquecimento de culturas de BRS

O enriquecimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) provenientes de diferentes ambientes apresentaram resultados satisfatórios, havendo crescimento de todas as culturas inoculadas em meio Postgate C “modificado” nos valores de pH (5,5 e 7,0) e nas fontes de carbono (etanol ou lactato) analisadas. O enriquecimento de BRS é um procedimento relativamente simples, basta empregar um meio com lactato-sulfato anóxico adicionando sulfato ferroso e agentes redutores, como tioglicolato ou ascorbato (Madigan *et al.*, 2004). A figura 5.10 apresenta as condições de enriquecimento e a alteração na cor do meio de cultivo Postgate C “modificado” pelas culturas de BRS.



Figura 5.10 - Enriquecimento de BRS das amostras coletadas em meio líquido Postgate C “modificado”. (a) Enriquecimento e cultivo das amostras e (b) crescimento das culturas de BRS: (1) inóculo em  $t = 0$  h, (2) inóculo em  $t = 24$  h e, (3) inóculo em  $t = 72$  h.

A figura 5.10 exhibe as condições de enriquecimento e cultivo das amostras inoculadas em meio Postgate C “modificado”. Os frascos com os inóculos foram mantidos em estufa microbiológica a  $35^{\circ}\text{C}$  e em repouso durante aproximadamente sete dias (168 horas). Cheung e Gu (2003) utilizaram o mesmo meio Postgate C “modificado” para enriquecer consórcios de BRS de sedimentos marinhos contaminados com metais pesados. Postgate e

Gall (1973) descreveram uma série de meios de cultivo utilizados para o enriquecimento e isolamento de BRS, porém, segundo Gibson (1990), a seleção de um meio apropriado para o enriquecimento de culturas de BRS estará relacionado com a origem do inóculo e com as condições de cultivo às quais esse inóculo será submetido.

Todas as amostras inoculadas (LG, UASB e DAM) produziram sulfeto de hidrogênio, indicando metabolização de sulfato. O meio de cultivo Postgate C “modificado” é seletivo e indicador da atividade de BRS. Esse meio apresenta em sua constituição sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) que lhe confere uma coloração inicial avermelhada, como exibido na figura 5.10 (b.1 e b.2). Durante o metabolismo das BRS, o sulfato foi reduzido a sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), que em presença de ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) no meio promove a formação de um precipitado preto, provavelmente de sulfeto ferroso ( $\text{FeS}$ ) (figura 5.10 - b.3). O escurecimento do meio de cultivo pela formação de  $\text{FeS}$  é um indicativo da atividade metabólica de BRS. Tal escurecimento não foi observado nos frascos controle.

### **5.1.2 Curva de crescimento bacteriano**

Os perfis de crescimento das culturas de BRS cultivadas em pH 7,0 utilizando-se diferentes fontes de carbono e elétrons foram determinados a partir das curvas de crescimento baseadas na leitura da densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ), medida indireta do crescimento celular *versus* tempo. O acompanhamento da proliferação celular das culturas bacterianas inoculadas (LG, UASB e DAM) foi realizado periodicamente até o momento em que as populações bacterianas atingiam a fase estacionária de crescimento. Os parâmetros de crescimento avaliados foram: tempo de crescimento exponencial (T), tempo de geração (g) e número de gerações (n) (tabela 5.5). A taxa de crescimento (t) foi expressa por unidade de absorvância por hora de crescimento exponencial.

Tabela 5.5 - Parâmetros de crescimento para as culturas de BRS em meio Postgate C “modificado”, em pH 7,0, com variação na fonte de carbono das culturas mistas de BRS provenientes da Lagoa do Gambá (LG), dos lodos dos reatores UASB (UASB) e de uma drenagem ácida de mina (DAM).

<i>Amostras</i>	<i>Fonte de carbono</i>	<i>Tempo de crescimento exponencial (horas)</i>	<i>Tempo de geração (horas/ geração)</i>	<i>Número de gerações</i>
LG01	Lactato	27	9,77	2,77
LG01	Etanol	27	35,40	0,76
LG02	Lactato	24	9,60	2,50
LG02	Etanol	24	49,80	0,48
UASB01	Lactato	32	35,32	0,90
UASB01	Etanol	46	46,00	1,00
UASB02	Lactato	32	26,29	1,22
UASB02	Etanol	49	73,35	0,67
DAM01	Lactato	27	33,00	0,818
DAM01	Etanol	30	23,02	1,303
DAM02	Lactato	31	21,26	0,047
DAM02	Etanol	34	25,75	0,039

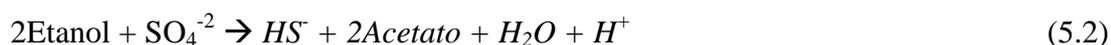
Os resultados dos parâmetros de crescimento exibem os intervalos de tempo necessários para o desenvolvimento das culturas bacterianas estudadas. A partir desses valores, podemos estimar o intervalo de tempo para o enriquecimento das culturas bacterianas e o volume de células produzidas durante esse intervalo. O período de crescimento exponencial varia entre as culturas bacterianas em função do substrato orgânico disponível. O tempo de crescimento exponencial na presença de lactato como fonte de energia é menor para a cultura LG02 (24 horas), seguida das culturas LG01 (27 horas) e DAM01 (27 horas). Quando o substrato orgânico foi o etanol, o período de

crescimento exponencial foi de 24 horas para a cultura LG02, 27 horas para LG01 e 30 horas para DAM01.

Contudo, os resultados de produção celular pelas culturas avaliadas na presença de lactato ou etanol foram diferentes. Pelos parâmetros de crescimento das culturas de BRS mostrados na tabela 5.5, a utilização de lactato como substrato orgânico apresentou, de maneira geral, melhores resultados em relação ao etanol. As culturas provenientes da Lagoa do Gambá (LG01 e LG02) apresentaram maior produção de células bacterianas com valores de número de gerações de 2,77 e 2,50 na presença de lactato. O crescimento em etanol foi incapaz de promover a duplicação celular total da população bacteriana das culturas LG01 e LG02. Além do número de gerações, a análise dos valores da taxa de crescimento (em unidade de absorvância/hora, figura 5.11) mostrou que as culturas de BRS estudadas cresceram melhor na presença de lactato como substrato orgânico (0,103-LG01; 0,104-LG02; 0,028-UASB01; 0,038-UASB02; 0,018-DAM01; 0,024-DAM02), com exceção das amostras provenientes da DAM cuja taxa de crescimento foi baixa independentemente da fonte de carbono. A degradação biológica de lactato via redução de sulfato pode gerar energia celular em sua oxidação incompleta e completa. No metabolismo das BRS, o lactato é preferencialmente degradado via respiração anaeróbia quando há concentrações elevadas de aceptores de elétrons, neste caso o íon sulfato (Hamilton, 1998). O ganho energético celular na redução dissimilativa de sulfato é maior na oxidação do lactato do que na degradação do etanol, por mol de sulfato reduzido (Kaksonen, 2004). As equações abaixo exibem o ganho energético na degradação incompleta de lactato ou etanol via redução de sulfato:



$$\Delta G^\circ = -159,6 \text{ KJ/mol de SO}_4^{2-}$$



$$\Delta G^\circ = -132,7 \text{ KJ/mol de SO}_4^{2-}$$

Dessa forma, o maior crescimento das culturas de BRS estudadas na presença de lactato pode estar relacionado com a maior disponibilidade energética desse substrato para a célula. Contudo, apesar da degradação do etanol resultar em menor produção de energia celular, essa fonte de carbono pode promover o consumo biológico de concentrações consideráveis de sulfato presente no meio (Stucki *et al.*, 1993).

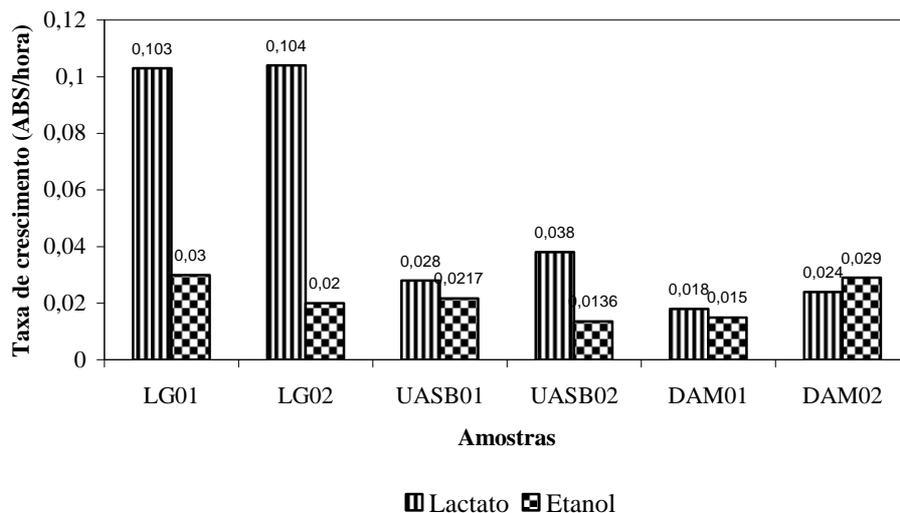


Figura 5.11 - Taxa de crescimento em meio Postgate C “modificado” em pH 7,0, variando a fonte de carbono das culturas mistas de BRS coletadas na Lagoa do Gambá (LG), dos lodos dos reatores UASB (UASB) e da drenagem ácida de mina (DAM).

## 5.2 Definição das condições de cultivo

As culturas mistas de BRS cultivadas em meio Postgate C “modificado” foram inoculadas em diferentes meios de cultivo líquido (Postgate C “modificado”, Postgate C, Postgate B e meio Mínimo) em condições de pH inicial moderadamente ácido (5,5) e neutro (7,0) e com diferentes fontes de carbono e elétrons (etanol ou lactato). Tal procedimento foi realizado visando selecionar um consórcio microbiano adequado e um meio de cultivo que promovesse uma alta remoção de sulfato, que utilize fontes de carbono de menor custo e que seja capaz de metabolizar sulfato em condições moderadas de acidez.

### 5.2.1 Efeito da fonte de carbono e do pH inicial

O desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) está vinculado aos substratos orgânicos disponíveis para o seu metabolismo. Para as culturas mistas de BRS estudadas foram testados o etanol e o lactato como fontes de elétrons e carbono. As concentrações iniciais de lactato e sulfato dos meios de cultivo foram as mesmas descritas originalmente para os meios. A concentração de etanol inicial foi estimada de acordo com Nagpal *et al.* (2000) para os meios Postgate C “modificado”, Postgate C e Postgate B. Para o meio Mínimo, a concentração inicial de etanol foi definida de acordo com Merdicio (2007).

As tabelas 5.6 e 5.7 apresentam os valores de consumo absoluto de sulfato e o crescimento das culturas bacterianas cultivadas nos quatro meios de cultura indicados durante 55 horas, a 35° C, em pH 5,5 e 7,0. A partir dos resultados de enriquecimento bacteriano, a cultura DAM01 foi excluída dos ensaios posteriores devido ao baixo crescimento bacteriano e produção de sulfeto.

Dentre os meios avaliados, o meio de cultura Postgate C com lactato em pH 7,0 promoveu os melhores resultados de remoção biológica de sulfato. As culturas LG01, LG02, UASB01 e UASB02 foram responsáveis pela remoção de 2,0, 0,9, 1,1 e 1,9 gL<sup>-1</sup> de sulfato, respectivamente, equivalentes a 69%, 25%, 28% e 56%. Este meio de cultura apresentava uma razão DQO/sulfato de aproximadamente 3,0. Na presença de etanol como fonte de carbono e elétrons e em pH neutro, o meio de cultura Postgate C “modificado” promoveu os maiores resultados de remoção biológica de sulfato. As culturas LG01 e UASB01 consumiram 0,7 gL<sup>-1</sup> (17%) e 1,2 gL<sup>-1</sup> (26%) de sulfato, respectivamente. A razão DQO/sulfato nesse meio de cultura foi 1,34. De acordo com esses resultados, a remoção biológica de sulfato e o crescimento bacteriano parecem ser favorecidos quando o lactato está disponível como fonte de carbono e elétrons.

A remoção de sulfato em condições moderadamente ácidas também foi melhor com o emprego do lactato como substrato orgânico. No meio de cultivo Postgate C “modificado” as culturas LG01, UASB01 e DAM foram capazes de consumir 0,9 gL<sup>-1</sup> (31%), 1,3 gL<sup>-1</sup> (27%) e 1,8 gL<sup>-1</sup> (36%) de sulfato, respectivamente. Quando o etanol foi utilizado como substrato orgânico em pH 5,5, a cultura LG01 removeu 0,8 gL<sup>-1</sup> (61%) de sulfato em meio Postgate B e as culturas UASB01 e UASB02 consumiram 0,7 gL<sup>-1</sup> (28%) de sulfato em meio Mínimo. O consumo absoluto de sulfato pelas culturas avaliadas nos meios de cultivo contendo lactato foi maior do que quando as mesmas foram cultivadas em etanol, tanto em pH 5,5 quanto em pH 7,0, durante 55 horas de cultivo. Johnson (1995) relatou que a diversidade microbiana de bactérias redutoras de sulfato em ambientes ácidos era alta e que BRS isoladas de drenagem ácida de minas (DAM) foram capazes de reduzir sulfato em condições moderadamente ácidas (pH 4,0- 6,0) quando compostos orgânicos de baixo peso molecular ou álcool eram utilizados como substratos orgânicos.

Tabela 5.6 - Remoção biológica de sulfato e crescimento celular dos cultivos mistos de BRS em diferentes meios de cultura contendo lactato como fonte de carbono durante 55 horas de cultivo a 35° C.

Inóculo		Postgate C “modificado”			Postgate C			Postgate B			Meio Mínimo		
		$[SO_4^{2-}]$ total ( $gL^{-1}$ )	$[SO_4^{2-}]$ removido ( $gL^{-1}$ )	Número de gerações	$[SO_4^{2-}]$ total ( $gL^{-1}$ )	$[SO_4^{2-}]$ removido ( $gL^{-1}$ )	Número de gerações	$[SO_4^{2-}]$ total ( $gL^{-1}$ )	$[SO_4^{2-}]$ removido ( $gL^{-1}$ )	Número de gerações	$[SO_4^{2-}]$ total ( $gL^{-1}$ )	$[SO_4^{2-}]$ removido ( $gL^{-1}$ )	Número de gerações
LG01	pH 7,0	3,5	0,6	3,8	2,9	2,0	4,1	1,3	0,5	4,0	2,5	0,1	3,8
	pH 5,5	3,5	0,9	3,0	2,9	0,1	4,1	1,3	0,4	5,2	2,5	0,2	4,2
LG02	pH 7,0	3,3	0	1,6	3,5	0,9	3,7	1,3	0,7	5,7	2,5	0,5	4,4
	pH 5,5	3,2	0	1,9	3,5	0	4,4	1,2	0,3	5,1	2,2	0,3	4,1
UASB01	pH 7,0	3,9	1,1	3,5	3,5	1,1	4,2	1,3	0,3	4,3	2,6	0,6	3,0
	pH 5,5	3,9	1,3	3,3	3,5	0,7	3,9	1,4	0,4	6,0	2,7	0,9	4,7
UASB02	pH 7,0	3,9	0,2	2,9	3,5	1,9	3,8	1,3	0	2,7	2,6	0	2,4
	pH 5,5	3,9	0,1	3,3	3,5	1,3	4,0	1,3	0	3,5	2,6	0,1	2,0
DAM	pH 7,0	3,9	2,0	2,8	3,5	1,0	3,3	1,3	0,5	3,1	2,7	0,1	2,8
	pH 5,5	3,9	1,8	3,2	3,5	1,3	3,1	1,3	0	5,0	2,5	0,2	4,1

Tabela 5.7 - Remoção biológica de sulfato e crescimento celular dos cultivos mistos de BRS em diferentes meios de cultura contendo etanol como fonte de carbono durante 55 horas de cultivo a 35° C.

Inóculo		Postgate C “modificado”			Postgate C			Postgate B			Meio Mínimo		
		$[SO_4^{2-}]$ total (gL <sup>-1</sup> )	$[SO_4^{2-}]$ removido (gL <sup>-1</sup> )	Número de gerações	$[SO_4^{2-}]$ total (gL <sup>-1</sup> )	$[SO_4^{2-}]$ removido (gL <sup>-1</sup> )	Número de gerações	$[SO_4^{2-}]$ total (gL <sup>-1</sup> )	$[SO_4^{2-}]$ removido (gL <sup>-1</sup> )	Número de gerações	$[SO_4^{2-}]$ total (gL <sup>-1</sup> )	$[SO_4^{2-}]$ removido (gL <sup>-1</sup> )	Número de gerações
LG01	pH 7,0	3,5	0,7	3,3	2,8	0,5	2,0	1,3	0,5	4,6	2,5	0,1	1,1
	pH 5,5	3,3	0,3	0,5	3,0	0,2	1,1	1,3	0,8	4,2	2,6	0,2	1,7
LG02	pH 7,0	3,5	0	0,1	3,6	0	1,0	1,2	0,6	2,6	2,4	0,4	0,1
	pH 5,5	3,5	0	0,1	3,6	0	1,3	1,2	0,3	1,7	2,4	0,5	0,9
UASB01	pH 7,0	3,6	1,2	2,9	3,6	0,8	2,3	1,4	0,3	3,4	2,7	0,9	0,4
	pH 5,5	3,7	0,5	2,3	3,6	0,6	2,3	1,2	0,5	6,4	2,5	0,7	2,3
UASB02	pH 7,0	3,6	0	0,8	3,5	0	2,6	1,4	0,2	3,1	2,7	0,7	0,4
	pH 5,5	3,6	0	0,1	3,5	0,3	1,4	1,3	0	4,0	2,7	0,7	2,1
DAM	pH 7,0	3,5	0,3	0,9	3,6	0,1	1,3	1,3	0,2	3,0	2,8	0	1,5
	pH 5,5	3,5	0,3	2,8	3,6	0	2,1	1,4	0	3,8	2,8	0,3	0,7

Os valores de pH dos meios de cultura sofreram variações durante o crescimento bacteriano de acordo com o substrato orgânico metabolizado. As culturas cultivadas em presença de lactato, pH 7,0 durante 55 horas, não promoveram alteração no valor de pH do meio. Por outro lado, quando o pH inicial do meio foi 5,5, houve aumento nos valores de pH, atingindo-se valores próximos a 7,0, após 55 horas de cultivo. As culturas inoculadas com etanol como substrato orgânico não seguiram o mesmo comportamento das amostras inoculadas em meio contendo lactato. Em condições iniciais neutras, os valores de pH estavam entre 6,0 e 6,5 após 55 horas de cultivo com etanol. Mantendo-se o mesmo substrato, porém em valores iniciais de pH 5,5, a acidez foi mantida, em alguns casos valores mínimos de pH igual a 4,5 foram observados durante o período de cultivo.

O desenvolvimento das culturas bacterianas mistas nos quatro meios de cultivo testados foi quantificado a partir do crescimento populacional, estimado pelo número de gerações (N), após um intervalo de tempo de 55 horas. Este período compreende as fases lag e exponencial da curva típica de crescimento bacteriano. De acordo com as tabelas 5.6 e 5.7, todas as culturas bacterianas foram capazes de crescer nas condições e nos meios de cultivo estudados, ainda que algumas delas não tenham removido o sulfato. O crescimento bacteriano sem consumo de sulfato indicou a proliferação de outros grupos de microbianos.

Em termos gerais, o crescimento das culturas microbianas foi maior em meio contendo lactato como fonte de carbono e energia (tabela 5.6 e 5.7), mesmo nos meios de cultivo nos quais sua concentração foi menor que a do etanol (ver tabela 4.3). Utilizando-se meio Postgate B, as culturas avaliadas obtiveram número de gerações maior que 4, mesmo em condições iniciais moderadamente ácidas, salvo algumas exceções. O meio Postgate C também favoreceu o crescimento bacteriano, possibilitando uma produção superior a 3,5 gerações bacterianas pelas culturas inoculadas nesse meio. A degradação bacteriana de lactato no meio de cultivo produz vários intermediários, entre eles hidrogênio, acetato, etanol e propionato, que podem favorecer o desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato, metanogênicas e acetoclásticas (Widdel e Pfenning, 1982).

Por outro lado, o crescimento microbiano via metabolismo do etanol foi melhor quando as culturas foram cultivadas em meio Postgate B. Nesse meio de cultivo, a proliferação celular foi muito superior quando comparada aos demais. O número de gerações mínimo produzido por essas culturas foi de 2,6 gerações em pH 7,0 e 1,7

gerações em pH 5,5 pela cultura LG02. As outras culturas foram capazes de produzir valores superiores a 3,0 gerações. Os resultados de crescimento celular em meio de cultivo Postgate C também foram interessantes. Todas as culturas cultivadas nesse meio foram capazes de duplicar o número inicial de células no intervalo de 55 horas de cultivo, em condições ácidas e neutras. A acidez inicial dos meios de cultivo com etanol não inibiu o crescimento das culturas bacterianas.

Os resultados de crescimento das culturas cultivadas em meio Postgate B em lactato foram maiores que os valores exibidos pelos outros meios. Contudo, se analisarmos a concentração de sulfato consumida pelas bactérias durante o crescimento celular, observaremos que os meios Postgate C “modificado” e Postgate C apresentam os melhores resultados de remoção de sulfato por número de gerações produzidas. Em meio Postgate C “modificado” contendo lactato e pH 7,0, os maiores resultados de remoção de sulfato por número de gerações produzidas foram obtidos pelas culturas DAM, UASB01 e LG01. Em pH inicial 5,5, os melhores resultados foram das culturas DAM, seguidos das culturas UASB01 e LG01. Para o meio Postgate C contendo lactato e em pH 7,0, os melhores resultados foram observados para as culturas DAM, UASB02 e LG01. Quando o pH inicial era ácido, os maiores valores foram apresentados pela cultura DAM, seguidos pela UASB 02 e UASB01 (tabela 5.8).

A relação entre o consumo de sulfato e o crescimento bacteriano com etanol como fonte de energia apresentou valores menores, quando comparado ao lactato. Entre as culturas que foram capazes de duplicar o número de células e metabolizar sulfato com etanol como fonte de elétrons no período de 55 horas de cultivo, a cultura UASB01 foi responsável por consumir  $414 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato por geração em meio Postgate C “modificado” e  $348 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato por geração em meio Postgate C, em condições de pH neutro.

### **5.2.2 Seleção das culturas bacterianas**

A seleção das culturas bacterianas foi realizada com base na eficiência de remoção de sulfato pelas culturas bacterianas estudadas em diferentes meios de cultura durante 55 horas de cultivo. A figura 5.12 apresenta a eficiência relativa de remoção de sulfato nos meios de cultivo estudados pelas culturas avaliadas.

Tabela 5.8 - Remoção biológica de sulfato por número de gerações ( $\text{mgL}^{-1}$  por geração) produzidas pelas culturas BRS em diferentes meios de cultura contendo lactato como fonte de carbono durante 55 horas de cultivo a  $35^\circ\text{C}$ .

Inóculo		Postgate C “modificado” ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Postgate C ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Postgate B ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Meio Mínimo ( $\text{mgL}^{-1}$ )
LG01	pH 7,0	157,8	487,8	125,0	26,3
	pH 5,0	300,0	24,4	76,9	47,6
LG02	pH 7,0	0	243,2	122,9	113,7
	pH 5,0	0	0	58,8	73,2
UASB01	pH 7,0	314,3	261,9	69,7	200,0
	pH 5,0	393,9	179,5	66,7	191,5
UASB02	pH 7,0	70,0	500,0	0	0
	pH 5,0	33,3	325,0	0	50,0
DAM	pH 7,0	71,4	303,0	161,3	35,7
	pH 5,0	562,5	393,9	0	48,8

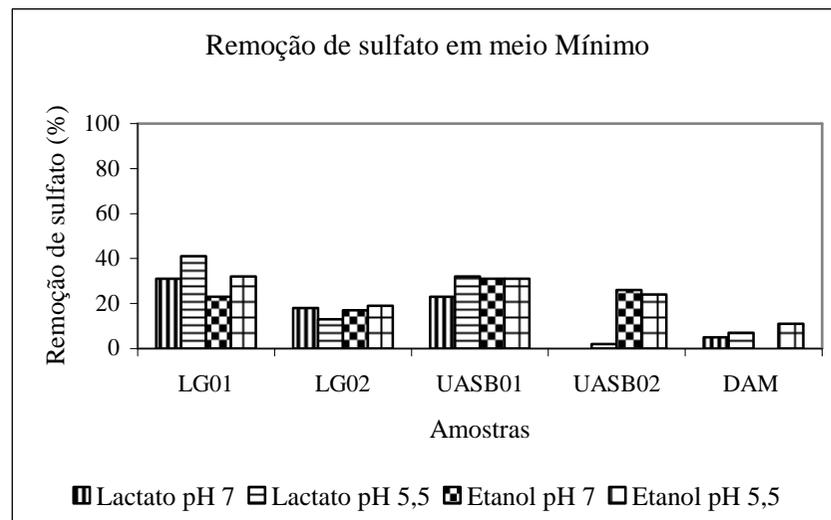
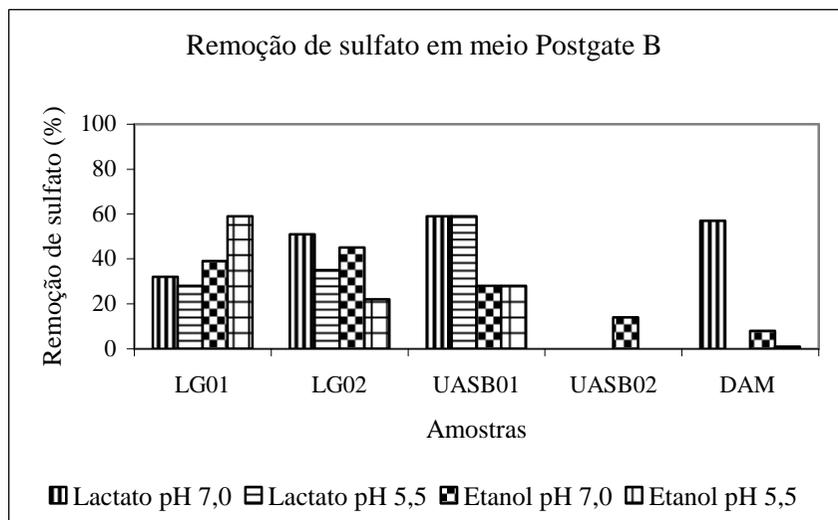
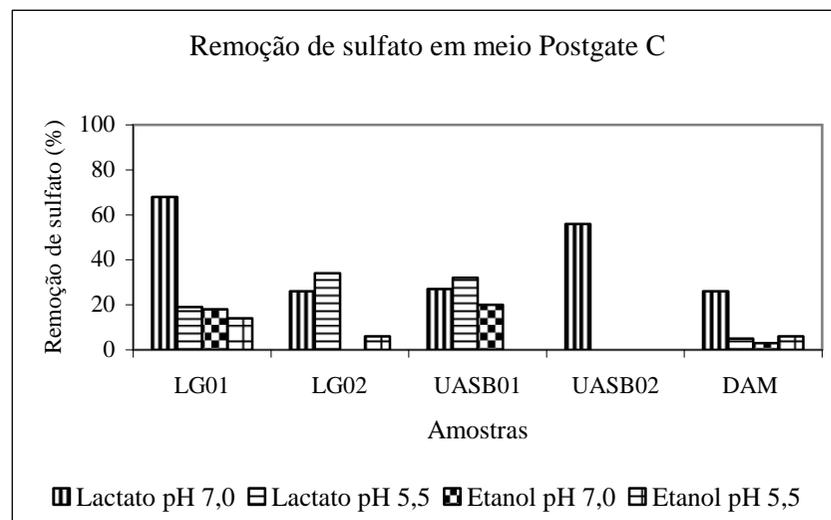
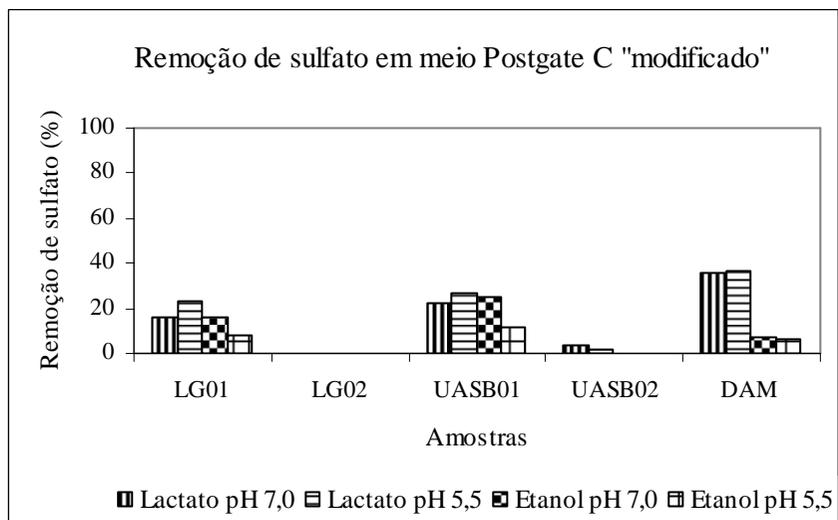


Figura 5.12 - Remoção de sulfato para as culturas LG01, LG02, UASB01, UASB02 e DAM nos quatro meios de cultura avaliados, variando a fonte de carbono (lactato ou etanol) e o pH (7,0 ou 5,5).

O meio de cultura Postgate B proporcionou os maiores valores de eficiência de remoção de sulfato, entre os meios avaliados, para as culturas mistas estudadas tanto na presença de lactato quanto de etanol como substrato orgânico. Exceção foram as culturas UASB02 e DAM que não apresentaram perfis satisfatórios de remoção de sulfato neste meio com etanol (menos de 10% de remoção). O meio Mínimo promoveu maior eficiência de remoção relativa de sulfato para as culturas bacterianas que os meios Postgate C e Postgate C “modificado” (figura 5.12). Entretanto, quando avaliamos a redução na concentração de sulfato no meio (considerando-se a concentração inicial do ânion), os meios Postgate C e Postgate C “modificado” proporcionaram condições nutricionais mais apropriadas para uma maior remoção absoluta de sulfato pelas culturas bacterianas, como mostradas nas tabelas 5.6 e 5.7.

As culturas LG01 e UASB01 foram capazes de remover sulfato em todos os meios de cultivo, com os substratos orgânicos testados e nas condições de pH avaliadas. Em algumas condições, os valores de remoção de sulfato por essas culturas nos meios de cultivo estudados não foram altos, contudo elas foram capazes de metabolizar sulfato em todas as condições. O maior valor de remoção de sulfato dentre as culturas avaliadas foi observado para a cultura LG01 em meio Postgate C com lactato e pH 7,0 ( $2,0 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato, 69%). A cultura UASB01 removeu  $1,3 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato (33%) em meio Postgate C “modificado” contendo lactato e pH 5,5. Algumas culturas apresentaram valores satisfatórios de remoção de sulfato em condições isoladas: a cultura LG02 removeu  $0,7 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato (54%) em meio Postgate B com lactato em pH 7,0; a cultura UASB02 removeu  $1,9 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato (56%) em meio Postgate C com lactato em pH 7,0; a cultura DAM foi capaz de remover  $1,3 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato (37%) em meio Postgate C com lactato em pH 5,5 e  $0,5 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato (38%) em meio Postgate B com lactato em pH 7,0.

### **5.2.3 Seleção do meio de cultivo**

A partir dos resultados de remoção biológica de sulfato, crescimento celular e adaptação às condições consideradas, as culturas LG01 e UASB01 foram selecionadas para a continuidade dos estudos. Para definição do meio de cultura ideal (melhor crescimento bacteriano associado à remoção biológica de sulfato) foi realizada uma nova série de ensaios com essas culturas, em meios líquidos Postgate B e Postgate C, em pH 7,0 e contendo lactato como substrato orgânico, com concentração fixa de sulfato equivalente a  $3,1 \text{ gL}^{-1}$ , durante 55 horas. O valor de DQO total inicial foi de  $11,57 \text{ gL}^{-1}$  para o meio

Postgate B e de  $6,2 \text{ gL}^{-1}$  para o meio Postgate C. A concentração inicial da principal fonte de carbono (lactato) foi de  $3,5 \text{ gL}^{-1}$  para o meio Postgate B e de  $6,0 \text{ gL}^{-1}$  para o meio Postgate C.

O meio de cultura Postgate C promoveu melhores resultados de crescimento e remoção de sulfato para as culturas LG01 e UASB01 (figura 5.13). Os resultados para eficiência de remoção de sulfato para a cultura LG01 foram de 74% e 43%, em meios Postgate C e Postgate B, respectivamente. Para a cultura UASB01, a eficiência de remoção de sulfato foi de 40% em meio Postgate C e 31% em meio Postgate B. O crescimento, expresso em número de gerações, para a cultura LG01 foi de 4,62 gerações em meio Postgate C e 3,19 gerações em meio Postgate B. Para a cultura UASB01, o crescimento foi de 3,22 gerações em meio Postgate C e 2,83 gerações em Postgate B. Nessas condições de cultivo, empregando-se esses meios de cultura, o crescimento e a remoção de sulfato da cultura UASB01 foram menores que aqueles apresentados pela cultura LG01.

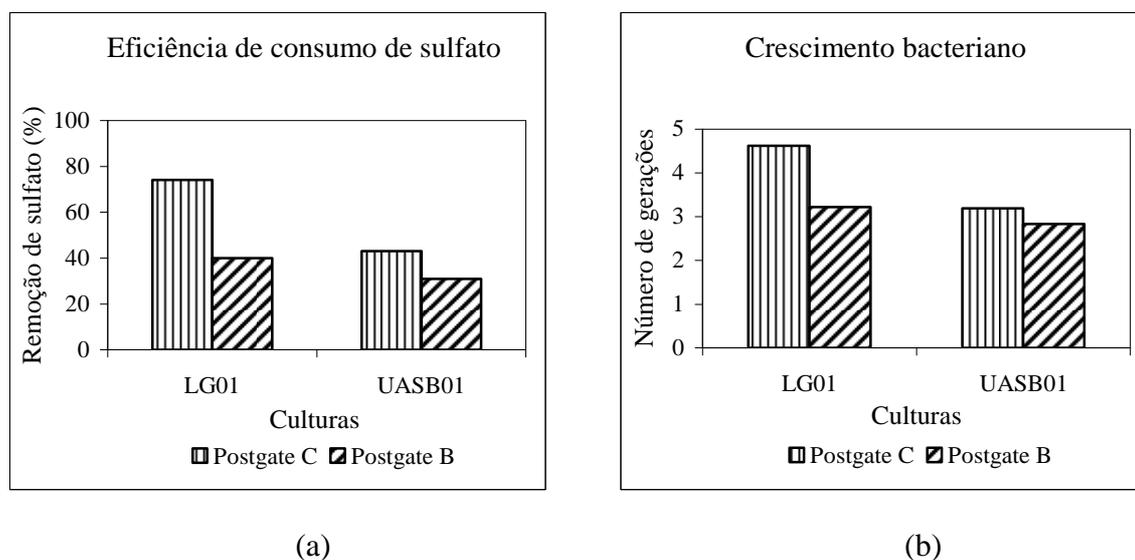


Figura 5.13 - Cultivo das culturas LG01 e UASB01 em meios de cultura Postgate B e Postgate C, com lactato como substrato orgânico, em pH 7,0 e a  $35^{\circ}\text{C}$ . (a) Eficiência de remoção de sulfato e, (b) crescimento bacteriano.

Os valores de remoção de sulfato pelas culturas LG01 e UASB01 nessas condições de cultivo são maiores do que os valores descritos pelas mesmas nos ensaios apresentados nos itens 5.2.1 e 5.2.2. Nas condições observadas nos itens 5.2.1 e 5.2.2, o meio Postgate C apresentava razão DQO/sulfato igual a 3,0, sendo a remoção absoluta de  $2,0 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato

pela cultura LG01 e  $1,1 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato pela cultura UASB01. Quando o meio avaliado foi Postgate B com razão DQO/sulfato 12,1, as culturas LG01 e UASB01 removeram  $0,5 \text{ gL}^{-1}$  e  $0,4 \text{ gL}^{-1}$  de sulfato, respectivamente. Nessas condições, a concentração inicial de sulfato de  $3,1 \text{ gL}^{-1}$  nos meios de cultivo Postgate C e Postgate B alterou a relação DQO/sulfato. Em meio Postgate C a razão DQO/sulfato foi 2,0, com remoção absoluta de sulfato de  $2,43 \text{ gL}^{-1}$  e  $1,63 \text{ gL}^{-1}$  pelas culturas LG01 e UASB01, respectivamente. No meio Postgate B, a razão DQO/sulfato foi 3,1, sendo a remoção de sulfato pela cultura LG01 de  $1,7 \text{ gL}^{-1}$  e pela cultura UASB01 de  $1,15 \text{ gL}^{-1}$ .

O crescimento e a remoção de sulfato pelas culturas de BRS LG01 e UASB01 parecem ser influenciados principalmente pela concentração inicial do substrato orgânico disponível no meio. O meio Postgate B apresenta maior valor inicial de DQO e maior variedade de nutrientes comparado ao meio Postgate C. Porém, a concentração inicial de lactato foi maior no meio Postgate C. Estes resultados indicam que a concentração inicial de DQO e a composição do substrato orgânico utilizado foram fatores importantes para o crescimento e a remoção de sulfato por culturas de BRS, nas condições avaliadas. Choi e Rim (1991) relataram um efeito negativo na atividade de remoção de sulfato por BRS em razão DQO/sulfato maior que 2,7 devido à competição com *Archaea* metanogênicas por hidrogênio e acetato. Martins *et al.* (2009) observaram que em concentrações iniciais fixas de substrato orgânico ( $6,0 \text{ gL}^{-1}$ ) e sulfato ( $3,5 \text{ gL}^{-1}$ ), o lactato foi mais efetivo que etanol e lactose na remoção de sulfato por BRS em sistema batelada.

### **5.3 Avaliação da remoção biológica de sulfato em diferentes condições de cultivo**

#### **5.3.1 Remoção biológica de sulfato em condições neutras e moderadamente ácidas**

A partir dos resultados prévios de avaliação das culturas e dos meios de cultivo, optou-se por utilizar as culturas LG01 e UASB01 por apresentarem os melhores resultados de remoção de sulfato e crescimento celular. O meio Postgate C foi selecionado por apresentar composição química mais simples, quando comparado aos outros meios de cultivo analisados, e por promover os maiores valores de redução biológica de sulfato. Os cultivos foram realizados em diferentes fontes de carbono e energia (lactato ou etanol), em

valores iniciais de pH (5,5 ou 7,0) e com concentração inicial de sulfato fixa. A razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> foi igual a 1,0 nos ensaios com lactato e 2,0 ou 3,6 nos ensaios com etanol. A influência dessas condições na remoção biológica de sulfato e no crescimento bacteriano foi observada ao longo do período de cultivo.

### 5.3.2 Crescimento da cultura mista LG01

O efeito do pH sobre o crescimento das culturas mistas LG01 foi determinante. As culturas LG01 apresentaram maior produção celular em pH 7,0 do que em pH 5,5, quando utilizada uma mesma fonte de carbono e elétrons. A cultura LG01, em pH inicial igual a 7,0, apresentou número de gerações igual a 5,2 (63,8x10<sup>5</sup> células/mL/hora) e 3,5 (16,1x10<sup>5</sup> células/mL/hora), em lactato e etanol, respectivamente. Quando a cultura foi submetida a condições ácidas (pH 5,5), os resultados para o número de gerações foram 2,9 (22,0x10<sup>5</sup> células/mL/hora) e 1,7 (0,58x10<sup>5</sup> células/mL/hora), em lactato e etanol, respectivamente. A tabela 5.9 exibe os parâmetros de crescimento da cultura LG01.

Tabela 5.9 - Parâmetros de crescimento para a cultura LG01 em meio Postgate C em valores de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> igual a 1,0 para lactato e 3,6 para etanol, em diferentes condições de pH inicial.

Condição de cultivo (fonte de carbono e elétrons/pH)	Taxa de crescimento (células/mL/hora)	Número de gerações	Tempo de crescimento (min)
Lactato/pH=7,0	63,8x10 <sup>5</sup>	5,2	32h 12min
Etanol/pH=7,0	16,1x10 <sup>5</sup>	3,5	47h 34min
Lactato/pH=5,5	22,0x10 <sup>5</sup>	2,9	57h 51min
Etanol/pH=5,5	0,58x10 <sup>5</sup>	1,7	55h 56min

O crescimento desta cultura de BRS em diferentes valores de pH sugere que a condição de neutralidade favorece o crescimento bacteriano e que estas culturas foram tolerantes a condições moderadas de acidez. Porém, a inibição de algumas espécies bacterianas foi observada, devido aos menores valores do número de gerações apresentados pelas culturas inoculadas em pH 5,5. O menor crescimento das culturas de

BRS em condições moderadamente ácidas pode estar relacionado à influência negativa do pH na atividade protéica e enzimática das bactérias ácido tolerantes, principalmente nas enzimas envolvidas na manutenção do potencial de membrana e da força próton motiva da célula (Gyure *et al.*, 1990).

As variações de pH observadas durante os experimentos foram diferentes quando alteramos o substrato orgânico (lactato ou etanol) (figura 5.14). A cultura LG01 na presença de lactato, em pH inicial igual a 7,0, manteve as condições de neutralidade do sistema. A mesma cultura, em pH inicial igual a 5,5, foi capaz de gerar alcalinidade e promover a elevação do pH para valores próximos a 7,0, após 24 horas de crescimento. Estes valores foram mantidos até o fim do cultivo. Contudo, esta mesma cultura, crescendo na presença de etanol, apresentava comportamento diverso. Neste caso, em pH inicial igual a 7,0, observou-se a diminuição no pH para valores próximos a 6,5, nas primeiras horas de crescimento, mantendo estes valores até o final do ensaio. Nos experimentos em que o pH inicial foi igual a 5,5, a condição ácida se manteve até o fim do cultivo, o pH não se alterou e não foi observado geração de alcalinidade.

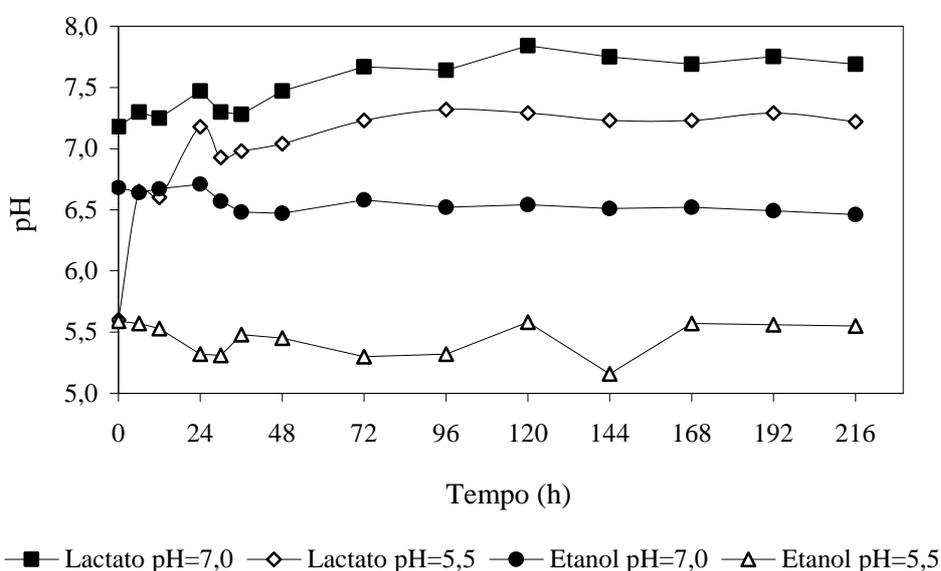


Figura 5.14 - Variação do pH nas culturas LG01 em diferentes substratos orgânicos (lactato ou etanol) durante 216 horas de cultivo e a 35° C.

A utilização de lactato ou etanol como doadores orgânicos de elétrons durante o metabolismo dissimilativo do sulfato influenciou o pH do meio ao longo do período de cultivo. A atividade metabólica de BRS na oxidação de lactato e redução de sulfato geraram íons bicarbonato e sulfeto, produzindo alcalinidade no meio proporcionalmente ao consumo de lactato e sulfato (Liamleam e Annachhatre, 2007). Segundo Kaksonen *et al.* (2004), o lactato pode ser usado como substrato orgânico para BRS em reatores para tratamento de efluentes ligeiramente ácidos. Elliott *et al.* (1998) observaram que em pH 3,25 e com lactato como substrato orgânico havia remoção de 38,3% de sulfato do influente e aumento do pH do meio para 5,82, em reatores contínuos de fluxo ascendente inoculados com BRS. O metabolismo do etanol por BRS influencia o pH do meio de acordo com os compostos produzidos pela respiração do sulfato. A oxidação completa de etanol a CO<sub>2</sub> por BRS via redução de sulfato gera alcalinidade no meio. A sua degradação incompleta por esses microrganismos produz ácido acético e sulfeto de hidrogênio. O acúmulo de acetato no sistema altera as condições de pH para valores levemente ácidos. Mizuno *et al.* (1998), observaram a formação de uma fase acidogênica (pH 5,8-6,1) e remoção de sulfato (90%) pela atividade de BRS em sistema batelada com etanol.

A Figura 5.15 apresenta a cinética de remoção de sulfato pela atividade bacteriana, ao longo do período de cultivo. Observou-se que a maior redução do sulfato ocorreu antes das primeiras 50 horas de ensaio, ou seja, durante a fase exponencial de crescimento (ver valores de tempo de crescimento, tabela 5.5), onde a duplicação das bactérias é mais intensa.

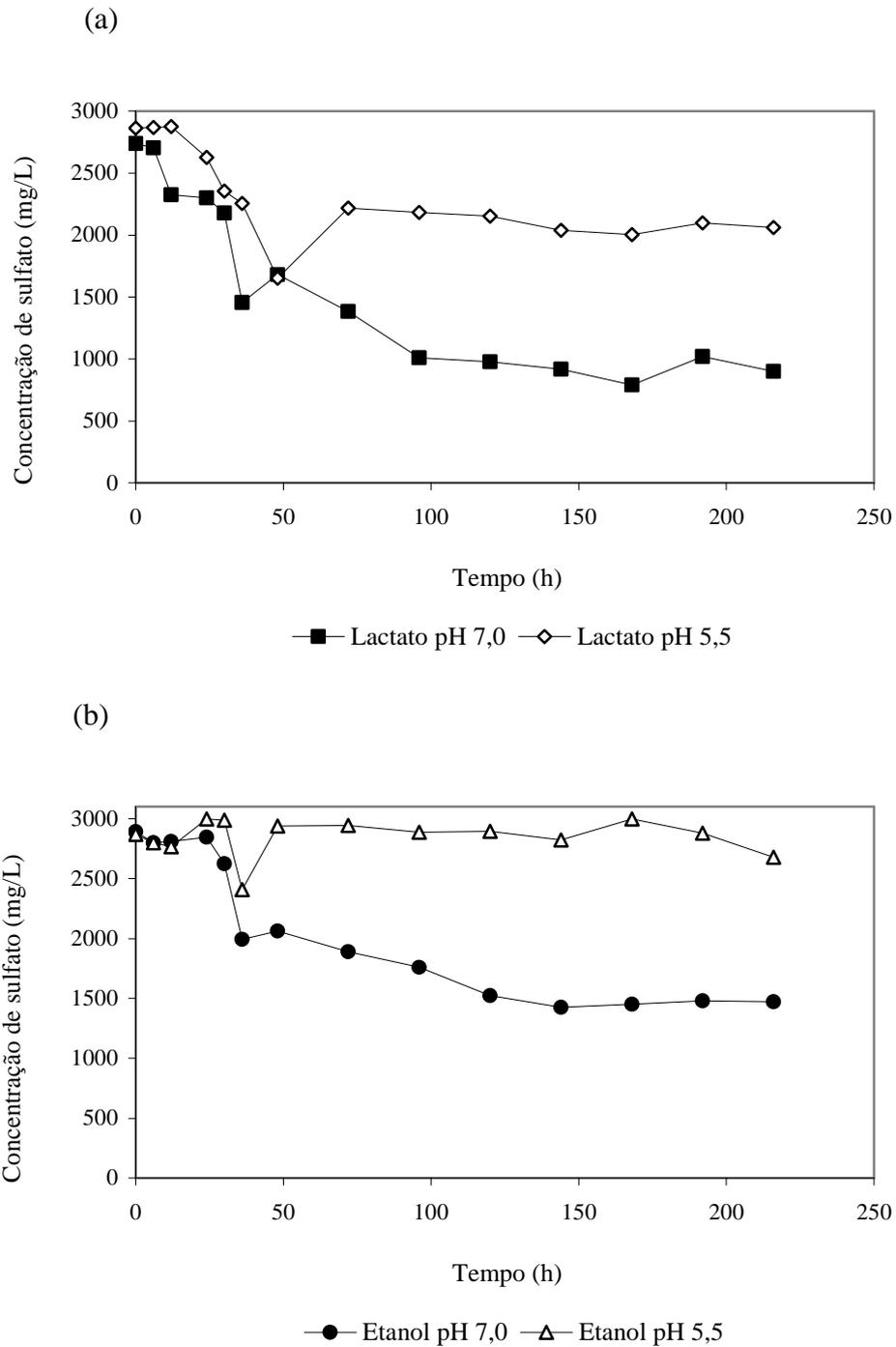


Figura 5.15 - Influência da fonte de carbono e do pH inicial na remoção de sulfato durante o cultivo da amostra LG01: (a) lactato, pH 7,0 e 5,5; (b) etanol, pH 7,0 e 5,5. Concentração inicial de sulfato de  $3000 \text{ mgL}^{-1}$ , a  $35^\circ \text{C}$  e em razão DQO/sulfato igual a 1,0 para lactato e 3,6 para etanol.

O pH é um fator relevante na redução biológica do sulfato. Valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 9,0 tem sido relatado como inibidores para a biorredução de sulfato (Widdel, 1988). Tal fato pode ser confirmado pelos dados apresentados na figura 5.15. Observou-se que as amostras que foram cultivadas em pH neutro (7,0) apresentaram maiores valores de eficiência de remoção de sulfato. Para a cultura LG01 cultivada em lactato, a eficiência de remoção foi de 71%, (1000 mgL<sup>-1</sup> de sulfato na solução residual) enquanto, para o cultivo em etanol, obteve-se uma eficiência de 50% (1500 mgL<sup>-1</sup> de sulfato na solução residual). Quando as culturas foram inoculadas em pH inicial moderadamente ácido (5,5), observou-se uma queda na atividades das BRS, expressa pelos menores valores de eficiência de remoção de sulfato, isto é, 43% (1651 mgL<sup>-1</sup> de sulfato residual) para o cultivo em lactato e 16% (2409 mgL<sup>-1</sup> de sulfato residual) em etanol. Os experimentos realizados por Cao *et al.* (2008) mostraram que a razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e o pH inicial foram importantes parâmetros na atividade das BRS. Em seus estudos, os autores obtiveram melhores taxas de remoção de sulfato para razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 3,0 e pH inicial aproximadamente 7,0, na presença de lactato.

Os resultados apresentados pela cultura mista LG 01 (figura 5.15), em meio de cultivo contendo lactato, confirmou a qualidade desse substrato como fonte de carbono e elétrons no cultivo de BRS e na redução de sulfato (Kaksonen *et al.*, 2004). Contudo, uma eficiência de 50% na remoção de sulfato foi observada pela cultura LG01, em pH 7,0, tendo o etanol como fonte de carbono e elétrons. A utilização desse substrato orgânico para alimentação de reatores em sistema contínuo, em escala industrial, pode promover considerável redução no custo do tratamento do efluente. A utilização de substratos orgânicos menos eficientes energeticamente para BRS pode ser suprida pelo aumento da razão DQO/sulfato no meio (Velasco *et al.*, 2008). Contudo, quando a remoção de sulfato é realizada por comunidades bacterianas mistas, o aumento na concentração do substrato e a diminuição da disponibilidade de aceptores de elétrons podem favorecer a atividade metabólica de microrganismos fermentativos acidogênicos e metanogênicos, comprometendo a eficiência do sistema (Wang *et al.*, 2008).

### **5.3.3 Crescimento da cultura mista UASB01**

A cultura mista UASB01 foi inoculada em meio Postgate C seguindo a mesma metodologia utilizada para a cultura LG01. Porém, nos ensaios conduzidos com etanol, a concentração deste composto foi reduzida para aproximadamente 4,0 gL<sup>-1</sup>, a fim de obter

uma razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de aproximadamente 2,0. O cultivo em razão DQO/sulfato menor favorece a proliferação de espécies de BRS presentes na cultura LG01.

A tabela 5.10 apresenta os parâmetros de crescimento da cultura mista UASB01. Observou-se que o comportamento da cultura UASB01 foi semelhante ao obtido pela cultura LG01, nos ensaios para avaliar a capacidade de redução de sulfato em condições neutras e moderadamente ácidas. As culturas que foram cultivadas em lactato apresentaram melhores resultados de crescimento em condições de pH neutro (7,0) e levemente ácido (5,5), com valores de taxa de crescimento de 23,4x10<sup>5</sup> cel/mL/h e 90,4x10<sup>5</sup> cel/mL/h, e número de gerações iguais a 5,3 e 3,7, respectivamente.

Tabela 5.10 - Parâmetros de crescimento para a cultura de UASB01 em meio Postgate C em valores de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> igual a 1,0 para lactato e 2,0 para etanol, em diferentes condições de pH inicial.

<b>Condição de cultivo (fonte de carbono/pH)</b>	<b>Taxa de crescimento (células/mL/hora)</b>	<b>Número de gerações</b>	<b>Tempo de crescimento (min)</b>
Lactato/ pH=7,0	23,4 x 10 <sup>5</sup>	5,3	27h 17min
Etanol/ pH=7,0	15,3 x 10 <sup>5</sup>	3,6	47h 11min
Lactato/ pH=5,5	90,4 x 10 <sup>5</sup>	3,7	26h 35min
Etanol/ pH=5,5	0,95 x 10 <sup>5</sup>	4,0	42h 07min

Observou-se que o tempo de crescimento para as culturas cultivadas em etanol foi bem maior quando comparado ao crescimento em lactato. A cultura UASB01, em pH 7,0, apresentou maior taxa de crescimento (15,3x10<sup>5</sup> cel/mL/h) em relação a amostra submetida a condições ácidas (pH 5,5) quando o etanol foi utilizado como fonte de carbono (0,95x10<sup>5</sup> cel/mL/h). Como observado nos ensaios com a cultura LG01, em meio levemente ácido e utilizando etanol como fonte de energia, a atividade das BRS não foi favorecida. O tempo de crescimento expressa o crescimento exponencial da cultura, ou seja, o tempo necessário para atingir o número máximo de células durante o crescimento. Observou-se que o tempo de crescimento das culturas UASB01 cultivadas em etanol foi bem superior ao das culturas que utilizaram lactato como substrato. A oxidação do etanol

no metabolismo das BRS promove menor produção de energia por mol de sulfato reduzido, quando comparado ao lactato (Kaksonen *et al.*, 2006).

A variação do pH nos sistemas contendo a cultura UASB01 está exibido na figura 5.16. Observou-se, nas primeiras horas de crescimento da cultura cultivada com lactato em pH neutro, uma diminuição no valor do pH, para aproximadamente 6,2, provavelmente devido a atividade de bactérias fermentativas acidogênicas. Em seguida, o pH estabilizou-se na faixa de neutralidade, entre 7,0 e 7,5, demonstrando atividade de BRS e, portanto, geração de alcalinidade. Porém, quando o etanol foi utilizado como fonte de carbono e elétrons houve diminuição nos valores de pH, quando a cultura foi cultivada em pH inicial neutro (pH 7,0). Em condições iniciais ácidas (pH 5,5), com etanol, o pH estabilizou-se no valor 6,0, não tendo sido detectada a produção de alcalinidade decorrente da degradação do etanol, conforme já descrito por Kaksonen *et al.* (2003).

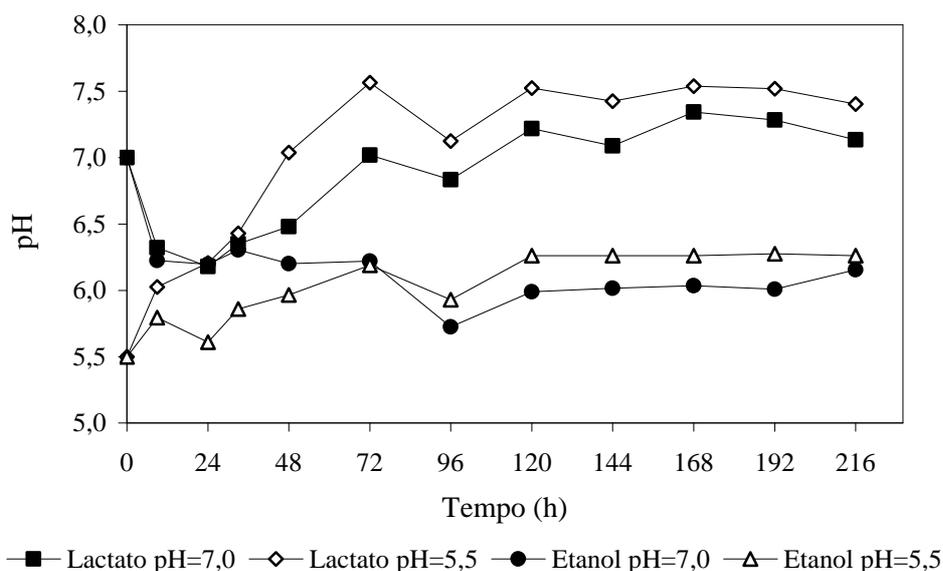
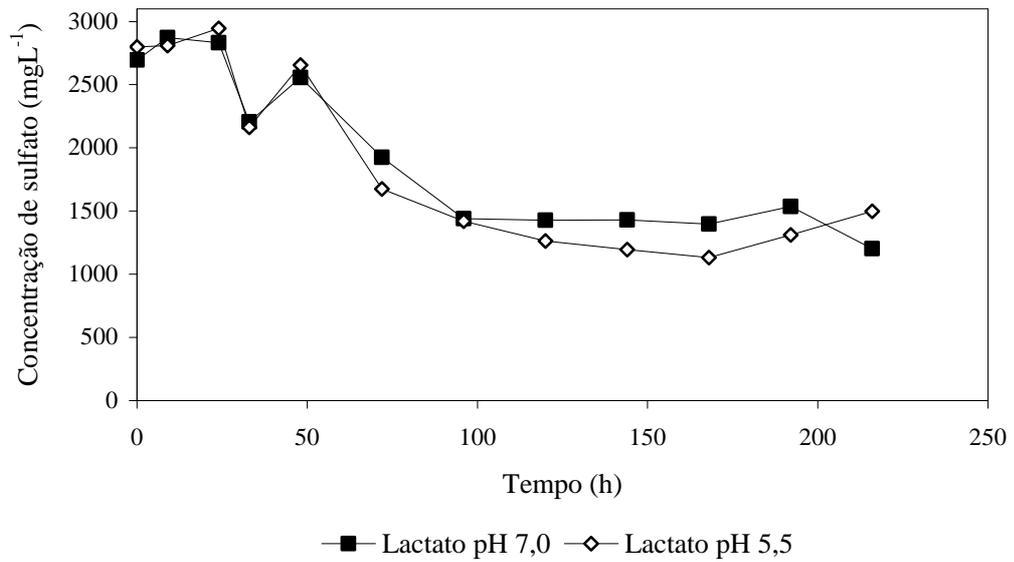


Figura 5.16 - Variação do pH nas culturas UASB01 em diferentes substratos orgânicos (lactato ou etanol) durante 216 horas de cultivo a 35° C.

Pelos resultados exibidos na figura 5.17, observou-se que as culturas UASB01 cultivadas no mesmo substrato apresentaram um perfil semelhante na redução das concentrações do sulfato. Para as culturas inoculadas com lactato, em pH inicial 7,0, a remoção absoluta do sulfato foi de aproximadamente 1500 mgL<sup>-1</sup>, ou seja, 55% de

remoção ( $1227 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato residual). Essa mesma cultura, em pH inicial 5,5, apresentou remoção absoluta de sulfato de  $1660 \text{ mgL}^{-1}$  (59%) e a concentração residual de sulfato no meio foi de  $1158 \text{ mgL}^{-1}$ . A similaridade entre os valores de remoção de sulfato pelas culturas UASB01 em diferentes valores de pH inicial em meio contendo lactato pode estar relacionado com a geração de alcalinidade. Em aproximadamente 48 horas de cultivo da cultura UASB01, o pH inicial 5,5 foi alterado para valores próximos a 7,0. A geração de alcalinidade está relacionada com a oxidação bacteriana do lactato a partir da redução dissimilativa do sulfato (Liamleam e Annachhatre, 2007). Para as culturas que utilizaram o etanol como substrato, a remoção de sulfato foi de aproximadamente  $700 \text{ mgL}^{-1}$  (25% de remoção) em pH 5,5 e 7,0. Estes baixos valores de eficiência de remoção obtidos pela cultura UASB01 corroboram com os resultados anteriores (Figura 5.12 – Meio Postgate C), onde o crescimento e a redução de sulfato das culturas mistas de BRS utilizando etanol como fonte de elétrons e carbono não foram favorecidos.

(a)



(b)

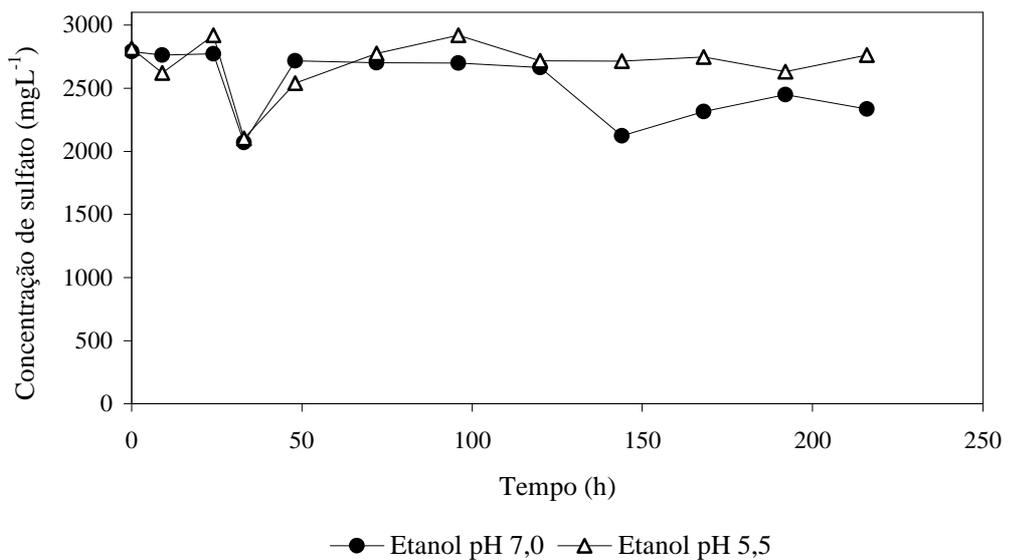


Figura 5.17 - Influência da fonte de carbono e do pH inicial na remoção de sulfato durante cultivo da amostra UASB01: (a) lactato, pH 7,0 e 5,5; (b) etanol, pH 7,0 e 5,5. Concentração inicial de sulfato de  $3000 \text{ mgL}^{-1}$ , a  $35^\circ \text{C}$  e em razão DQO/sulfato igual a 1,0 para lactato e 2,0 para etanol.

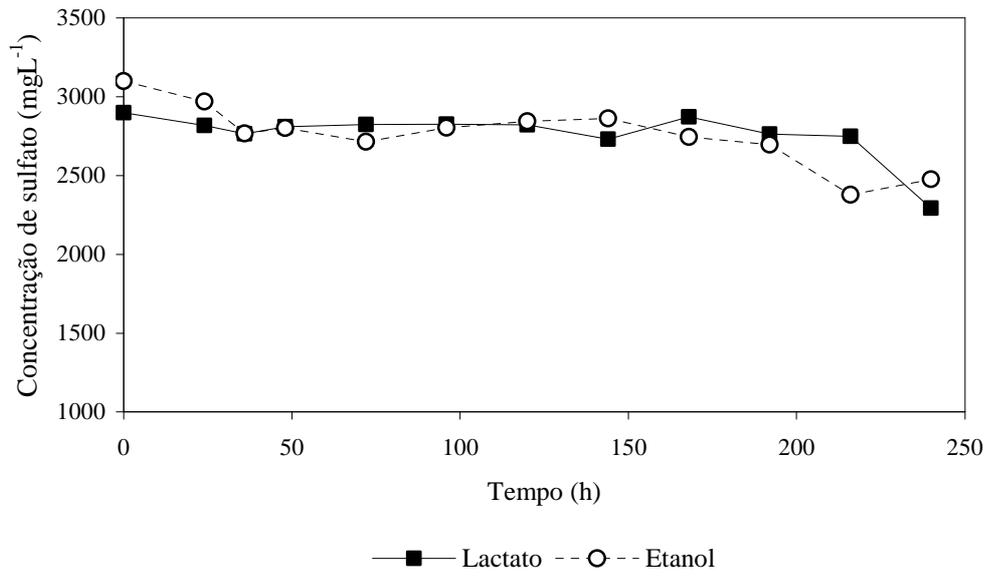
#### 5.4 Remoção biológica de sulfato em razão DQO/sulfato teórica ótima

As culturas mistas LG01 e UASB01 foram avaliadas quanto à remoção biológica de sulfato em meio Postgate C em condições neutras, utilizando lactato ou etanol como substratos orgânicos, a uma razão DQO/sulfato igual a 0,67. Essa é a razão DQO/sulfato teórica considerada ideal, porque nessa concentração todo o substrato orgânico é metabolizado pela célula a dióxido de carbono via redução dissimilativa de sulfato, de acordo com a equação 5.3:



A figura 5.18 exhibe as cinéticas de remoção de sulfato pelas culturas LG01 e UASB01 em diferentes substratos orgânicos em razão DQO/sulfato 0,67.

(a)



(b)

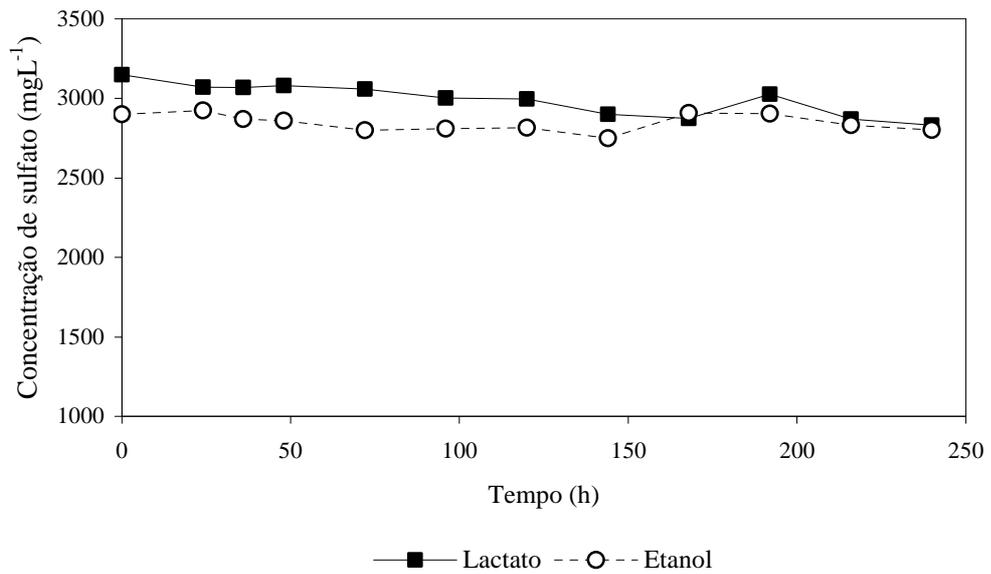


Figura 5.18 - Remoção biológica de sulfato em meio Postgate C, em condições neutras e diferentes substratos orgânicos, com razão DQO/sulfato 0,67. (a) Cultura LG01 e (b) cultura UASB01.

Os resultados de remoção de sulfato pelas culturas LG01 e UASB01 na razão DQO/sulfato 0,67 foram muito abaixo do consumo de sulfato esperado. A cultura LG01 foi responsável pelo consumo de  $608 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato (21%) em lactato e  $494 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato (17%) em etanol. A cultura UASB01 apresentou resultados ainda menos satisfatórios, sendo responsável pela remoção de  $240 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato (10%) em lactato e  $150 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato (5%) em etanol. O crescimento das culturas bacterianas também não foi favorecido nessa razão DQO/sulfato. O número de células produzidas pela cultura LG01 em lactato foi de  $1,2 \times 10^8$  células/mL e em etanol a produção celular foi de  $1,8 \times 10^8$  células/mL. A cultura UASB01 produziu  $1,7 \times 10^8$  células/mL em lactato e  $7,5 \times 10^7$  células/mL em etanol.

O baixo consumo de sulfato pelas culturas avaliadas na razão DQO/sulfato 0,67 pode estar relacionado com o metabolismo incompleto dos substratos orgânicos. Madigan *et al.* (2004) descreveram um grupo de BRS capaz de oxidar incompletamente substratos orgânicos de baixo peso molecular, como lactato e etanol, no metabolismo dissimilativo de sulfato. Dessa forma, apenas parte do sulfato disponível é utilizado como aceptor de elétrons na respiração anaeróbia, havendo produção de acetato como intermediário metabólico. Oluwaseun *et al.* (2009) observaram que a remoção de sulfato por BRS foi menor em razão DQO/sulfato 1,0, quando comparada com razões DQO/sulfato maiores, tendo o lactato como substrato orgânico. Velasco *et al.* (2008) mostraram que, na razão DQO/Sulfato 0,67 com etanol como substrato orgânico, a remoção de sulfato foi de 38% ( $570 \text{ mgL}^{-1}$  de sulfato) em reator UASB, com acúmulo de acetato no reator. Kaksonen *et al.* (2004) obtiveram resultados melhores de remoção de sulfato (60% de remoção) nessa razão DQO/sulfato com etanol, em concentração inicial de sulfato de  $2000 \text{ mgL}^{-1}$ , com culturas de BRS capazes de oxidar completamente etanol a  $\text{CO}_2$ .

Os valores de crescimento bacteriano das culturas LG01 e UASB01 nessas condições indicam uma importante influência do substrato orgânico na produção celular. As culturas LG01 e UASB01 apresentaram maiores valores de remoção de sulfato quando cultivadas em lactato que em etanol, contudo o número de células produzidas pelas culturas nesses substratos orgânicos foi similar. Isso sugere o desenvolvimento de outros grupos microbianos além das BRS. Nas condições de cultivo proposta e com etanol como fonte de energia e carbono, bactérias metanogênicas podem competir por esse substrato com BRS. Espécies de bactérias metanogênicas são capazes de fermentar etanol em metano nos processos de produção de energia celular. Schink (1997) descreveu vários

gêneros de metanogênicas capazes de competir com as BRS por etanol como substrato em condições anaeróbias. Quando o lactato está disponível no meio, o crescimento de BRS é favorecido porque bactérias metanogênicas não utilizam esse substrato durante seu metabolismo. Há competição entre BRS e bactérias metanogênicas pelos produtos intermediários do metabolismo do lactato como acetato e H<sub>2</sub> (Oremland e Polcin, 1982).

## **5.5 Cinética de remoção biológica de sulfato em diferentes razões**

### **DQO/sulfato**

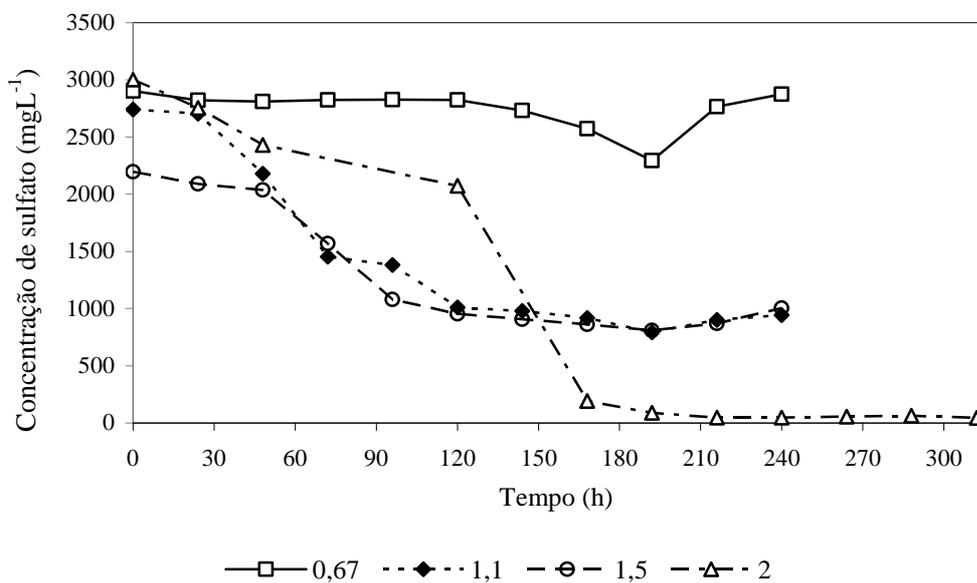
A cultura mista LG01 foi submetida a variadas razões DQO/sulfato a fim de selecionar uma condição ideal para o crescimento e o consumo de sulfato. Essa cultura foi cultivada em meio Postgate C (Cabrera *et al.*, 2006), em pH 7,0, utilizando-se lactato nas razões DQO/sulfato iguais a 0,67, 1,1, 1,5 e 2,0; e etanol, com razões DQO/sulfato de 0,67, 1,6, 2,0 e 3,6. As metodologias de inoculação e cultivo foram as mesmas descritas no item anterior. A cultura LG01 foi selecionada para esses ensaios por apresentar melhores resultados de remoção de sulfato dentre as culturas avaliadas e nas condições estudadas.

### **5.5.1 Cinética de remoção biológica de sulfato utilizando lactato como substrato orgânico**

Os valores de remoção de sulfato pela cultura LG01 com lactato em diferentes razões DQO/sulfato estão descritos na figura 5.19. De acordo com os resultados apresentados na figura 5.19, a concentração de lactato disponível no meio foi fundamental para a remoção biológica de sulfato. A diminuição na concentração de sulfato residual com o aumento da razão DQO/sulfato (tabela 5.11) sugere a atividade biológica predominante de BRS acetogênicas, incapazes de degradar lactato completamente a CO<sub>2</sub>.

(a)

### Consumo de sulfato em meio contendo lactato



(b)

### Crescimento bacteriano em meio contendo lactato

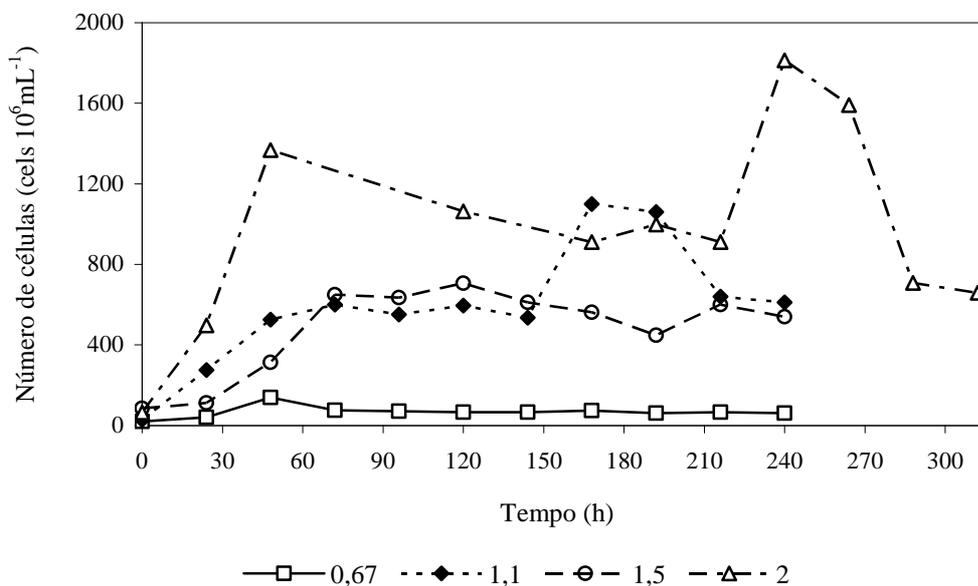


Figura 5.19 - Efeitos da razão DQO/sulfato no consumo de sulfato e no crescimento bacteriano da cultura LG1 em sistema batelada com meio Postgate C contendo lactato a 35°C. (a) Consumo biológico de sulfato e, (b) crescimento bacteriano. Símbolos: razão DQO/sulfato (□) 0,67, (◆) 1,1, (○) 1,5 e (△) 2,0.

Tabela 5.11 - Eficiência de remoção absoluta de sulfato e taxa de crescimento da cultura LG01 em meio contendo lactato em diferentes razões DQO/sulfato.

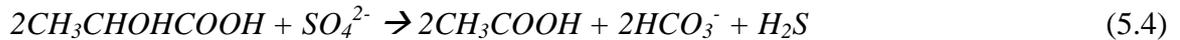
DQO/sulfato	Concentração de sulfato removido (mgL <sup>-1</sup> )	Concentração de sulfato residual (mgL <sup>-1</sup> )	Taxa de remoção de sulfato (mgL <sup>-1</sup> /dia)	Taxa de crescimento (células.mL <sup>-1</sup> /dia)
<b>0,67</b>	608	2290	60,8	28,7 x 10 <sup>6</sup>
<b>1,1</b>	1946	792	278	15,3 x 10 <sup>7</sup>
<b>1,5</b>	1391	807	174	12,4 x 10 <sup>7</sup>
<b>2,0</b>	2986	73	271	78,6 x 10 <sup>7</sup>

O aumento na razão DQO/sulfato influenciou a remoção biológica de sulfato pela cultura LG01 com lactato como principal fonte de energia e carbono. Nos valores de DQO/sulfato igual a 0,67, a cultura LG01 apresentou os menores resultados de remoção de sulfato (608 mgL<sup>-1</sup>) e de produção de biomassa bacteriana (28,7x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>/dia). A alta concentração de sulfato residual (2290 mgL<sup>-1</sup>) nessa condição indica o predomínio de espécies de BRS incapazes de metabolizar o lactato completamente a CO<sub>2</sub> na respiração anaeróbia do sulfato. A seleção dessas espécies de BRS na cultura LG01 pode ter ocorrido devido aos repiques sucessivos, aos quais as culturas foram submetidas previamente, utilizando-se meio de cultivo contendo lactato como principal substrato orgânico.

O consumo biológico de sulfato aumentou proporcionalmente ao aumento da relação lactato/sulfato inicial. Em razão DQO/sulfato 1,1 e 1,5, os valores de remoção absoluta de sulfato foram de 1946 mgL<sup>-1</sup> (71%) e 1391 mgL<sup>-1</sup> (63%), respectivamente. Os maiores valores de consumo de sulfato e crescimento bacteriano da cultura LG01 foram observados em razão DQO/sulfato igual a 2,0. Nessa razão, a concentração de sulfato removido foi de 2986 mgL<sup>-1</sup> (98%), a concentração residual de sulfato foi de 73 mgL<sup>-1</sup> e a taxa de crescimento igual a 78,6x10<sup>7</sup> celsmL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

A remoção quase completa de sulfato em razão DQO/sulfato 2,0 reforça a tendência de redução dissimilativa de sulfato via oxidação incompleta de lactato pelas espécies de BRS presentes na cultura LG01. Segundo a equação 5.4, na oxidação incompleta do

lactato, 2 moles de lactato (180 g) são necessários para a redução biológica de um mol de sulfato (96 g), com produção de 2 moles de acetato e 1 mol de sulfeto.



Nessa condição, a concentração de lactato foi de  $6,0 \text{ gL}^{-1}$ , com DQO teórica igual a  $6,32 \text{ g}$  de  $O_2L^{-1}$  e a concentração inicial de sulfato igual a  $3,06 \text{ gL}^{-1}$ . Dessa forma, a concentração de lactato disponível favoreceu a transferência de elétrons na célula para redução de quase todo o sulfato disponível no meio. Wang *et al.* (2008) observaram a remoção de 96,4% de sulfato em sistema batelada por cultura mista de BRS em razão DQO/sulfato 1,6. El Bayoumy *et al.* (1999) sugeriram que uma razão DQO/sulfato entre 1,5 e 2,25 era o bastante para conseguir uma alta eficiência de remoção de sulfato quando o lactato ou acetato eram utilizados como fonte de carbono e elétrons.

A figura 5.20 exhibe as concentrações dos metabólitos orgânicos intermediários gerados a partir do consumo do lactato pela cultura LG01. Foram realizadas análises dos possíveis ácidos orgânicos (fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico,) formados ao longo da decomposição do lactato. Os ácidos orgânicos detectados foram o ácido isobutírico ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ), o ácido butírico ( $60 \text{ mgL}^{-1}$ ) e o ácido acético ( $1800 \text{ mgL}^{-1}$ ). A ausência de ácido propiônico nas análises indica a ausência de fermentação do lactato por bactérias fermentativas, sugerindo que nessa concentração de sulfato a proliferação de espécies de BRS são favorecidas na cultura.

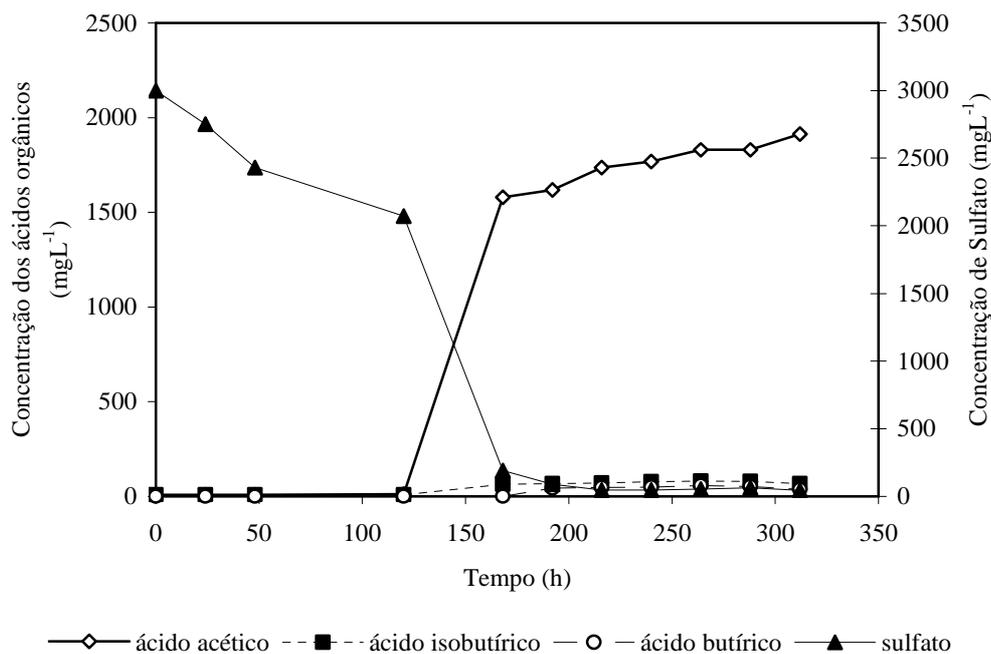


Figura 5.20 - Variação da concentração de ácidos orgânicos durante a degradação de lactato e redução de sulfato por BRS em razão DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 2,0 e a 35° C pela cultura LG01.

Alta concentração de ácido acético foi observada no meio de cultivo ao longo do experimento. O aumento na concentração de acetato durante o consumo de sulfato confirma a hipótese que o lactato disponível foi oxidado incompletamente a acetato durante a redução dissimilativa de sulfato pelas espécies de BRS da cultura LG01. Além disso, o acúmulo de acetato no meio indica a predominância de espécies de BRS acetogênicas. De acordo com a figura 5.20, o período de maior produção de acetato coincide com o período de maior consumo de sulfato. Todavia, considerando a estequiometria de reação, a oxidação de todo o lactato do meio de cultivo a acetato via redução de sulfato produziria 4,0 gL<sup>-1</sup> de acetato, ou seja, o dobro do valor quantificado. Provavelmente, parte desse acetato produzido foi utilizada como fonte de energia e carbono por outros grupos microbianos (por exemplo, bactérias metanogênicas) possivelmente presentes na cultura LG01 (McInerney *et al.*, 2008). A figura 5.19b exibe um segundo pico de crescimento para a cultura LG01 em razão DQO/sulfato 2,0, entre o período de 210 – 240 horas de cultivo. A alta proliferação celular nesse intervalo de tempo não é promovida pela respiração anaeróbia do sulfato, devido a estabilização no consumo desse ânion, como observado na figura 5.19a. Esses resultados fortalecem a

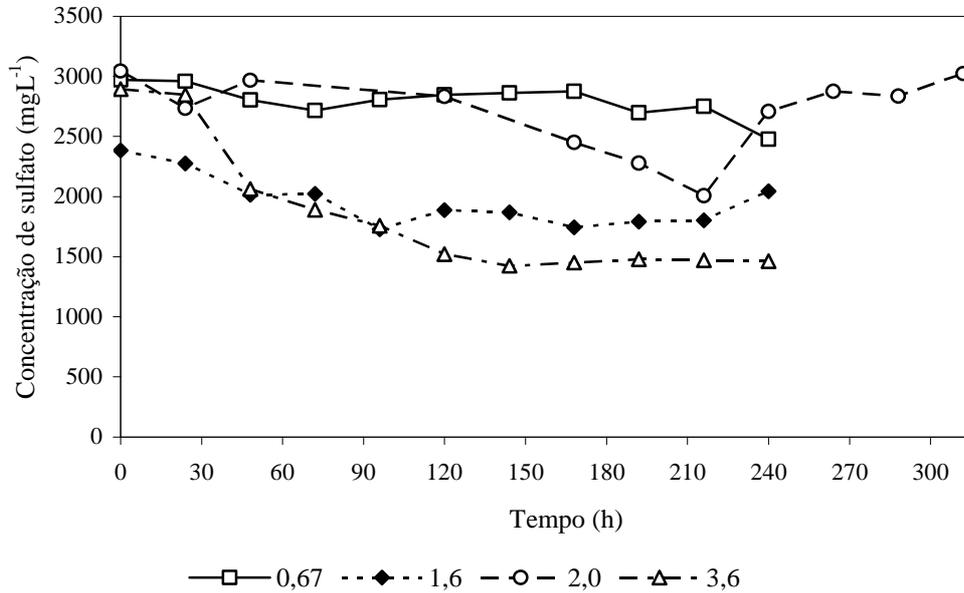
hipótese relacionada com a presença de bactérias acetoclásticas não redutoras de sulfato na cultura LG01.

### **5.5.2 Cinética de remoção biológica de sulfato utilizando-se etanol como substrato orgânico**

A figura 5.21 exibe o efeito das diferentes razões DQO/sulfato na concentração de sulfato e no crescimento bacteriano da cultura LG01 com etanol como substrato orgânico. Estes resultados indicam que o aumento da razão DQO/sulfato favoreceu a remoção biológica de sulfato e a produção de biomassa da cultura LG01 quando o etanol é utilizado como fonte de energia.

(a)

### Consumo de sulfato em meio contendo etanol



(b)

### Crescimento bacteriano em meio contendo etanol

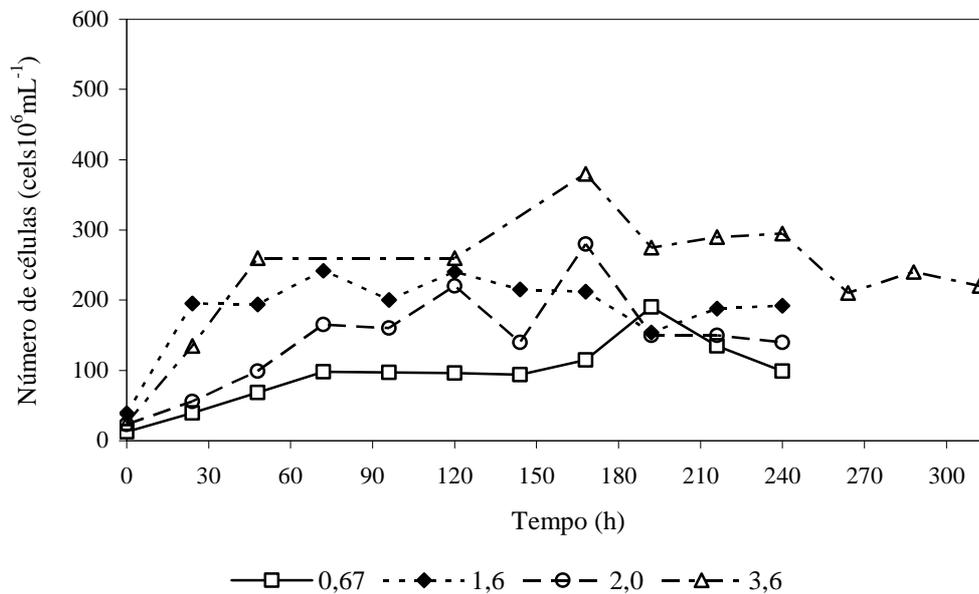


Figura 5.21 - Efeitos da razão DQO/sulfato no consumo de sulfato e no crescimento bacteriano da cultura LG1 em sistema batelada em meio Postgate C contendo etanol a  $35^\circ\text{C}$ . (a) Consumo biológico de sulfato e, (b) crescimento bacteriano. Símbolos: razão DQO/sulfato ( $\square$ ) 0,67, ( $\blacklozenge$ ) 1,6, ( $\circ$ ) 2,0 e ( $\triangle$ ) 3,6.

O consumo de sulfato e o crescimento bacteriano da cultura LG01 foram favorecidos de acordo com o aumento na razão DQO/sulfato na presença de etanol (tabela 5.12). Em razão DQO/sulfato igual a 0,67, a remoção absoluta de sulfato foi de 384 mgL<sup>-1</sup> (13%) e a taxa de crescimento 22,2x10<sup>6</sup> cels.mL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Essa é a razão estequiométrica teórica para oxidação completa do etanol a CO<sub>2</sub> via redução bacteriana do sulfato. Quando a razão DQO/sulfato aumentou para 3,6, a concentração de sulfato removido foi de 1442 mgL<sup>-1</sup> (50%) e a taxa de crescimento igual a 38,6x10<sup>6</sup> cels.mL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. A baixa remoção de sulfato pela cultura LG01 pode estar relacionada com a presença de BRS capazes de oxidar incompletamente o etanol a acetato ou com a competição interespecífica entre BRS e outros grupos bacterianos que metabolizam etanol. O cultivo de consórcios bacterianos em condições anaeróbias com etanol favorece o desenvolvimento de bactérias acidogênicas fermentativas, BRS e metanogênicas (McInerney *et al.*, 2008). A complexa relação entre esses grupos microbianos dificulta o estabelecimento de uma razão DQO/sulfato padrão para uma completa remoção biológica de sulfato quando etanol está disponível como único substrato orgânico. Velasco *et al.* (2008) obtiveram remoção de sulfato de 94% (1410 mgL<sup>-1</sup>) em uma razão DQO/sulfato igual a 2,5, Wang *et al.* (2008) observaram a remoção de 99,6% de sulfato em sistema batelada com concentração inicial de 742 mgL<sup>-1</sup> de sulfato em razão DQO/sulfato 5,6 e Hirasawa *et al.* (2008) observaram que em razão DQO/sulfato 3,0, a remoção de sulfato foi de 92%, com concentração inicial de 370 mgL<sup>-1</sup>, em reator UASB, com etanol como fonte de elétrons e carbono.

Tabela 5.12 - Eficiência de remoção absoluta de sulfato e taxa de crescimento da cultura LG01 em meio contendo etanol em diferentes razões DQO/sulfato.

DQO/Sulfato	Concentração de sulfato removido (mgL <sup>-1</sup> )	Concentração de sulfato residual (mgL <sup>-1</sup> )	Taxa de remoção de sulfato (mgL <sup>-1</sup> /dia)	Taxa de crescimento (células.mL <sup>-1</sup> /dia)
<b>0,67</b>	384	2716	38,4	22,2 x 10 <sup>6</sup>
<b>1,6</b>	638	1746	91,1	40,2 x 10 <sup>6</sup>
<b>2,0</b>	1038	2007	115,3	35,2 x 10 <sup>6</sup>
<b>3,6</b>	1442	1450	206	38,6 x 10 <sup>6</sup>

A análise dos metabólitos orgânicos intermediários do metabolismo do etanol pela cultura LG01 em razão DQO/sulfato 2,0 revelou apenas a presença de acetato. Todavia, a concentração máxima de acetato detectada foi de apenas 25,3 mgL<sup>-1</sup>. Após 200 horas de cultivo, todo o acetato produzido foi consumido pelas bactérias presentes na cultura LG01. De acordo com a figura 5.21a, observou-se a queda na concentração de sulfato no período entre 120 – 210 horas de cultivo. Nesse intervalo, o etanol disponível e o acetato produzido parecem ser os substratos orgânicos utilizados no metabolismo dissimilativo do sulfato pelas BRS da cultura LG01. Contudo, a baixa remoção de sulfato pela cultura LG01 em meio contendo etanol indicou a presença de competição entre BRS, bactérias metanogênicas e fermentativas acetogênicas. A presença desses grupos bacterianos pode ser estimada pela proliferação de células, independentes ao consumo de sulfato, ao longo do cultivo. O crescimento de outros grupos de bactérias anaeróbias em cultivo misto com BRS em meio contendo etanol foi descrito por outros autores. Schink (1997) observou a prevalência de bactérias metanogênicas sobre BRS quando culturas mistas foram cultivadas em condições anaeróbias em meio contendo etanol. Lens *et al.* (1998) relataram que a oxidação de acetato a CO<sub>2</sub> em culturas mistas de BRS estava associada principalmente a atividade de bactérias metanogênicas, mesmo em baixos valores de razão DQO/sulfato.

## **5.6 Crescimento de BRS em meios contendo metais**

### **5.6.1 Seleção de culturas de BRS tolerantes a metais**

As culturas LG01, LG02, UASB01 e UASB02 foram inoculadas em meio de cultivo Postgate C “modificado” em presença dos metais níquel, cobre e manganês. Soluções padrão de sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ), cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e manganês ( $\text{MnSO}_4$ ) foram usadas para obter a concentração dos cátions avaliados:  $\text{Ni(II)}$  -  $20 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $\text{Cu(II)}$  -  $10 \text{ mgL}^{-1}$  e  $\text{Mn(II)}$  -  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . O crescimento e a produção de sulfeto dessas culturas foram avaliados em diferentes condições (substrato orgânico e pH inicial), durante o período de sete dias. O meio Postgate C “modificado” foi utilizado no cultivo dessas culturas em presença de metais. Esse meio de cultura foi empregado com sucesso por Cheung e Gu (2003) para enriquecer e isolar consórcios de BRS presentes em sedimentos contaminados com metais pesados. A presença do quelante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) no meio de cultura garante a manutenção da solubilidade dos metais níquel, cobre e manganês em pH neutro, permitindo o contato entre os microrganismos e/ou seus metabólitos com o complexo EDTA-metal. O quelante EDTA também foi empregado nos experimentos realizados em pH 5,5, para evitar possíveis erros experimentais e a influência desse composto no desenvolvimento de BRS. Os inóculos enriquecidos foram filtrados em membrana Milipore (diâmetro do poro de  $0,45 \mu\text{m}$ ) e lavados com solução salina estéril para evitar a interferência de sulfeto de hidrogênio, proveniente do inóculo enriquecido, na precipitação e conseqüente diminuição da concentração inicial dos metais nos meios de cultura. Os resultados de crescimento e produção de sulfeto por BRS estão apresentados na tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Crescimento de culturas de BRS na presença de metais pesados (20 mgL<sup>-1</sup> níquel, 10 mgL<sup>-1</sup> cobre e 10 mgL<sup>-1</sup> manganês) em diferentes substratos orgânicos e pH.

Amostra	Substrato orgânico	pH	Crescimento Bacteriano	
			Presença de metais pesados	Ausência de metais pesados (controle)
LG01	Lactato	7,0	+	+
LG01	Lactato	5,5	-	+
LG01	Etanol	7,0	+	+
LG01	Etanol	5,5	-	+
LG02	Lactato	7,0	+	+
LG02	Lactato	5,5	-	+
LG02	Etanol	7,0	+	+
LG02	Etanol	5,5	+	+
UASB01	Lactato	7,0	+	+
UASB01	Lactato	5,5	+	+
UASB01	Etanol	7,0	+	+
UASB01	Etanol	5,5	-	+
UASB02	Lactato	7,0	+	+
UASB02	Lactato	5,5	-	+
UASB02	Etanol	7,0	+	+
UASB02	Etanol	5,5	-	+

(+) – Crescimento bacteriano com formação de sulfeto ferroso.

(-) – Crescimento bacteriano sem formação de sulfeto ferroso.

Os resultados de crescimento bacteriano e produção de sulfeto das culturas provenientes da Lagoa do Gambá (LG01 e LG02) e dos reatores UASB (UASB01 e UASB02) na presença de metais apresentados na tabela 5.13 mostraram a capacidade das espécies presentes nessas culturas tolerarem as concentrações de metais avaliadas. Além disso, a técnica de inoculação por filtração em membrana pareceu ser viável para o cultivo

de BRS em meios de cultura contendo metais pesados. Essa técnica também foi utilizada por Cabrera *et al.* (2006) no cultivo de espécies de BRS em presença de concentrações variadas de metais pesados. Em condições moderadamente ácidas (pH 5,5), apenas as culturas LG02 (etanol) e a cultura UASB01 (lactato) foram capazes de crescer e consumir sulfato. Todas as culturas controles cresceram e consumiram sulfato, indicando que as condições de cultivo e a inoculação em membrana foram técnicas viáveis para avaliar a influência dos metais Ni, Cu e Mn no metabolismo do sulfato por BRS. Esses resultados indicam a possibilidade de utilizar culturas de BRS para remover sulfato e metais dissolvidos em meio de cultura em sistema batelada.

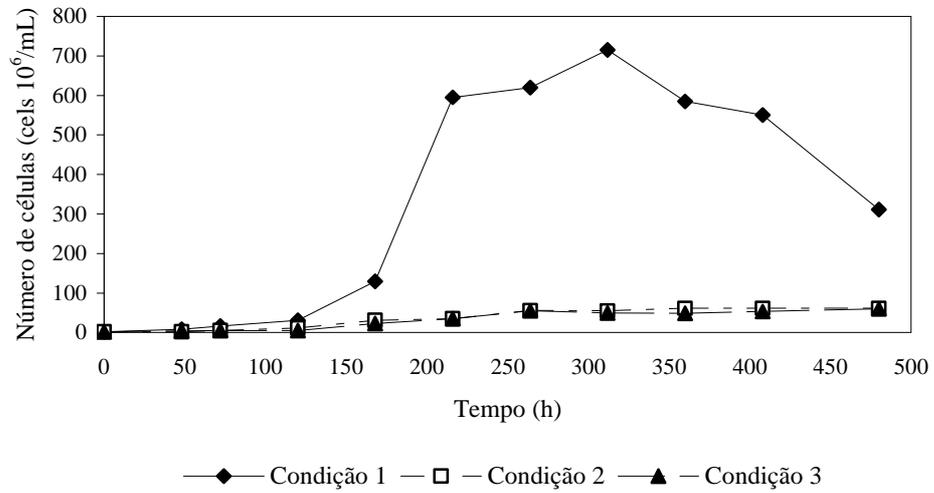
### **5.6.2. Remoção de sulfato e precipitação de metais pesados por BRS**

De acordo com os resultados exibidos de crescimento e produção de sulfeto pelas culturas de BRS na presença de metais, foram realizados ensaios para avaliar a eficiência de remoção de sulfato, o crescimento bacteriano e a concentração de metais dissolvidos remanescentes no meio após o período de cultivo. A cultura mista LG01 foi selecionada por apresentar os melhores resultados de remoção de sulfato e crescimento bacteriano dentre as culturas estudadas, além de tolerar a presença de metais dissolvidos. O meio de cultura selecionado foi o meio Postgate C (Cabrera *et al.*, 2006), contendo lactato ou etanol em razão DQO/sulfato 2,0, em pH 7,0, nas seguintes concentrações de metais: cobre - 10 e 25 mgL<sup>-1</sup>, manganês - 10 e 25 mgL<sup>-1</sup> e níquel - 20 e 50 mgL<sup>-1</sup>. Estes valores de concentração dos metais excedem em mais de dez vezes o permitido para seu lançamento em corpos hídricos, como estabelecido pela resolução CONAMA nº 357/05, e foram definidos com o objetivo de avaliar a capacidade da cultura de BRS LG01 tolerar variadas concentrações de metais reduzindo sulfato. A concentração de metais dissolvidos no meio foi determinada ao longo do tempo de cultivo para se observar a remoção desses metais pela cultura LG01. A diminuição no teor de metais em solução observada durante o cultivo de BRS pode ser explicada por três diferentes mecanismos que podem acontecer isoladamente ou em conjunto, são eles: adsorção dos metais na superfície da célula ou em substâncias exopolissacarídicas (EPS) por elas produzidas e secretadas; pela sua bioacumulação no interior da célula (Kim *et al.*, 2007) e pela precipitação dos metais com o sulfeto produzido no metabolismo do sulfato gerando sulfetos metálicos insolúveis (Widdell, 1988).

A figura 5.22 apresenta o perfil de crescimento da cultura LG01 em meio de cultivo em três diferentes condições, nas quais se variou a concentração de metais: condição 1 – meio de cultivo sem metais (controle); condição 2 – meio de cultivo com metais dissolvidos em concentrações iniciais de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de Cu,  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de Mn e  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Ni e; condição 3 – meio de cultivo com metais dissolvidos em concentrações iniciais de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Cu,  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Mn e  $50 \text{ mgL}^{-1}$  de Ni. O crescimento da cultura LG01 no meio Postgate C contendo lactato ou etanol como substrato orgânico sofreu influência dos metais dissolvidos. O comportamento observado na presença dos metais estudados exibe uma alteração no período de crescimento das culturas. Nas condições 2 e 3, o intervalo correspondente a fase lag do perfil de crescimento dessas culturas aumentou, quando comparada a fase lag da condição 1 (controle). A produção de células (figura 5.13) e o número de gerações (tabela 5.14) também foram influenciados pela presença de metais dissolvidos no meio. Nessas concentrações de metais, a alteração no perfil de crescimento apresentado pela cultura LG01 foi semelhante, mesmo com diferentes substratos orgânicos disponíveis (lactato ou etanol).

(a)

### Crescimento bacteriano em meio contendo lactato



(b)

### Crescimento bacteriano em meio contendo etanol

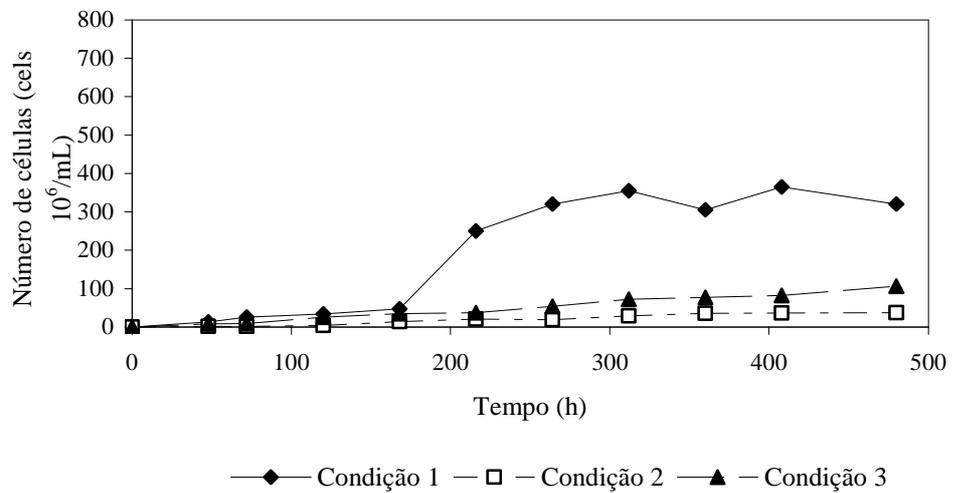


Figura 5.22 - Perfil de crescimento da cultura LG01 em meio Postgate C, em pH 7,0, em diferentes concentrações dos metais cobre, manganês e níquel (condições 1, 2 e 3) e em diferentes substratos orgânicos, (a) lactato e (b) etanol.

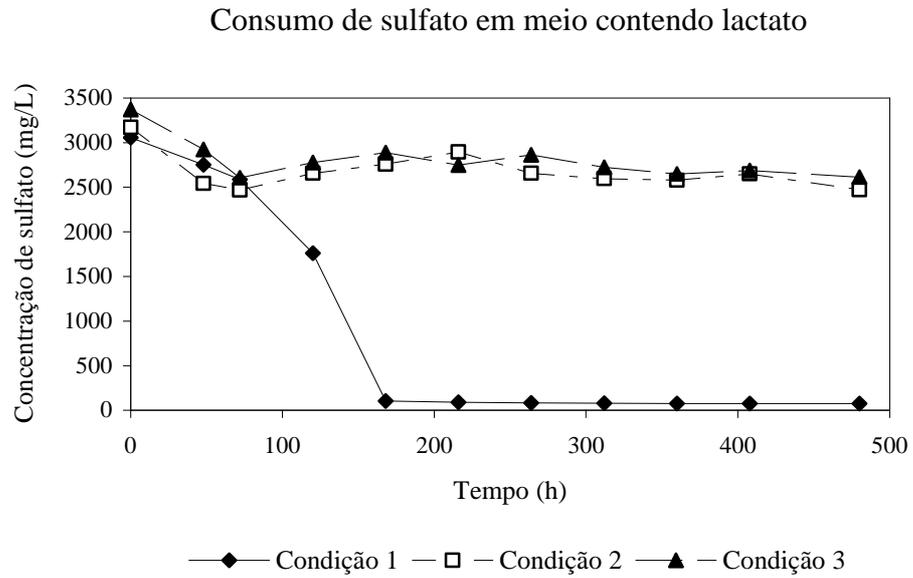
De acordo com os valores apresentados na tabela 5.14, observou-se que a produção de células da cultura LG01 diminui com o aumento na concentração de metais dissolvidos no meio. Em lactato, a cultura LG01 produziu 6,4 gerações e a taxa de crescimento foi de  $32,7 \times 10^5$  células/mL/hora na condição 1; 5,4 gerações e taxa de crescimento de  $1,93 \times 10^5$  células/mL/hora na condição 2 e; 4,8 gerações e taxa de crescimento de  $0,824 \times 10^5$  células/mL/hora na condição 3. Quando cultivadas com etanol, o crescimento da cultura LG01 foi de 4,7 gerações e taxa de crescimento de  $13,3 \times 10^5$  células/mL/hora na condição 1; 4,2 gerações e taxa de crescimento de  $1,3 \times 10^5$  células/mL/hora na condição 2 e; 3,7 gerações e taxa de crescimento de  $2,25 \times 10^5$  células/mL/hora na condição 3. Esses resultados indicam que o aumento na concentração de metais pesados dissolvidos no meio de cultivo contendo lactato ou etanol interfere, de forma marcante, o desenvolvimento das bactérias da cultura LG01. Esses resultados corroboram com os observados em outros trabalhos. Hao *et al.* (1996) estudaram a concentração tóxica de alguns metais para uma cultura mista de BRS e observaram que a concentração de toxicidade estava entre 4 e  $20 \text{ mgL}^{-1}$  para o cobre e entre 10 a  $20 \text{ mgL}^{-1}$  para o níquel. Cabrera *et al.* (2006) relataram a diminuição na produção celular e aumento na fase lag do perfil de crescimento de *Desulfovibrio vulgaris* quando a concentração de cobre no meio aumentava de 0,9 para  $9,0 \text{ mgL}^{-1}$ .

Tabela 5.14 - Parâmetros de crescimento para a cultura LG01 em meio Postgate C na presença de metais: condição (1) – controle sem metais; condição 2 - concentrações iniciais de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de Cu,  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de Mn e  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Ni e; condição 3 - concentrações iniciais de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Cu,  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de Mn e  $50 \text{ mgL}^{-1}$  de Ni.

Concentração de metais/ Fonte de carbono	Número de Gerações	Taxa de crescimento (cels.mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] consumido (mgL <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)
Condição 1/ Lactato	6,4	$32,7 \times 10^5$	2986	98%
Condição 2/ Lactato	5,4	$1,93 \times 10^5$	704	22%
Condição 3/Lactato	4,8	$0,824 \times 10^5$	764	23%
Condição 1 /Etanol	4,7	$13,3 \times 10^5$	1038	35%
Condição 2/Etanol	4,2	$1,30 \times 10^5$	352	12%
Condição 3/Etanol	3,7	$2,25 \times 10^5$	698	20%

A presença de metais dissolvidos no meio de cultivo também influenciou a atividade biológica de remoção de sulfato pelas bactérias da cultura LG01. A figura 5.23 apresenta a cinética de remoção de sulfato pela cultura LG01 nas condições citadas (condições 1, 2 e 3). A mudança nas concentrações de metais, alterando da condição 2 para a condição 3, não promoveu uma interferência acentuada nos valores de sulfato removido pelas bactérias da cultura LG01. De acordo com os resultados exibidos na tabela 5.14, as culturas apresentaram resultados relativos de eficiência de remoção de sulfato semelhantes em diferentes concentrações de metais e substratos orgânicos (condição 2/lactato - 22%; condição 3/lactato - 23%; condição 3/etanol - 20%), com exceção da cultura inoculada em etanol na condição 2, que obteve a menor eficiência de remoção de sulfato, igual a 12%. A baixa eficiência de remoção de sulfato nessa condição foi observada nos dois frascos de cultivo, podendo estar relacionado com algum erro experimental de inoculação.

(a)



(b)

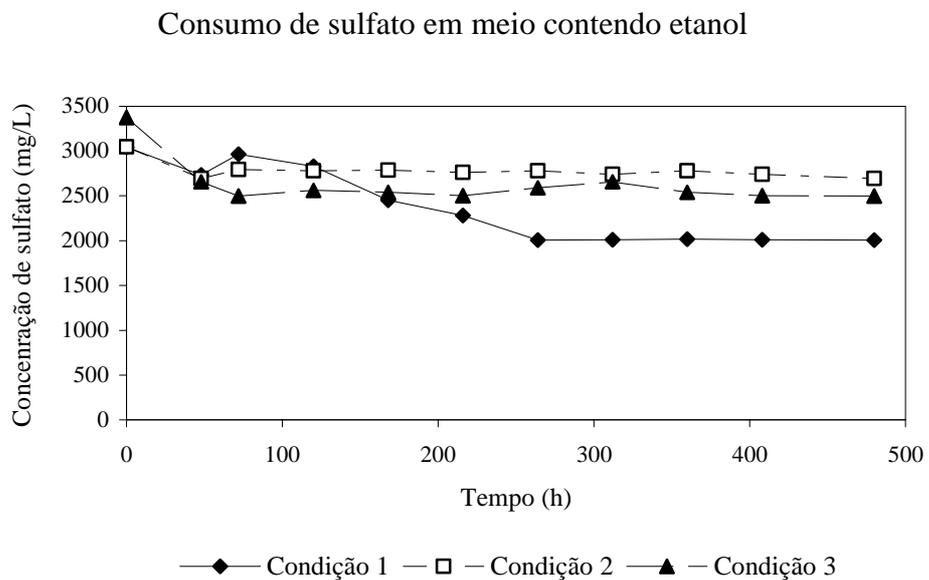


Figura 5.23 - Cinética de remoção de sulfato da cultura LG01 em meio Postgate C, em pH 7,0, em diferentes concentrações dos metais cobre, manganês e níquel (condições 1, 2 e 3) e em diferentes substratos orgânicos, (a) lactato e (b) etanol.

De acordo com as figuras 5.22 e 5.23, observou-se claramente a alteração na atividade celular das bactérias da cultura LG01 quando expostas aos metais Cu, Mn e Ni dissolvidos no meio. Metais pesados são geralmente tóxicos para BRS porque são capazes de substituir íons essenciais que compõem a estrutura celular e bloquear grupos funcionais de moléculas importantes como enzimas, promovendo danos a integridade da membrana celular, desnaturação e inativação de enzimas celulares (Sani *et al.*, 2001). Diante dos resultados apresentados, a cultura LG01 sofre influencia dos metais pesados dissolvidos no meio, porém não há interrupção total do metabolismo bacteriano do sulfato. Essas bactérias apresentaram tolerância às concentrações de metais estudadas. Todavia, os mecanismos pelos quais os metais modificam o metabolismo bacteriano não foram identificados. A partir da metodologia proposta, procuramos avaliar a capacidade da cultura LG01 metabolizar sulfato e remover metais em sistema batelada, em meio contendo lactato ou etanol.

A concentração de sulfato removido pela cultura LG01 com lactato ou etanol parece produzir uma concentração de sulfeto suficiente para precipitar os metais dissolvidos no meio de cultura. A figura 5.24 apresenta os resultados de eficiência de remoção dos metais nas condições de cultivo estudadas. Em aproximadamente 170 horas de ensaio, todos os metais (Cu, Mn e Ni) apresentaram eficiências de remoção superiores a 95%, com concentrações residuais abaixo de 1,6 mgL<sup>-1</sup> para Ni, 1,8 mgL<sup>-1</sup> para Cu e 0,6 mgL<sup>-1</sup> para Mn. Kaksonen *et al.* (2003) relataram a remoção de 99,8% de Zn (240 mgL<sup>-1</sup>) em concentração 300 mgL<sup>-1</sup> de sulfeto de hidrogênio produzido por BRS. A queda na atividade das BRS da cultura LG01, indicada pelos baixos valores de remoção absoluta de sulfato, não inibiu completamente a produção de sulfeto de hidrogênio. A produção bacteriana do ânion sulfeto (HS<sup>-</sup>) pode ter sido o principal responsável pela remoção dos metais Cu, Mn e Ni do meio de cultivo pela precipitação como sulfetos metálicos, conforme a equação 5.5:

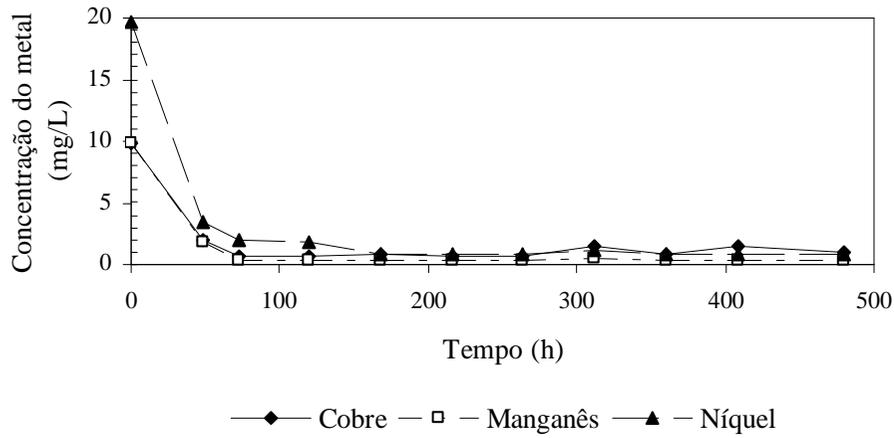


onde, *Me* representa os cátions metálicos, *HS<sup>-</sup>* os íons sulfeto e *MeS* o sulfeto metálico.

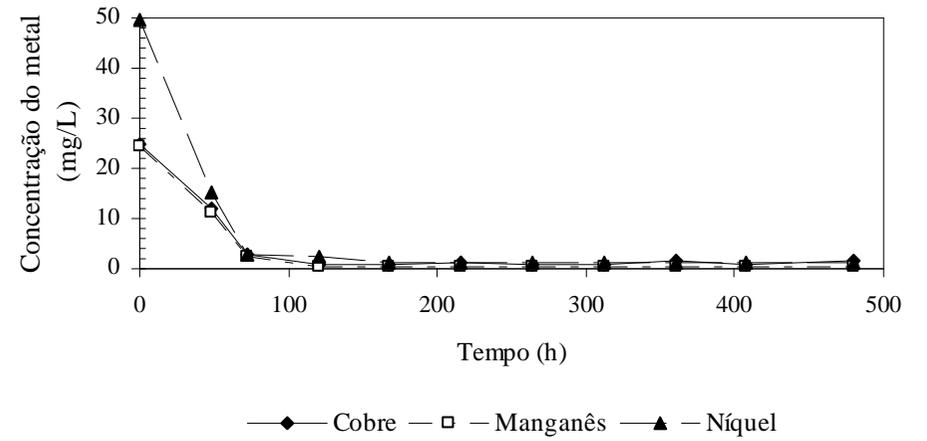
A atividade metabólica de BRS em diferentes concentrações de metais pode estar relacionada com as espécies que compõem a cultura de BRS. Jalali e Baldwin (1999) constataram o crescimento de culturas mistas de BRS em meio de cultivo em batelada com concentração inicial de 150 mgL<sup>-1</sup> de cobre, com remoção desse metal para valores

residuais inferiores a  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ . Martins *et al.* (2009) relataram a remoção completa de  $80 \text{ mgL}^{-1}$  de cobre inicial durante 15 dias de cultivo de culturas de BRS isoladas de águas residuárias, em sistema batelada. Já Cabrera *et al.* (2006) observaram que culturas puras de *Desulfovibrio vulgaris* removiam sulfato em concentrações inferiores a  $9 \text{ mgL}^{-1}$  de cobre dissolvidos no meio, sendo que em concentrações superiores a esse limite havia inibição completa do metabolismo dessa espécie de BRS. Os resultados para remoção de níquel por BRS também seguem essa hipótese. Poulson *et al.* (1997) concluíram que em concentração superior de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de níquel, o metabolismo do sulfato foi inibido em *Desulfovibrio desulfuricans*. Para culturas de *Desulfovibrio vulgaris* cultivadas com concentração inicial de  $8,5 \text{ mgL}^{-1}$  de níquel, 96% desse metal foi removido do meio como sulfeto de níquel (Cabrera *et al.*, 2006). Do mesmo modo, concentrações variadas de manganês podem ser removidas por culturas de BRS. Medircio *et al.* (2007) observaram a remoção de aproximadamente 90% de manganês por BRS em meio de cultivo com concentração inicial de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  desse metal. Em culturas de *Desulfovibrio sp.*, houve remoção de 65% de manganês dissolvido em concentração inicial de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  em batelada (Cabrera *et al.*, 2006). Contudo, a remoção de manganês por BRS, nas condições de cultivo descritas, parece não ocorrer por precipitação como sulfeto de manganês (Waybrant *et al.*, 1998). Segundo Ginter e Grobicki (1997), a precipitação de Mn (II) como sulfeto de manganês não ocorre em condições de pH neutro, sendo o manganês removido principalmente por adsorção na biomassa bacteriana e pela precipitação como carbonato ( $\text{MnCO}_3$ ).

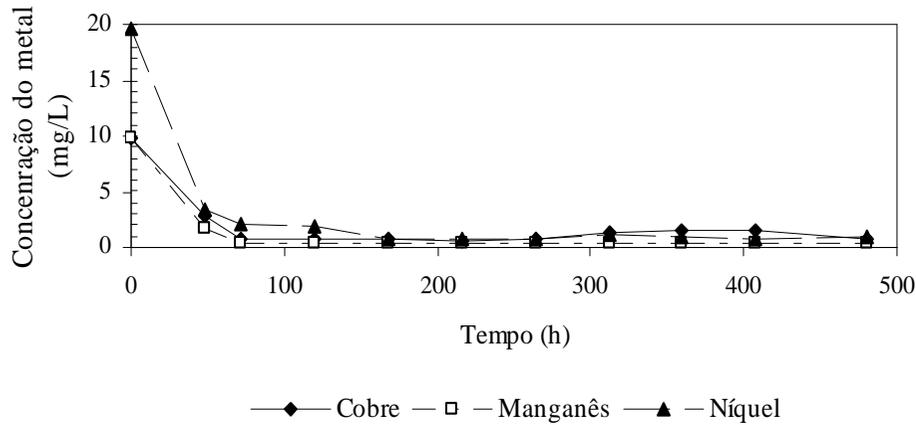
a) Remoção de metais em meio contendo lactato na condição 2



b) Remoção de metais em meio contendo lactato na condição 3



c) Remoção de metais em meio contendo etanol na condição 2



d) Remoção de metais em meio contendo etanol na condição 3

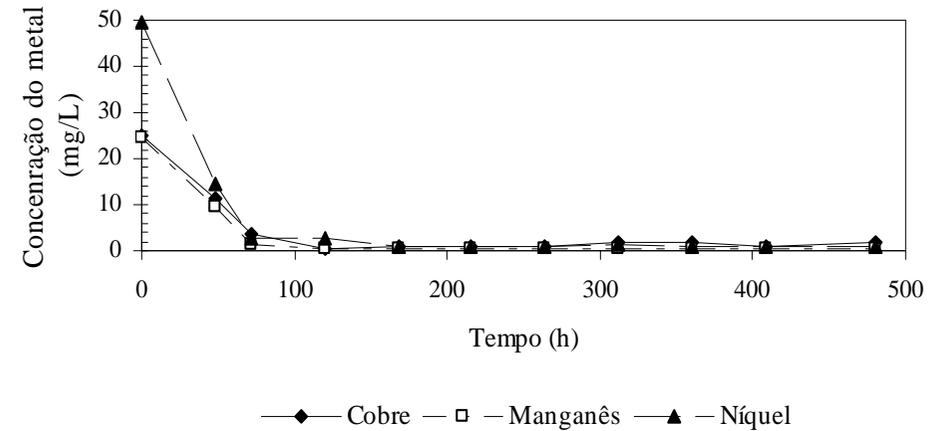


Figura 5.24 - Eficiência de remoção de metais durante o cultivo da amostra LG01 em diferentes fontes de carbono: (a) e (b) lactato; (c) e (d) etanol.

## 5.7. Características morfológicas da cultura LG01

A cultura LG01 foi enriquecida por um período de sete dias, em meio líquido Postgate C, em pH 7,0, com lactato ou etanol como fonte de carbono e elétrons para a descrição da morfologia celular. Uma alíquota desses cultivos (aproximadamente 100 µL) foi fixada em lâminas microscópicas e coradas a partir da técnica de coloração de Gram (Madigan *et al.*, 2004). Essa técnica permite caracterizar as células quanto a forma e identificar as bactérias como Gram positivas ou Gram negativas. As lâminas coradas referentes a cultura LG01 em lactato e etanol foram observadas em microscópio ótico e as micrografias estão exibidas na figura 6.25.

De acordo com a figura 6.25, as células bacterianas predominantes na cultura LG01 eram de Gram negativas e móveis. As bactérias apresentam tamanhos variados e as formas predominantes eram de bacilos retos e curvos, havendo presença de células ovóides e filamentosas. Na cultura LG01 cultivada em lactato, observamos o predomínio de bacilos retos e curvos Gram negativos. Segundo os resultados apresentados no item 5.5.1, as BRS presentes na cultura LG01 não oxidam acetato. A partir das condições de cultivo e dos resultados morfológicos e bioquímicos podemos classificar essas BRS como bacilos mesófilos Gram negativos que oxidam lactato incompletamente a acetato. Segundo Madigan *et al.* (2004) alguns dos gêneros de BRS que apresentam essas características são *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum* e *Desulfobulbus*. A cultura LG01 enriquecida com etanol apresenta também o predomínio de bactérias Gram negativas e móveis. As formas predominantes foram de células na forma de bacilos curvos e retos. Porém, como pode ser observado na figura 6.25 (c e d), há presença de células alongadas e possivelmente Gram positivas. Note que essas células são maiores que as demais e apresentam coloração roxa (mais escura). A partir dos resultados divulgados no item 4.2, as BRS da cultura LG01 oxidam etanol sem acúmulo de acetato no meio de cultivo. Dessa forma, essas bactérias podem ser classificadas como bactérias mesófilas Gram negativas oxidantes de acetato. Os possíveis gêneros de BRS que apresentam essas características são *Desulfobacter* e *Desulfobacterium*. As células Gram positivas e filamentosas indicadas pelas setas podem ser do gênero *Desulfonema*.

Os resultados de coloração de Gram e de produção de ácidos orgânicos das células bacterianas da cultura LG01 em lactato e etanol foram insuficientes para identificar as espécies de BRS presentes na cultura. Porém, a utilização de técnicas de caracterização

molecular foram empregadas para uma identificação mais precisa das espécies de BRS que compõem a cultura LG01.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6.25 - Micrografias de células bacterianas da cultura LG01 fixadas e coradas pelo método de Gram. (a) e (b) cultura LG01 cultivada com lactato e; (c) e (d) cultura LG01 cultivadas em etanol. As setas indicam células maiores e mais escuras, possivelmente bactérias Gram positivas.

## 5.8. Características moleculares das BRS da cultura LG01

A caracterização molecular das espécies de BRS que compõem as culturas LG01 em lactato ou etanol foi realizada por PCR, havendo amplificação de fragmentos do RNAr 16S e da região 16S, intergênica e 23S. Os iniciadores da região 16S (DSR16), intergênica e 23S utilizados são referentes aos genes da enzima sulfito redutase dissimilatória (*dsr*). Após a etapa de purificação do produto de PCR, foi realizado o seqüenciamento, e as seqüências obtidas utilizadas para busca de homologia, similaridade e identidade utilizando as ferramentas BLASTn e BLASTx. Os resultados estão apresentados nas tabelas 5.15 e 5.16.

Tabela 5.15 - Alinhamento com as seqüências depositadas no banco de dados. Amostras das culturas LG01 cultivadas em lactato.

<i>Espécie (Número de acesso)</i>	<i>Identidade</i>
<i>Desulfomonas pigra</i> (AF192152)	100%
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> str. ATCC 27774	92%
Uncultured <i>Desulfovibrio</i> sp. clone A37bac	90%
<i>Desulfobulbus</i> sp. (EF442937)	90%

Tabela 5.16 - Alinhamento com as seqüências depositadas no banco de dados. Amostras das culturas LG01 cultivadas em etanol.

<i>Espécie (Número de acesso)</i>	<i>Identidade</i>
<i>Desulfobacter halotolerans</i> DSM 11383 (NR026439)	100%
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2 (CP001087)	100%
Uncultured <i>Desulfonema</i> sp. (AM501653)	100%
Uncultured <i>Desulfotomaculum</i> sp. clone BNB-488 (FJ898345)	100%

De acordo com as análises de caracterização molecular, a diversidade de espécies de BRS que compõe a cultura LG01 parece ser determinada pelo substrato orgânico disponível (lactato ou etanol) para o metabolismo dissimilativo do sulfato. O enriquecimento da amostra nativa de microrganismos proveniente do sedimento da Lagoa do Gambá (LG01) nas condições de cultivo descrita no item 4.1 selecionou espécies de BRS capazes de oxidar lactato, etanol ou acetato na respiração do sulfato. Os resultados indicam que cultivos sucessivos de culturas de BRS em meio líquido Postgate C favoreceram o desenvolvimento das espécies capazes de metabolizar o substrato orgânico disponível.

Os gêneros de BRS que compõem a cultura LG01 cultivada em lactato são mesófilos Gram negativos e não oxidantes de acetato, classificados taxonomicamente nas famílias *Desulfovibrionaceae* (gêneros *Desulfomonas* e *Desulfovibrio*) e *Desulfobacteriaceae* (gênero *Desulfobulbus*) (Castro *et al.*, 2000). Segundo Madigan *et al.* (2004), o gênero *Desulfomonas* é caracterizado por apresentar células na forma de bacilos retos, imóveis e pela presença da enzima desulfoviridina. No gênero *Desulfovibrio*, as células possuem forma de bacilos curvos, móveis, podem ou não apresentar desulfoviridina. As espécies do gênero *Desulfobulbus* possuem a forma de cocos alongados, podendo ser móveis ou imóveis e não apresentam desulfoviridina.

Na cultura LG01 cultivada em etanol predominam as espécies de BRS mesófilas Gram negativas e oxidantes de acetato. Os gêneros identificados são classificados nas famílias *Desulfobacteriaceae* (*Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*) e *Peptococcaceae* (*Desulfotomaculum*) (Castro *et al.*, 2000). A espécie *Desulfobacter halotolerante* apresenta-se como bacilos ovais Gram negativos, desulfoviridina ausente, móveis ou imóveis, capazes de oxidar apenas o acetato como substrato orgânico (Castro *et al.*, 2000). A espécie de BRS Gram negativa *Desulfobacterium autotrophicum* não apresenta desulfoviridina, oxida acetato completamente a CO<sub>2</sub> e pode crescer autotroficamente (Madigan *et al.*, 2004). O gênero *Desulfonema* é representado por espécies de bactérias filamentosas deslizantes, Gram positivas, capazes de oxidar completamente o acetato e crescer autotroficamente, apresentam ou não desulfoviridina (Madigan *et al.*, 2004). No gênero *Desulfotomaculum*, apenas o bacilo mesófilo Gram negativo *Desulfotomaculum acetoxidans* é capaz de oxidar etanol e acetato a CO<sub>2</sub> (Spormann e Thauer, 1989).

Os gêneros de BRS identificados por análise molecular das culturas LG01 cultivadas com lactato ou etanol apresentam as características bioquímicas e morfológicas descritas nos itens 5.6 e 5.7. O predomínio de espécies de BRS não oxidantes de acetato na cultura LG01 justifica o acúmulo desse composto no meio durante o cultivo com lactato. Já no cultivo da cultura LG01 em etanol, o acetato é totalmente metabolizado pelas espécies de BRS presentes. Contudo, o enriquecimento da amostra nativa da cultura LG01 com lactato teoricamente deveria favorecer as relações sintróficas entre as espécies de BRS oxidantes e não oxidantes de acetato. Dessa forma, além do substrato orgânico, a concentração de sulfeto pode ter selecionado a riqueza de espécies presentes na cultura LG01.

Alguns trabalhos têm indicado que a estrutura da comunidade de BRS é modificada pelo acúmulo de sulfeto dissolvido no meio a partir da atividade bacteriana. Kaksonen *et al.* (2006) observaram que a oxidação de etanol por BRS em biorreatores foi mais afetada pela produção de sulfeto que a oxidação de acetato. Içgen e Harrison (2006) demonstraram que os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* e *Desulfobacterium* e a família Desulfovibrionaceae possuem maior tolerância ao sulfeto quando comparado aos gêneros *Desulfonema* e *Desulfobulbus* e à família *Desulfobacteriaceae*, cujas atividades são inibidas com aumento da concentração de sulfeto. Essas observações corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. A cultura LG01 apresentou maiores valores de crescimento e remoção de sulfato quando cultivadas em lactato provavelmente pela presença de gêneros de BRS tolerantes a alta concentração de sulfeto. Os resultados menos favoráveis de crescimento e remoção de sulfato pelas BRS da cultura LG01 cultivadas em etanol pode estar relacionado com os efeitos tóxicos do sulfeto nas espécies que compõem a comunidade. Além da influência do substrato orgânico disponível, da razão DQO/sulfato, da condição do pH do meio e da concentração de metais pesados, a tolerância à concentração de sulfeto pode interferir na estrutura das comunidades de BRS e nas suas atividades metabólicas.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho disponibiliza informações sobre condições adequadas para enriquecimento e cultivo de amostras ambientais de bactérias redutoras de sulfato (BRS). O desenvolvimento desse grupo microbiano é influenciado pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo e pela composição do substrato orgânico. O pH do meio de cultivo é influenciado diretamente pelos intermediários metabólicos produzidos pelas BRS. O cultivo de culturas mistas de BRS promove uma efetiva remoção de sulfato e metais em sistema batelada. Baseados nesse estudo, as seguintes conclusões foram propostas:

- O meio de cultivo Postgate C “modificado” pode ser utilizado para o enriquecimento e o cultivo de culturas de BRS provenientes de sedimentos ou corpos d’água naturais contaminados com sulfato e/ou com metais.
- Os substratos orgânicos lactato de sódio e etanol podem ser utilizados em meios de cultivo como fonte de elétrons e carbono para o crescimento e a redução de sulfato por BRS.
- O crescimento e o consumo de sulfato das culturas de BRS estudadas são influenciados negativamente em condições ácidas, todavia observa-se proliferação celular e produção biológica de sulfeto de hidrogênio.
- O meio de cultivo Postgate B favorece o crescimento bacteriano e o meio Postgate C promoveu os maiores valores de remoção biológica de sulfato pelas culturas de BRS estudadas.
- Dentre as culturas de BRS estudadas, as culturas enriquecidas do sedimento de uma lagoa natural (Lagoa do Gambá) apresentaram os maiores valores de crescimento e consumo de sulfato.
- As culturas de BRS cultivadas em pH inicial igual a 5,5 em meio contendo lactato de sódio promoveram a neutralização após aproximadamente 72 horas de crescimento bacteriano. O pH dos meios cultivados com BRS contendo etanol em condições ácidas não sofreu alteração.

- A utilização de lactato como fonte de carbono e energia é mais favorável ao crescimento e consumo de sulfato pelas culturas BRS enriquecidas quando comparado ao etanol, nos meios de cultivo e nas razões DQO/sulfato estudadas.
- As melhores condições para remoção de sulfato para as culturas de BRS foram em meio Postgate C contendo lactato, em pH 7,0 e com razão DQO/sulfato igual a 2,0. Nessas condições a cultura LG01 foi responsável pela remoção de 98% do sulfato disponível no meio de cultivo. Em cultivos com etanol como substrato orgânico, a cultura LG01 apresentou o melhor resultado de remoção de sulfato (50%) em meio Postgate C, em pH 7,0 e com razão DQO/sulfato 3,6.
- Os resultados dos ensaios em batelada com metais mostraram que para as concentrações estudadas, 10 e 20 mgL<sup>-1</sup> (manganês e cobre) e 25 e 50 mgL<sup>-1</sup> (níquel), a cultura mista de BRS LG01 sofreu inibição na sua atividade metabólica, com baixos resultados de crescimento e redução de sulfato (máximo 20%). Porém, produção biológica de sulfeto foi suficiente para a remoção dos metais com eficiência superior a 95% de remoção e concentrações residuais abaixo de 1,6 mgL<sup>-1</sup> para Ni, 1,8 mgL<sup>-1</sup> para Cu e 0,6 mgL<sup>-1</sup> para Mn.
- A diversidade de espécies identificadas por caracterização molecular está de acordo com o substrato orgânico metabolizado na redução de sulfato e com os ácidos orgânicos produzidos.
- A combinação de técnicas de cultivo microbiológico, caracterização morfológica molecular são necessárias para obter uma compreensão da estrutura da comunidade das espécies microbianas na cultura, favorecendo sua aplicação em escala industrial.

## 7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

No presente trabalho, o foco principal de nosso estudo foi cultivar culturas mistas de BRS em sistema batelada para remoção de sulfato e metais e para a neutralização de meio de cultivo moderadamente ácido. As propostas para trabalhos futuros seriam:

- Estabelecer condições nutricionais mais simples mantendo a efetiva remoção de sulfato pelas culturas de BRS estudadas visando à implementação em reatores em escala industrial.
- Cultivar espécies de BRS capazes de oxidar completamente o substrato orgânico a CO<sub>2</sub> e quantificar a eficiência de remoção de sulfato nas condições estudadas.
- Disponibilizar outros substratos orgânicos simples e de baixo custo como fonte de carbono e elétrons no metabolismo dissimilativo do sulfato pelas espécies de BRS e quantificar a concentração de sulfato consumida.
- Avaliar a influência de outros grupos bacterianos, possivelmente presentes na cultura mista, na eficiência de remoção de sulfato das espécies de BRS.
- Determinar o crescimento bacteriano e remoção de sulfato de culturas de BRS em valores de pH mais ácidos (4,5 – 5,0).
- Comparar o desempenho de remoção de sulfato e tolerância a metais de uma cultura pura de BRS com uma cultura mista.
- Avaliar a influência dos metais pesados estudados no metabolismo das BRS.

## **8. PUBLICAÇÕES**

**8.1.** Barbosa, L.P.; Bertolino, S.M.; Freitas, P.C.; Oliveira, V.A.; Pina, P.D.; Leão, V.A. e Teixeira, M.C. (2009). Effects of different COD/sulfate ratios on the growth of metal tolerant sulfate reducing bacteria (SRB). *Advanced Materials Research*, Vols. 71-73, pp 569-572.

**8.2.** Barbosa, L.P.; Bertolino, S.M.; Freitas, P.C.; Oliveira, V.A.; Pina, P.D.; Leão, V.A. e Teixeira, M.C. Effects of different COD/sulfate ratios on the growth of metal tolerant sulfate reducing bacteria (SRB). 18<sup>th</sup> International Biohydrometallurgy Symposium, Bariloche – Argentina, 2009.

**8.3.** Barbosa, L. P.; Bertolino, S.M.; Costa, P.F; Pina, D. P.; Leão, V. A.; Teixeira, M. C. Cultivo de Bactéria Redutoras de Sulfato Tolerantes a Condições Acidófilas Moderadas e Metais em Diferentes Razões DQO/sulfato com Lactato e Etanol como Doadores de Elétrons. XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas – Pernambuco, 2009.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akagi, J. M. (1983). "Reduction of bisulfite by the trithionate pathway by cells extracts from *Desulfotomaculum nigrificans*." Biochemical and biophysical research communications **117**: 530-535.
- APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater, 20.<sup>a</sup> ed., Washington, D.C. (USA), American Public Health Association. 1998. 1325 p.
- Badziong, W. e R. K. Thauer. (1978). "Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as the sole energy sources." Archive of Microbiology **117**: 209-214.
- Balk, M., J. Weijma, et al. (2007). "Methanol utilizing *Desulfotomaculum* species utilizes hydrogen in a methanol-fed sulfate-reducing bioreactor." Applied Microbiology and Biotechnology **73**(5): 1203-1211.
- Barton, L. L. Sulfate-reducing bacteria, New York: Plenum Press. 1995. 336p.
- Baumgartner, L. K., R. P. Reid, et al. (2006). "Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries." Sedimentary Geology **185**(3-4): 131-145.
- Bick, J. A., J. J. Dennis, et al. (2000). "Identification of a New Class of 59-Adenylylsulfate (APS) Reductases from Sulfate-Assimilating Bacteria." Journal of bacteriology **182**(1): 135-142.
- Bottrell, S. H. e R. J. Newton (2006). "Reconstruction of changes in global sulfur cycling from marine sulfate isotopes." Earth-Science Reviews **75**(1-4): 59-83.
- Brugna, M., W. Nitschke, et al. (1999). "First evidence for the presence of a hydrogenase in the sulfur-reducing bacterium *Desulfuromonas acetoxidans*." Journal of Bacteriology **181**(17): 5505-5508.
- Buckley, D.H., J.R. Graber, et al. (1998). "Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils." Appl Environ Microbiol **64**: 4333–4339.
- Cabrera, G., R. Perez, et al. (2006). "Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* strains." Journal of Hazardous Materials **135**(1-3): 40-46.

- Canfield, D. E. e B. Thamdrup (1996). "Fate of elemental sulfur in an intertidal sediment." Fems Microbiology Ecology **19**(2): 95-103.
- Cao, J., G. ZHANG, G., et al. (2008). "Precipitation of valuable metal from bioleaching solution by biogenic sulfides". Minerals Engineering **135** (1-3): 40-46.
- Castro, H. F., N. H. Williams, et al. (2000). "Phylogeny of sulfate-reducing bacteria." Fems Microbiology Ecology **31**(1): 1-9.
- Cheung, K. H. and J. D. Gu (2003). "Reduction of chromate (CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria." Chemosphere **52**(9): 1523-1529.
- Chockalingam, E. e S. Subramanian (2006). "Studies on removal of metal ions and sulphate reduction using rice husk and *Desulfotomaculum nigrificans* with reference to remediation of acid mine drainage." Chemosphere **62**(5): 699-708.
- Choi, E. e J. M. Rim (1991). "Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment." Water Science & technology **23** (7-9): 1259-1264.
- Cypionka, H. (1989). "Characterization of sulfate transport in *Desulfovibrio desulfuricans*." Archive of Microbiology **152**: 237- 243.
- Cypionka, H. (1995). Solute transport and cell energetics. Sulfate-reducing bacteria. L. L. Barton. New York, Plenum Press: 152-184.
- Dolla, A., M. Fournier, et al. (2006). "Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria." Journal of Biotechnology **126**(1): 87-100.
- Domingues, M. R., E. M. Moraes, et al. (2006). "Analysis of microbial community in biofilms and planktonic cells of anaerobic thermophilic reactors." Brazilian Archives of Biology and Technology **49**: 1-9.
- El Bayoumy, M. A., J. K. Bewtra, et al. (1999). "Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor." Water Air and Soil Pollution **112**(1-2): 67-84.
- Elliott, P., S. Ragusa, et al. (1998). "Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as treatment system for acid mine drainage." Water Research **32**(12): 3274-3730.

- Elsgaard, L., D. Prieur, et al. (1994). "Thermophilic Sulfate Reduction in Hydrothermal Sediment of Lake Tanganyika, East-Africa." Applied and Environmental Microbiology **60**(5): 1473-1480.
- Fauque, G., A. R. Lino, et al. (1990). "Purification and characterization of bisulfite reductase (desulfofuscin) from *Desulfovibrio thermophilus* and its complexes with exogenous ligands." Biochimica and Biophysica Acta **1040**: 112-118.
- Fitz, R. M. and H. Cypionka (1991). "Generation of a Proton Gradient in *Desulfovibrio Vulgaris*." Archives of Microbiology **155**(5): 444-448.
- Fry, N. K., J. K. Fredrickson, et al. (1997). "Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers." Applied and Environmental Microbiology **63**(4): 1498-1504.
- Fukui, M., A. Teske, et al. (1999). "Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*)." Archives of Microbiology **172**(4): 193-203.
- Gibson, G. R. (1990). "Physiology and Ecology of the Sulfate-Reducing Bacteria." Journal of Applied Bacteriology **69**(6): 769-797.
- Gilmore, D. F., W. Godchaux, et al. (1989). "Regulation of Sulfate Assimilation in *Cytophaga-Johnsonae*." Archives of Microbiology **152**(4): 387-392.
- Ginter, M. O. e A. M. Grobick (1997). "Manganese removal mechanisms in a stirred UASB reactor". Water Research **31** (6): 1261-1268.
- Gupta, R. S. (2000a). "The natural evolutionary relationships among prokaryotes." Critical Reviews in Microbiology **26**(2): 111-131.
- Gupta, R. S. (2000). "The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes." Fems Microbiology Reviews **24**(4): 367-402.
- Gyure, R. A., Brooks, A. K. A., et al. (1990). "Microbial sulfate reduction in acidic (pH 3) strip-mine lakes." FEMS Microbiology Letters **73** (3) 193-201, 1990.
- Hamilton, W. A. (1998). "Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact." Biodegradation **9**(3-4): 201-212.
- Hansen, T. A. (1994). "Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes." International Journal of General and Molecular Microbiology **66**: 165-185.

- Hao, O. J., J. M. Chen, et al. (1996). "Sulfate-reducing bacteria." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **26**(2): 155-187.
- Haouari, O., M. L. Fardeau, et al. (2008). "*Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* sp nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring." Systematic and Applied Microbiology **31**(1): 38-42.
- Harmsen, H. J. M., B. Wullings, et al. (1993). "Phylogenetic Analysis of Syntrophobacter-Wolinii Reveals a Relationship with Sulfate-Reducing Bacteria." Archives of Microbiology **160**(3): 238-240.
- Haveman, S. A., E. A. Greene, et al. (2004). "Physiological and gene expression analysis of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrite." Journal of Bacteriology **186**(23): 7944-7950.
- Hirasawa, J. S., A. Sarti, et al. (2008). "Application of molecular techniques to evaluate the methanogenic archaea and anaerobic bacteria in the presence of oxygen with different COD : sulfate ratios in a UASB reactor." Anaerobe **14**(4): 209-218.
- Icgen, B. and Harrison, S. (2006). "Exposure to sulfide causes populations shifts in sulfate-reducing consortia" Research in Microbiology **157** (8): 784-791.
- Isaksen, M. F., F. Bak, et al. (1994). "Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria in Cold Marine Sediment." Fems Microbiology Ecology **14**(1): 1-8.
- Jalali, K. e S. A. Baldwin (2000). "The role of sulphate reducing bacteria in copper removal from aqueous sulphate solutions" Water Research **34**(3): 797-806.
- Jeanthon, C., S. L'Haridon, et al. (2002). "Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum sp nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**: 765-772.
- Johnson, D. B. (1995). "Acidophilic Microbial Communities - Candidates for Bioremediation of Acidic Mine Effluents." International Biodeterioration & Biodegradation **35**(1-3): 41-58.
- Johnson, D. B., M. A. Dziurla, et al. (2002). "The microbiology of acid mine drainage: genesis and biotreatment." South African Journal of Science **98**(5-6): 249-255.

- Jorgensen, B. B. e F. Bak (1991). "Pathway and microbiology of thiosulfate transformation, and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark)." Applied and Environmental Microbiology **57**(3): 547-556.
- Kaksonen, A. H., P. D. Franzmann, et al. (2003). "Performance and ethanol oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater." Biodegradation **14**(3): 207-217.
- Kaksonen, A. H., J. J. Plumb, et al. (2004). "Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater." Fems Microbiology Ecology **47**(3): 279-289.
- Kaksonen, A. H., J. J. Plumb, et al. (2006). "The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater." Hydrometallurgy **83**(1-4): 204-213.
- Kertesz, M. A. (2001). "Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds." Research in Microbiology **152**(3-4): 279-290.
- Kim, S. U., Y.H. Cheong, et al. (2007). "Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp.)" Water Science & Technology **55** (1-2): 05-111.
- Kjeldsen, K. U., B. V. Kjellerup, et al. (2007). "Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district heating system." Fems Microbiology Ecology **61**(2): 384-397.
- Knoblauch, C., K. Sahm, et al. (1999). "Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp nov., *Desulfofrigus fragile* sp nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp nov and *Desulfotalea arctica* sp nov." International Journal of Systematic Bacteriology **49**: 1631-1643.
- Kopriva, S e A. Koprivova (2005). "Sulfate assimilation and glutathione synthesis in C<sub>4</sub> plants." Photosynthesis Research **86**: 363-372.
- Kramer, M. e H. Cypionka (1989). "Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria." Archives of microbiology **151**: 232-237.

- Krekeler, D. e H. Cypionka (1995). "The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN." FEMS Microbiology Ecology **17**(4): 271-277.
- Kremer, D. R., H. E. Nienhuis-Kuiper, et al. (1988). "Ethanol dissimilation in *Desulfovibrio*." Archives of Microbiology **150**:552-557.
- Kremer, D. R., e T. A. Hansen. (1988). "Pathway of propionate degradation in *Desulfohalobus propionicus*." FEMS Microbiology Ecology **49**: 273-277.
- Kunow, J., D. Linder, et al. (1995). "Pyruvate, Ferredoxin Oxidoreductase from the Sulfate-Reducing Archaeoglobus-Fulgidus - Molecular Composition, Catalytic Properties, and Sequence Alignments." Archives of Microbiology **163**(1): 21-28.
- Kusel, K. A., U. Roth, et al. (2001). "Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments." Environmental and Experimental Botany **46**(3): 213-223.
- Lens, P. N., M. P. Depoorter, et al. (1995). "Sulfate-Reducing and Methane Producing Bacteria in Aerobic Waste-Water Treatment Systems." Water Research **29**(3): 871-880.
- Lens, P. N. L., A. Visser, et al. (1998). "Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **28**(1): 41-88.
- Leu, J. Y., C. P. McGovern-Traa, et al. (1998). "Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing." Anaerobe **4**(3): 165-174.
- Liamlean, W. e A. P. Annachatre (2007). "Electron donors for biological sulfate reduction." Biotechnology Advances **25**(5): 452-463.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2004). Microbiologia de Brock. São Paulo, Prentice Hall.
- Maree, J. P., H. A. Greben, et al. (2004). "Treatment of acid and sulphate-rich effluents in an integrated biological/chemical process." Water Sa **30**(2): 183-189.
- Marschall, C., P. Frenzel, et al. (1993). "Influence of Oxygen on Sulfate Reduction and Growth of Sulfate-Reducing Bacteria." Archives of Microbiology **159**(2): 168-173.

- Martins, M., Faleiro, M. L., et al (2009). "Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination" Journal of Hazardous Materials. Disponível on line: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat).
- Matias, P. M., Pereira, I. A. C., et al. (2005). "Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview." Progress in Biophysics and Molecular Biology **89**: 292–329.
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., et al. (2008). " Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism" Annals of the New York Academy of Sciences **1125**: 58-72.
- Medircio, S. N., V. A. Leao, et al. (2007). "Specific growth rate of sulfate reducing bacteria in the presence of manganese and cadmium." Journal of Hazardous Materials **143**(1-2): 593-596.
- Metcalf Eddy. Wastewater engineering: treatment disposal and reuse. McGraw Hill; 2003.
- Mizuno, O., Y. Y. Li, et al. (1998). "The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion." Water Research **32**(5): 1626-1634.
- Mori, K., Kim, H., et al (2003)." A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., Thermodesulfobium narugense, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring". Extremophiles (**7**)7: 283–290.
- Muyzer, G. e A. J. M. Stams (2008). "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria." Nature Reviews Microbiology **6**(6): 441-454.
- Nagpal, S., S. Chuichulcherm, et al. (2000). "Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: An experimental and modeling study." Biotechnology and Bioengineering **70**(5): 533-543.
- Nakagawa, T., S. Hanada, et al. (2002). "Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan)." Fems Microbiology Ecology **41**(3): 199-209.

- Neculita, C. M. and G. J. Zagury (2008). "Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization." Journal of Hazardous Materials **157**(2-3): 358-366.
- Odom, J.M. e Peck Jr., H.D. (1981). "Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing"bacteria, *Desulfovibrio* sp". FEMS Microbiology Letters **12**: 47–50.
- Oluwaseun, O. O., R. P. van Hille, et al. (2009). "Study of anaerobic lactate metabolism under biosulfidogenic conditions". Water Research **43**(14): 3345-3354.
- Oremland, P. e S. Polcin (1982). "Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments". Applied and environmental microbiology **44**(6):1270-1276.
- Oyaizu, H., e C. R. Woese (1985). "Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria". Syst Appl Microbiol **6**(6): 257–263.
- Pankhania, I. P., A. M. Spormann, et al. (1988). "Lactate conversion to acetate, CO<sub>2</sub> an H<sub>2</sub> in cell suspensions of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg): indications for the involvement of an energy driven reaction." Archives of Microbiology **150**:26–31.
- Pereira, P. M., Q. He, et al. (2008). "Energy metabolism in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: insights from transcriptome analysis." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **93**(4): 347-362.
- Pikuta, E. V., A. M. Lysenko, et al. (1997). "Distribution of *Desulfonatovibrio hydrogenovorans* in soda lakes of Tuva." Microbiology **66**(2): 216-221.
- Pohorelic, B.K.J., J.K. Voordouw, et al. (2002). Effects of deletion of the genes encoding Fe-only hydrogenases of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. Journal of Bacteriology **184**: 679–686.
- Postgate, J. R. e J. L. Gal (1973). "The physiology of sulphate-reducing bacteria" Advances in Microbial Physiology, **10**: 81-133
- Postgate, J. R., H. M. Kent, et al. (1984). "The Genomes of *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio vulgaris*." Journal of General Microbiology **130**: 1597-1601.

- Poulson, S.R., Colberg, P.J.S and Drever, J.I. (1997) Toxicity of heavy metal (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*, *Geomicrobiol. J.* **14**: 41–49.
- Rabus, R., T. Hansen, et al. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. The Prokaryotes: Ecophysiology and Biochemistry. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer e E. Stackebrandt. New York, Springer-Verlag: 659-768.
- Radianingtyas, H. e P. C. Wright (2003). "Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria." Fems Microbiology Reviews **27**(5): 593-616.
- Resolução Conama N° 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. Publicado no Diário Oficial da União de 18/03/2005, Seção 1, páginas 58 a 63, disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res35705.html>, acesso em 18/06/2007.
- Rooney-Varga, J. N., B. R. S. Genthner, et al. (1998). "Phylogenetic and physiological diversity of sulphate-reducing bacteria isolated from a salt marsh sediment." Systematic and Applied Microbiology **21**(4): 557-568.
- Sani, R.K., B.M. Peyton, et al. (2001). "Copper-induced inhibition of growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead". Applied Environmental Microbiology. **67**: 4765–4772.
- Santana, M. (2008). "Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments." Anaerobe **14**(3): 145-156.
- Sass, H., M. Berchtold, et al. (1998). "Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov." Systematic and Applied Microbiology **21**(2): 212-219.
- Scheid, D. e S. Stubner (2001). "Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots." Fems Microbiology Ecology **36**(2-3): 175-183.

- Schink, B. (1997). "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation." Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**(2): 262-269.
- Scholten, J. C., D. E. Culley, et al. (2007). "Evolution of the syntrophic interaction between *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Involvement of an ancient horizontal gene transfer." Biochemical and Biophysical Research Communications **352**(1): 48-54.
- Sekowska, A., H. F. Kung, et al. (2000). "Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: Facts and fiction." Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **2**(2): 145-177.
- Shen, Y. N. e R. Buick (2004). "The antiquity of microbial sulfate reduction." Earth-Science Reviews **64**(3-4): 243-272.
- Sigalevich, P., E. Meshorer, et al. (2000). "Transition from anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxycloinae* results in flocculation." Applied and Environmental Microbiology **66**(11): 5005-5018.
- Sirko, A., M. Hryniewicz, et al. (1990). "Sulfate and Thiosulfate Transport in *Escherichia-Coli* K-12 - Nucleotide-Sequence and Expression of the Cystwam Gene-Cluster." Journal of Bacteriology **172**(6): 3351-3357.
- Stams, A. J. M., F. A. M. de Bok, et al. (2006). "Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities." Environmental Microbiology **8**(3): 371-382.
- Stucki, G., K. W. Hanselmann, et al. (1993). "Biological sulfuric acid transformation: reactor design and process optimization." Biotechnological Bioengineer **41**: 303-315.
- Stumm, W. e J. J. Morgan, Eds. (1996). Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters. New York.
- Spormann, A.M. and Thauer, R. K. (1989). Anaerobic acetate oxidation to CO<sub>2</sub> by *Desulfotomaculum acetoxidans*, Archives of Microbiology, **152** (2): 189-195.
- Suzuki, D., A. Ueki, et al. (2007). "Diversity of substrate utilization and growth characteristics of sulfate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in Japan." Journal of General and Applied Microbiology **53**(2): 119-132.

- Tauts, D. e M. Renz (1983). "An optimized free-squeeze method for recovery of DNA fragments from agarose gel. Analytical Biochemistry **48**: 671-681.
- Thauer, R. K. (1988). "Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria." Journal of Biochemistry **176**:497–508.
- Thebrath, B., W. Dilling, et al. (1989). "Sulfate activation in *Desulfotomaculum*." Archive of Microbiology **152**: 296-301.
- van Houten, B. H. G. W., K. Roest, et al. (2006). "Occurrence of methanogenesis during start-up of a full-scale synthesis gas-fed reactor treating sulfate and metal-rich wastewater." Water Research **40**(3): 553-560.
- Vandieken, V., M. Mussmann, et al. (2006). "Desulfuromonas svalbardensis sp nov and Desulfuromusa ferrireducens sp nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 1133-1139.
- Velasco, A., M. Ramírez, et al. (2008). "Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation". Journal of Hazardous Materials **151** (2-3): 407-413.
- Voordouw, G. (1994). "From the Molecular-Biology of *Desulfovibrio* to a Novel Method for Defining Bacterial Communities in Oil-Field Environments." Fuel Processing Technology **40**(2-3): 331-338.
- Voordouw, G. (2002). "Carbon monoxide cycling by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough." Journal of Bacteriology **184**(21): 5903-5911.
- Wagner, M., A. J. Roger, et al. (1998). "Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration." Journal of Bacteriology **180**(11): 2975-2982.
- Wang, A., N. Ren, et al. (2008). "Enhanced sulfate reduction with acidogenic sulfate-reducing bacteria". Journal of Hazardous Materials **154** (1-3): 1060-1065.
- Waybrant K.R., Blowes, D.W e C.J. Ptacek (1998). Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. Environmental Science and Technology. **32** (13): 1972-1979.

- Widdel, F. e N. Pfennig (1982). "Studies on Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria That Decompose Fatty-Acids .2. Incomplete Oxidation of Propionate by *Desulfobulbus-Propionicus* Gen-Nov, Sp-Nov." Archives of Microbiology **131**(4): 360-365.
- Widdel, F., G.-W. Kohring, et al. (1983). "Studies on dissimilatory sulfate reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov." Archives of Microbiology **134**:286–294.
- Widdel, F., e N. Pfennig (1984). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. N. R. Krieg and J. G. Holt Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. 1:663–679.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of Sulfate- and sulfur- reducing bacteria Biology of anaerobic microorganisms. Zehner, A.B. (ed.). John Wiley and Sons, New York. pp. 469-585.
- Wu, L. F. and M. A. Mandrand (1993). "Microbial Hydrogenases - Primary Structure, Classification, Signatures and Phylogeny." Fems Microbiology Reviews **104**(3-4): 243-270.
- Zellner, G., Macario, A. J. L., et al. (2006). "A study of three anaerobic methanogenic bioreactors reveals that syntrophs are diverse and different from reference organisms." FEMS Microbiology Ecology **22** (4): 295 - 301.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)