

Thays Saretta Sulzbach

**BIORREATORES A BASE DE BIOCÁRVÃO PARA A
REMOÇÃO DE SULFATO E ELEMENTOS-TRAÇO EM ÁGUAS
DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.
Orientador: Prof. Dr. Admir José Giachini.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Dutra de Armas.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sulzbach, Thays Saretta

Biorreatores a base de biocarvão para a remoção de sulfato e elementos-traço em águas de drenagem ácida de mina / Thays Saretta Sulzbach ; orientador, Admir José Giachini ; coorientador, Rafael Dutra de Armas. - Florianópolis, SC, 2015.

94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Ecologia microbiana. 3. Biorremediação. 4. Microbiologia. 5. Biologia molecular. I. Giachini, Admir José. II. Armas, Rafael Dutra de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Thays Saretta Sulzbach

**BIORREACTORES A BASE DE BIOCÁRVÃO PARA A
REMOÇÃO DE SULFATO E ELEMENTOS-TRAÇO EM ÁGUAS
DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Biotecnologia e Biociências”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 14 de setembro de 2015.

Prof. Oscar Bruna Romero, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Admir José Giachini., Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rafael Dutra de Armas, Dr.
Co-orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jean Carlo Salome dos Santos Menezes, Dr.
Universidade do Oeste de Santa Catarina

Dedico aos meus pais e à minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Admir Giachini, pela liberdade e confiança, e ao Rafael Dutra de Armas, pela paciência e sabedoria compartilhada.

Ao amigo Jean Menezes, por me incentivar e auxiliar sempre.

À UFSC, e em especial ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, pela viabilidade deste trabalho.

Aos colegas e professores do Laboratório de Diversidade Microbiana do Solo pelo enorme aprendizado, apoio e carinho, os meus mais sinceros agradecimentos. Ao Douglas e à Manu, que participaram do trabalho de forma direta, e ao Antônio, que, além de me servir de exemplo, talvez toda e qualquer palavra que eu escreva, seja pouco para agradecer pelo auxílio.

Especiais agradecimentos aos amigos e parceiros de viagens e aventuras: Anabel, Carol, Igor e Renato, que tornaram esta etapa muito mais divertida.

Agradeço aos demais colegas do PPGBB/UFSC. Obrigada pela força e pela parceria nas disciplinas. E aos professores do programa, pelos ensinamentos.

Agradeço de forma especial aos colegas da Secretaria de Estado do Desenvolvimento Econômico Sustentável, onde tenho grandes amigos que foram simplesmente essenciais neste período. Obrigada pela colaboração quando precisei estar ausente, e pela paciência nos dias em que eu estava insuportável (Eu sei que estava!). E Maureen, obrigada pelo restaurante universitário!

Aos demais amigos da vida, obrigada pela compreensão aos momentos que me fiz ausente devido à grande carga de trabalho. Mas, por serem verdadeiros amigos, continuam comigo. A estes, informo que estarei de volta!

Aos meus pais e irmã, que me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes. Obrigada mãe, pelo seu apoio incondicional ao longo deste período e de muitos outros. Obrigada Nati, por estar ao meu lado, sempre. Obrigada pai, por tudo que você me ensinou, incluindo ética e moral.

Agradeço a todos que fizeram e fazem parte da minha vida, me orientando, inspirando e intuindo das mais variadas formas, para que me guie no caminho certo. E, por fim, sou grata aos momentos difíceis, pois eles me ensinaram a tolerância, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades eu jamais conheceria.

*O papel dos infinitamente
pequenos é infinitamente grande
(Louis Pasteur)*

RESUMO

O carvão mineral é o combustível, não renovável, de maior abundância no globo terrestre, e responsável por grande parte do consumo energético mundial. Um dos principais impactos gerados pela exploração do carvão mineral é a drenagem ácida de mina (DAM). A DAM geralmente ocorre quando o mineral de interesse nas operações de extração encontra-se associado a sulfetos e ao ferro piritoso, cujos materiais de origem, sob influência de componentes bióticos e abióticos, ocasionam acidificação dos recursos hídricos e liberam elementos potencialmente tóxicos nos ecossistemas afetados. Este cenário compromete o uso e a ocupação do solo, mesmo depois de cessadas as atividades de mineração. Atualmente, métodos tradicionais de atenuação e controle da DAM envolvem procedimentos que apresentam resultados incipientes ou de baixa eficiência. Neste contexto, este estudo utilizou metodologia inovadora com base em biocarvão e bactérias redutoras de sulfato (BRS), para mitigar a acidez e a presença de contaminantes nas águas da DAM na região carbonífera de Criciúma, Santa Catarina, Sul do Brasil. O biocarvão, produto oriundo de pirólise, apresenta elevada alcalinidade, alta área superficial específica e, portanto, afinidade por adsorção de componentes químicos, além de servir como nicho para a colonização de microrganismos. Neste estudo, biorreatores foram montados com biocarvão oriundo da pirólise de cama de aviário (400 °C) e fontes de BRS (70% do volume do reator) na proporção 4:1 (v/v). Foram avaliadas as seguintes fontes de inóculo de BRS: lodo de esgoto doméstico, sedimento de DAM e esterco bovino. Os biorreatores foram avaliados quinzenalmente durante um período de seis meses. Foram realizadas as caracterizações de comunidades de bactérias totais e de BRS, monitoramento do pH da água, temperatura e potencial redox, presença de coliformes e os teores de elementos-traço e sulfato. Após 30 dias de funcionamento dos biorreatores, Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn estavam abaixo dos níveis aceitáveis de acordo com CONAMA (Conselho responsável qualidade da água do Brasil), e não foram detectados coliformes. Dentre as fontes de inóculo de BRS o esterco bovino proporcionou uma redução de 41% na concentração de sulfato (382,4 mg/L inicial) na água de DAM após 180 dias de tratamento. As análises moleculares por DGGE mostraram diferenças na comunidade de BRS em cada um dos tratamentos avaliados, indicando que a fonte de inóculo teve participação decisiva no tratamento da DAM. Os resultados indicaram que a metodologia de emprego de biocarvão enriquecido com populações bacterianas é eficiente na redução de elementos-traço e de sulfato em águas de DAM.

Palavras chave: Ecologia Microbiana, elementos-traço, biorremediação, mina de carvão.

ABSTRACT

Coal is the non-renewable fuel in greater abundance on the globe, responsible for much of the world's energy consumption. One of the main impacts generated by the exploitation of coal is acid mine drainage (AMD). AMD usually occurs when the mineral of interest in mining operations is associated with pyritic sulfides and iron, whose source materials, under the influence of biotic and abiotic components, cause acidification of water sources releasing potentially toxic elements in the affected ecosystems. This scenario affects the use and occupation of the land, even after ceased the mining activities. Currently, traditional methods for the mitigation and control of AMD involve procedures that have incipient results or low efficiency. In this context, this study employed innovative methodology, based on biochar and sulfate-reducing bacteria (BRS), to mitigate the acidity and the presence of contaminants in AMD waters in the coal-mining region of Criciúma, Santa Catarina, southern Brazil. Biochar, a product originated from pyrolysis, generally presents high alkalinity, high specific surface area and, therefore, high affinity for the adsorption of chemical components, while serving as niche for the colonization of microorganisms. In this study, bioreactors containing poultry-litter derived biochar (400 °C) enriched with BRS (70% of reactor volume) in a 4:1 ratio (v/v) were evaluated. BRS sources included domestic sewage sludge, AMD sediment and cow manure. The reactors were evaluated fortnightly for a period of six months. Evaluations included the characterization of communities of total bacteria and BRS, monitoring of the water pH, temperature, oxide-reduction potential, presence of coliforms and levels of trace elements and sulfate. Among the sources of BRS inoculum, cow manure stood out since it caused a 41% reduction in sulfate concentration (382.4 mg/L initial) in the water after 180 days of treatment. DGGE molecular analysis showed different BRS communities in each of the treatments tested, indicating that the inoculum source is of vital importance in AMD treatment. The results indicate that the use of biochar enriched with BRS is effective in the reduction of sulfate and trace elements in AMD waters.

Keywords: microbial ecology, trace elements, bioremediation, coal mining.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama dos produtos oriundos do beneficiamento de carvão após mineração.....	27
Figura 2: Bacia Carbonífera de Criciúma.	30
Figura 3: Rota metabólica da redução dissimilatória de sulfato.	35
Figura 4: Enriquecimento do biocarvão.....	46
Figura 5: Modelo esquemático de construção e operação dos biorreatores para tratamento de DAM.....	47
Figura 6: Valores de pH obtidos em biorreatores a base de biocarvão e bactérias redutoras de sulfato (BRS).....	55
Figura 7: Variação da temperatura em biorreatores empregados para o tratamento de DAM.....	56
Figura 8: Quantificação de sulfato em água de DAM.....	60
Figura 9: Agrupamento hierárquico obtido a partir da PCR-DGGE de bactérias totais.....	65
Figura 10: Agrupamento hierárquico obtido a partir da PCR-DGGE de bactérias redutoras de sulfato (BRS).....	67
Figura 11: Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene 16S rRNA de bactérias redutoras de sulfato.....	68
Figura 12: Número de <i>amplicons</i> totais.....	69
Figura 13: Análise de Redundância.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição e valor carbonífero dos carvões minerais	26
Tabela 2: Iniciadores selecionados para avaliar a estrutura das comunidades de bactérias totais e bactérias redutoras de sulfato, por PCR/DGGE, em biorreatores para tratamento de água de DAM.	51
Tabela 3: Parâmetros físico-químicos avaliados na água de DAM.	53
Tabela 4: Determinação dos teores de elementos-traço em água de DAM tratada em biorreatores.....	59
Tabela 5: Resultado do teste de similaridade por Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons da região do gene 16S rRNA de bactérias totais de amostras de substrato em biorreatores para o tratamento da água de DAM	66
Tabela 6: Resultado do teste de similaridade por Pairwise (pareamento) baseado nos perfis de amplicons região do gene 16S rRNA de bactérias redutoras de sulfato de amostras de substrato em biorreatores para o tratamento de água de DAM	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL – Agência Nacional de energia Elétrica
ANOSIM – Análise de dados de similaridade
ATP – Adenosina trifosfato
BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato
CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CETEM – Centro de Tecnologia Mineral
CE – Condutividade Elétrica
CO₂ – Dióxido de Carbono
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAM – Drenagem Ácida de Mina
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DGGE – Denaturing gradient gel electrophoresis
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
Eh – Potencial redox
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
GC – Guanina e Citosina
GTA – Grupo Técnico de Assessoramento
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
LD – Limite de detecção
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial Hidrogeniônico
RDA – Análise de Redundância
RNA – Ácido Ribonucleico
UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
USBR - Upflow sludge bed reactor
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1 Carvão Mineral.....	25
1.1.1 Composição do Carvão Mineral	25
1.1.2 Beneficiamento.....	26
1.2 Contaminação Ambiental	28
1.2.1 Drenagem Ácida de Mina (DAM).....	28
1.3 Legislação Vigente	31
1.4 Remediação de áreas contaminadas pela DAM.....	32
1.5 Bactérias redutoras de sulfato (BRS).....	33
1.6 Biocarvão.....	37
1.7 Métodos para caracterização de populações microbianas	39
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Área de coleta de água de DAM.....	45
3.2 Obtenção e enriquecimento do biocarvão.....	45
3.3 Implantação dos experimentos	46
3.4 Coleta das amostras e parâmetros avaliados.....	48
3.5 Parâmetros físico-químicos	48
3.5.1 Identificação e quantificação de elementos-traço.....	49
3.5.2 Quantificação de sulfato	49
3.6 Análises microbiológicas.....	49
3.6.1 Detecção e quantificação de bactérias termotolerantes	49
3.6.2 Monitoramento das comunidades bacterianas dos biorreatores....	50
3.7 Análises Estatísticas	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Caracterização físico-química da água de DAM	53
4.2 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos dos biorreatores no tratamento da água de DAM	54
4.2.1 Determinação do pH.....	54
4.2.2 Determinação da Temperatura.....	55
4.2.3 Determinação do Potencial Redox (Eh)	56
4.3 Determinação dos teores de elementos-traço	57
4.4 Quantificação do Sulfato	59
4.3 Análises Microbiológicas	63
4.3.1 Detecção e quantificação de bactérias termotolerantes	63

4.3.2	Caracterização da estrutura das comunidades de bactérias totais nos biorreatores por PCR-DGGE.....	63
4.3.3	Caracterização da estrutura das comunidades de bactérias redutoras de sulfato nos biorreatores por PCR-DGGE	66
4.4	Análise de Redundância (RDA).....	72
5.	CONCLUSÕES.....	75
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7.	REFERÊNCIAS.....	79

INTRODUÇÃO

O carvão mineral é um combustível fóssil sólido formado a partir da decomposição da matéria orgânica de vegetais depositados em bacias sedimentares sob influência de temperatura e pressão. A principal aplicação do carvão mineral é na produção de energia elétrica, sendo também utilizado na produção de aço, além do emprego na geração de energia térmica, necessária aos processos de produção, como secagem de produtos e fabricação de vidros. É um dos combustíveis fósseis mais abundantes na natureza, correspondendo a 27 % da matriz energética mundial, perdendo apenas para o petróleo, com 33 %. O carvão mineral ocupa o primeiro lugar entre os combustíveis fósseis na perspectiva de vida útil, sendo, em longo prazo, a mais importante reserva energética mundial (BORBA, 2001; ZHENGFU *et al.*, 2010).

No Brasil, a utilização do carvão mineral segue a tendência mundial, ou seja, é utilizado principalmente para a geração de energia elétrica. As principais reservas estão situadas na região Sul, sendo suficientes para mais 500 anos de extrativismo. No entanto, apesar de sua importante contribuição na geração de energia, seus impactos ambientais têm se tornado um importante desafio (ZHENGFU *et al.*, 2010; GTA, 2012), visto que as alterações ambientais que ocorrem em decorrência da mineração são expressivas. Estes impactos podem ser resultado de várias etapas da cadeia produtiva, como a prospecção, mineração da jazida, disposição do resíduo e queima, repercutindo sobre o ar, solo e águas superficiais e subterrâneas (BARBOSA *et al.*, 2001).

Um dos principais impactos gerados pela exploração do carvão mineral é a drenagem ácida de mina (DAM), que é fruto do rejeito da atividade mineradora exposto à superfície, além da própria exposição do carvão a céu aberto, que possui na sua constituição minerais sulfetados (predominantemente pirita - FeS_2), bem como elevadas concentrações de elementos-traço. A DAM é produzida a partir da oxidação destes minerais sulfetados que, em contato com a água, formam uma solução ácida rica em ácido sulfúrico e elementos-traço dissolvidos (KONTOPOULOS, 1998). Este processo é capaz de inibir o crescimento vegetal a partir da acidificação do solo e acúmulo de elementos tóxicos, contaminar águas subterrâneas, elevar os custos do tratamento de efluentes, e danificar estruturas de metal e concreto (FRIPP *et al.*, 2000).

A disposição de rejeitos piritosos e lançamento de efluentes brutos de beneficiamento e drenagem de mina diretamente nos cursos d'água, na Bacia Carbonífera de Santa Catarina (SC), continuam

contaminando as águas (AMARAL E KREBS, 2010).

Visando enfrentar este passivo ambiental decorrente da mineração do carvão no estado de Santa Catarina, em 1993 o Ministério Público Federal propôs uma ação civil pública (processo 93.8000533-4) perante a Justiça Federal em Criciúma/SC, em desfavor as empresas carboníferas, seus diretores e sócios majoritários do Estado de Santa Catarina e da União. Nesse contexto, ao lado de tudo o que se vinha fazendo e que se continua a fazer para a recuperação das áreas terrestres, a ação civil pública visa o acompanhamento das recuperações e a cobrança de resultados (Portal da ação civil pública do carvão - <https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/>).

Dessa forma, por todo o problema ambiental gerado, aliado a pressão jurídica para que medidas efetivas de recuperação das áreas contaminadas pela mineração de carvão sejam implantadas, a necessidade de desenvolver sistemas que controlem essa problemática é cada vez mais necessária (BORBA, 2001).

Atualmente, o controle da DAM é predominantemente realizado pela remediação em onerosos processos ativos de tratamento, que envolvem a neutralização do efluente com hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio (MENEZES, 2009). Devido ao alto custo destas formas de tratamentos, conforme Rizzo e Leite (2004), os métodos biológicos têm se apresentado como alternativas aos tratamentos clássicos empregados.

A utilização de Bactérias Redutoras de Sulfato nesse tipo de tratamento pode ser uma alternativa muito eficaz (COSTA, 2012). O nome “bactéria redutora de sulfato” é convencionalmente reservado para microrganismos que proporcionam a redução dissimilatória do sulfato. Nesse processo o íon sulfato é utilizado como acceptor final de elétrons e o H₂S formado é excretado (GOTTSCHALK, 2012). O H₂S excretado pode reagir com os elementos-traço presentes no efluente, formando sulfetos insolúveis (CORTES, 2005), o que pode facilitar a remoção dos teores destes elementos contaminantes da água.

Considerando, portanto, a participação das BRS na redução de sulfato e na remoção de elementos-traço do efluente, a estratégia visando a utilização destes microrganismos, associadas à uma matriz sólida de biocarvão, que, além de permitir o estabelecimento de comunidades bacterianas, tem grande potencial como barreira reativa permeável (BARBOSA, 2013), poderá ser uma das alternativas para a minimização dos problemas associados à DAM.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Carvão Mineral

O carvão mineral é o combustível não renovável de maior abundância no globo terrestre, sendo o de maior disponibilidade no mundo (ANEEL, 2008). O carvão vem sendo conhecido pelo homem desde os primórdios da civilização. Registros romanos antigos mostram que populações da Gália já utilizavam o combustível a 80 anos A.C. Os saxões usavam carvão no aquecimento doméstico e iluminação em terras britânicas, e os chineses já mineravam a rocha sedimentar (Minas de Chengi) muitos séculos antes de Cristo (GOMES *et al.*, 2003).

Segundo o Balanço Energético Nacional (2003), o carvão é responsável por cerca de 7,9% de todo o consumo mundial de energia e de 39,1 % de toda a energia elétrica gerada. Segundo a ANEEL (2008), as reservas mundiais totalizam 847,5 bilhões de toneladas. Já as reservas brasileiras ocupam o 10^o lugar no ranking mundial, totalizando 7 bilhões de toneladas, correspondendo a menos de 1% das reservas totais mundiais (ANEEL, 2008).

1.1.1 Composição do Carvão Mineral

O carvão é formado por carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre e outros elementos-traço, estando normalmente associado a rochas (como arenito, siltito, folhetos e diamictitos) e minerais como a pirita (FeS₂) (AMARAL FILHO, 2009).

Considerando o teor de carbono na sua formação, o carvão é classificado de acordo com sua qualidade em: (i) turfa, de baixo conteúdo carbonífero, que constitui um dos primeiros estágios do carvão com teor de carbono na ordem de 55-65 %; (ii) linhito, que apresenta teor de carbono variando entre 65 e 80 %; (iii) carvão do tipo hulha (betuminoso e sub-betuminoso) que contém entre 80 e 93 % de carbono; e (iv) antracito, o mais puro dos carvões, que apresenta um teor de carbono superior a 93 % (SCHUMANN, 1985). A tabela 1 apresenta a composição e o valor carbonífero dos carvões minerais.

A Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL, 2008) prevê que a produção e o consumo mundial concentram-se nos carvões dos tipos hulha, tanto betuminoso quanto sub-betuminoso, e linhito, e que as reservas brasileiras se concentram predominantemente em carvão dos tipos linhito e sub-betuminoso.

Tabela 1: Composição e valor carbonífero dos carvões minerais

Carvão	Valor calorífico (cal/g)	% de Carbono
Turfa	1.500 - 2.000	55 – 65 %
Linhito	2.000 – 7.000	65 – 80 %
Hulha	7.000 – 8.500	80 – 93 %
Antracito	8.500 – 9.000	93 – 98 %

Fonte: Adaptado de SCHUMANN, 1985.

As principais reservas brasileiras situam-se nos estados do Rio Grande do Sul (89,25%), Santa Catarina (10,41%), Paraná (0,32%) e São Paulo (0,002%) (ANEEL, 2008), sendo que somente a jazida de Candiota no RS possui 38% de todo o carvão nacional (Figura 1).

Como característica geral, referente às propriedades coqueificantes, os carvões da região sul são denominados comercialmente como alto-voláteis (OSÓRIO *et al.*, 2008). A maior parte do carvão riograndense é do tipo betuminoso alto volátil C, enquanto o carvão catarinense é do tipo betuminoso alto volátil A, considerado de melhor qualidade (FRANCO e MARIMON, 2008).

Apesar da melhor qualidade do carvão de Santa Catarina, segundo o Balanço Energético Nacional (2003), de forma geral, o uso energético do carvão mineral ainda é bastante restrito, representando apenas 6,6% da matriz energética brasileira. Entre outras restrições, os altos teores de cinza e enxofre (da ordem de 50% e 2,5%, respectivamente) são os principais responsáveis pelo baixo índice de aproveitamento do carvão no Brasil. Conforme Osório *et al.* (2008), o carvão extraído no Rio Grande do Sul possui em torno de 1% de enxofre, enquanto que o de Santa Catarina (SC) tem cerca de 4%, e o do Paraná 7%. Devido à associação com a matéria mineral, os carvões nacionais necessitam passar por um processo conhecido como beneficiamento para que sejam efetivamente utilizados (SAMPAIO e TAVARES, 2005).

1.1.2 Beneficiamento

Especificamente na região Sul de Santa Catarina, o carvão é obtido a partir de minas a céu aberto, subterrâneas e também em instalações de beneficiamento de antigos depósitos de rejeitos que se encontram na região. Na maioria dos casos, os constituintes orgânicos não se encontram suficientemente concentrados para sua utilização direta, necessitando de algum tipo de beneficiamento (AMARAL

FILHO, 2009). O beneficiamento, portanto, tem como objetivo separar o rejeito, sem valor econômico, do carvão.

Conforme Feil e Kliemann Neto (2008), na operação de beneficiamento de carvão mineral há a separação de duas fases distintas: carvão (menos densa) e rejeito (mais densa). Estas fases são obtidas por diferença densimétrica entre elas, geralmente em meio aquoso, para facilitar a estratificação das camadas dispostas. A separação se dá segundo sua maior ou menor densidade, separando-se na parte final do equipamento de concentração. A figura 2 apresenta um diagrama que mostra os produtos oriundos do beneficiamento do carvão retirado da jazida (SCHNEIDER, 2006).

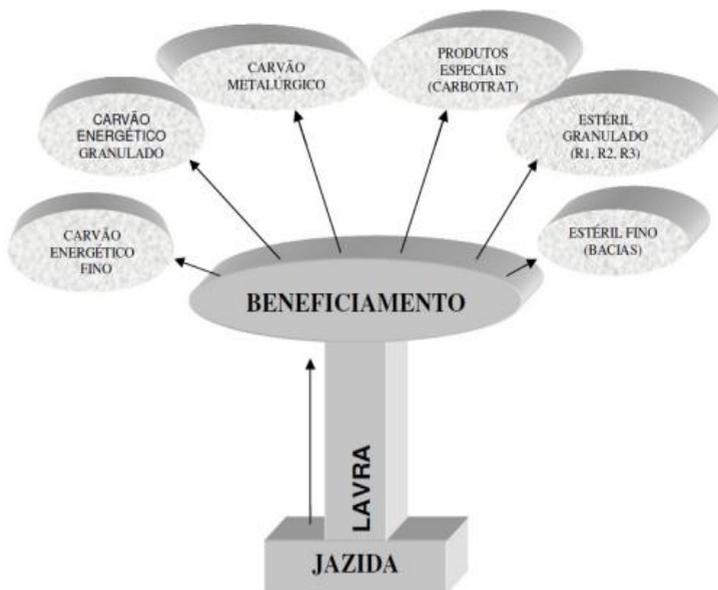


Figura 1: Diagrama dos produtos oriundos do beneficiamento de carvão após mineração.

Fonte: SCHNEIDER, 2006.

O processo de beneficiamento gera rejeitos sólidos, sendo a quantidade de rejeito gerada inversamente proporcional à qualidade do carvão. Esses rejeitos são normalmente depositados no local do processamento, gerando extensas áreas cobertas por rejeito. Para se ter uma ideia da dimensão do problema, estima-se que no processo de

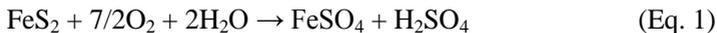
beneficiamento do carvão mineral no Brasil, de cada 1000 kg de material minerado, aproximadamente 600 kg é composto por rejeitos que são depositados no entorno da área minerada (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Seguindo as mesmas proporções, conforme afirma Menezes (2009), em Santa Catarina tipicamente 40 a 70% da produção é descartada como rejeito, e, conseqüentemente, gera um passivo ambiental envolvendo milhões de toneladas de rejeito de carvão contendo enxofre, cinzas e elementos-traço. Essas pilhas de rejeito são percoladas pelas águas pluviais, ocasionando a contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas, produzindo a drenagem ácida de mina (ANEEL, 2008).

1.2 Contaminação Ambiental

1.2.1 Drenagem Ácida de Mina (DAM)

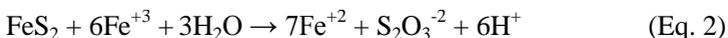
A Drenagem Ácida de Mina (DAM) é um grave problema. No Brasil, principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, a mineração de carvão tem causado sérios impactos devido ao grande volume de DAM gerado. Esse processo ocorre quando a pirita (FeS₂), principal componente das pilhas de rejeito do beneficiamento do carvão, e outros minerais sulfetados, são oxidados espontaneamente, devido à presença de oxigênio e água, produzindo ácido sulfúrico, o que leva a uma redução do pH do ambiente, e, conseqüente solubilização dos elementos-traço presentes (NORDWICK *et al.*, 2003).

De acordo com Silver (1985), a pirita é oxidada na presença de bactérias (Eq. 1), formando ácido sulfúrico e solubilizando sulfato férrico em pH inferior a 3,5.



De modo mais minucioso, as etapas de formação da DAM são dadas pelas reações abaixo (ALMEIDA, 2005):

A oxidação do mineral sulfetado (pirita) pode ocorrer de forma abiótica (Eq 2). Contudo, a velocidade da reação pode ser aumentada na presença de certos procariotos litotróficos.

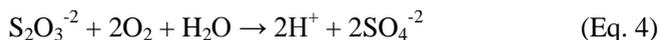


Esses microrganismos aceleram a oxidação do mineral pela geração do íon férrico (Eq. 3). Esta reação requer oxigênio

fundamentalmente biológico, isto é, produzido por microrganismos, e $\text{pH} < 4,0$. A existência de bactérias como *Acidithiobacillus ferrooxidans* no ambiente, as quais usam enxofre elementar como fonte de energia, liberando ácido sulfúrico, e oxidando Fe^{+2} até Fe^{+3} realimentam o sistema, fornecendo Fe^{+3} para a oxidação da pirita. Desta forma, essas bactérias catalisam a reação, aumentando a razão de oxidação em até 5 a 6 vezes (CHI *et al.*, 2006), sendo de fundamental relevância na geração da DAM.



Desta forma, algumas espécies podem oxidar o tiosulfato (produto da oxidação da pirita), assim como outros compostos inorgânicos de enxofre e enxofre elementar, produzindo ácido sulfúrico (Eq. 4).



O Fe^{3+} irá hidrolisar precipitando na forma de hidróxido e gerando acidez (Eq. 5):



O baixo pH da água aumenta a solubilização de elementos-traço. Na região carbonífera de Santa Catarina existem numerosas formações de DAM com pH entre 1,5 a 3,0, o que por si só explica a grande quantidade de elementos-traço dissolvidos nessas águas (AMARAL e KREBS, 2010). No caso da mineração de carvão, além do ferro, a DAM apresenta altos valores de alumínio, magnésio e zinco, podendo também apresentar traços de cobre, níquel, cromo, chumbo e outros elementos-traço (MENEZES, 2009). As concentrações desses elementos dependem, no entanto, de condições geológicas específicas (FUNGARO e DE CIZIDORO, 2006).

Segundo Johnson e Hallberg (2003), a contaminação ocorre quando águas drenadas de minas lixiviam os minerais presentes no resíduo, produzindo um percolado rico em elementos-traço dissolvidos, além de H_2SO_4 . Caso este percolado alcance corpos hídricos localizados nas proximidades, pode torná-los impróprios para o uso por um longo tempo, mesmo depois de cessadas as atividades de mineração.

Os elementos-traço não são biodegradáveis e seu ciclo natural envolve os recursos hídricos. Seus efeitos negativos são marcantes, pois

Fonte: Portal da Ação civil Pública do Carvão (<https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/>).

Conforme Menezes (2009), na região são gerados 50m³/h de DAM com pH próximo a 2,8 e concentrações médias de Fe, Al, Mn e Zn de 5.500, 720, 72 e 50 (mg/L), respectivamente. Anualmente, são lançadas no ambiente aproximadamente 6.600 toneladas de ácido sulfúrico, 2.500 toneladas de ferro, 315 toneladas de alumínio, 31 toneladas de manganês e 22 toneladas de zinco.

As múltiplas combinações de acidez e íons metálicos fazem com que cada efluente de mineração seja único e, portanto, o tratamento adequado varie de sítio para sítio (FUNGARO e DE CIZIDORO, 2006), de forma a obedecer à legislação em vigência.

1.3 Legislação Vigente

Conforme o Portal da ação civil pública do carvão, a mineração do carvão gerou uma enorme degradação ambiental. De forma a enfrentar o passivo ambiental decorrente da mineração do carvão, em 1993 o Ministério Público Federal propôs uma ação civil pública (processo 93.8000533-4) perante a Justiça Federal em Criciúma/SC, em desfavor das empresas carboníferas, seus diretores e sócios majoritários do Estado de Santa Catarina e da União.

A remediação dos passivos ambientais está sendo realizada como resultado desta ação, visando recuperar 5.098 hectares distribuídos em 217 áreas mineradas, bocas de mina abandonadas, e os recursos hídricos de três bacias hidrográficas (bacias dos rios Araranguá, Urussanga e Tubarão), incluindo as águas subterrâneas (GTA, 2011).

Como forma de avaliar a eficácia dos trabalhos de recuperação e controle ambiental, bem como o cumprimento das metas estabelecidas, são elaborados anualmente Relatórios de Indicadores Ambientais, organizados pelo Grupo Técnico de Assessoramento à Execução da Sentença (GTA), sendo apresentados ao Ministério Público Federal (MPF), ao Juízo e à Sociedade. Os relatórios contêm os resultados do conjunto de indicadores ambientais que compreendem o monitoramento dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos, da cobertura do solo e do meio biótico, realizados na Bacia Carbonífera de Santa Catarina, incluindo os laudos de análises físico-químicas do monitoramento dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos (Portal da ação civil Pública - <https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/>).

O principal aspecto ambiental abordado nos relatórios é a geração de drenagem ácida de mina (DAM), responsável pela degradação dos

recursos hídricos. O monitoramento das bocas de minas abandonadas que continuam gerando drenagem ácida é parte integrante do Programa de Recuperação Ambiental. Neste, já foram cadastradas, de forma sistemática, 809 bocas de minas abandonadas, sendo que 192 destas geram drenagem ácida.

A área monitorada abrange a Bacia Carbonífera de Santa Catarina, ao Sul do Estado, e conta com aproximadamente 195 mil hectares. Esta região intercepta parte das bacias hidrográficas dos rios Araranguá, Urussanga e Tubarão, e abrange 17 municípios do sul do estado.

Dessa maneira, em torno de toda a problemática gerada, estratégias para recuperação dessas áreas necessitam ser desenvolvidas, visando o controle da DAM, bem como a remediação das áreas degradadas pela atividade de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina.

1.4 Remediação de áreas contaminadas pela DAM

As metodologias de atenuação dos efeitos oriundos da DAM são divididas entre aquelas que tentam controlar o problema na fonte, evitando a formação da condição ácida, ou aquelas que atuam como controladores da migração dos elementos responsáveis pelas alterações ambientais. Segundo Kontopoulos (1998), os métodos de controle da DAM podem ser classificados como preventivos, de contenção e remediação.

Os métodos preventivos incluem a remoção/isolamento de sulfetos, exclusão de oxigênio por cobertura seca, uso de aditivos alcalinos e emprego de bactericidas. Esses procedimentos visam evitar que ocorra a oxidação do sulfeto metálico e, conseqüentemente, a geração de DAM (MENEZES, 2009). Por outro lado, conforme o autor, os métodos de contenção incluem a prevenção do fluxo de água e o emprego de paredes reativas porosas e de estruturas de contenção.

Caso técnicas de prevenção não sejam totalmente viáveis ou efetivas, serão adotadas as metodologias de remediação da DAM. Segundo Johnson e Hallberg (2005), as formas de remediação são classificadas em bióticas e abióticas, podendo ser tanto ativas quanto passivas. Sistemas passivos incluem os filtros de calcário, dreno anóxico de calcário e banhados construídos. Já nos sistemas ativos estão os processos de neutralização/precipitação seguidos pela separação sólido/líquido (MENEZES, 2009). O alto custo dos reagentes químicos

(que tem inviabilizado o uso da precipitação para tratamento da DAM), a baixa eficiência na remoção de sulfato, e a produção de lodo que deve ter disposição adequada, são fatores que trazem grandes desvantagens para estes processos (GARCIA *et al.*, 2001).

Neste contexto, buscando alternativas cada vez mais eficazes de remediação, alguns trabalhos têm indicado o alto potencial da participação de comunidades microbianas no processo de mitigação da DAM, sendo estes também classificados como sistemas ativos (GIBERT *et al.*, 2002; USEPA, 2006; BARTON e HAMILTON, 2007). Dentre as comunidades microbianas selecionadas para o tratamento da DAM, destacam-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS), descritas como uma possibilidade de tratamento biológico eficiente e economicamente viável (HERRERA *et al.*, 1997). O destaque para este tipo de tratamento é a redução de sulfato, que corrige a acidez juntamente com a remoção de sulfato e elementos-traço (CUNHA, 2014).

Os tratamentos biológicos podem adotar diferentes metodologias. A concepção de reatores com células imobilizadas apresenta-se como uma alternativa viável para o tratamento de efluentes (ZAIAT, 2003). O reator de leito fixo e fluxo ascendente é bastante utilizado para analisar o crescimento de BRS em anaerobiose devido à grande área superficial que serve de suporte para os microrganismos, como o tempo reduzido para ocorrência das reações (BERNARDEZ *et al.*, 2008). Elevada produtividade volumétrica foi constatada em biorreatores de leito fixo quando comparados a outras configurações (RAMOS, 2013). Este modelo de reator consiste em um tanque contendo material sólido, formando um leito fixo, que serve como material suporte para a imobilização de microrganismos, garantindo que o efluente, ao passar pelo leito fixo, entre em contato com a biomassa imobilizada, aumentando assim a eficiência do processo de tratamento (YOUNG, 1991).

O reator de leito fixo pode ter fluxo ascendente, descendente ou horizontal, sendo que os de fluxo descendente são mais utilizados para efluentes que contenham altas concentrações de sólidos suspensos, havendo uma menor probabilidade de entupimento em comparação aos de fluxo ascendente (SANCHEZ *et al.*, 1997).

1.5 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

A maioria das BRS conhecidas são Gram negativas mesofílicas, não formadoras de esporos, da classe δ -Proteobacteria (RAMPINELLI, *et al.*, 2007). Porém, de forma geral as BRS são um grupo diverso de

procariontes, podendo ser divididas em quatro subgrupos com base na análise das sequências de 16S rRNA: BRS Gram-positivas formadoras de esporos; BRS mesofílicas Gram-negativas; BRS termofílicas; e Archaea redutoras de sulfato (ARS) termofílicas. Todos estes grupos são caracterizados por usar o sulfato como aceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbia (CASTRO *et al.*, 2000). Dentre as BRS são compreendidos nove gêneros que, exceto pela capacidade de reduzir os íons sulfato, são biologicamente distintos (KERSTERS, 2005). Os dois gêneros mais conhecidos são *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*, sendo o primeiro o mais estudado, abrangendo nove espécies (HUBERT *et al.*, 2003).

Em geral, as BRS têm ampla distribuição, estando presentes em ambientes anaeróbios terrestres ou aquáticos. Além disso, o grupo contém representantes considerados muito versáteis em termos de colonização do ambiente. É possível encontrar BRS em ambientes considerados inóspitos, como fontes hidrotermais e domo de lama vulcânica, onde as temperaturas são elevadas, bem como em locais com alta pressão, como as fendas oceânicas e sedimentos marinhos, e em ambientes ácidos, como é o caso das áreas de DAM (ELSGAARD *et al.*, 1994).

As BRS também possuem alta versatilidade quando se refere ao pH do meio, sobrevivendo em ambientes com amplas faixas de pH (desde 5 até 9), tendo sua atividade reduzida quando o pH foge desta faixa (JONG e PARRY, 2006). Alguns autores já identificaram BRS em ambientes extremos, com pH abaixo da faixa ideal, porém, após longo tempo de adaptação tiveram sua atividade metabólica restabelecida (TANG *et al.*, 2009). A influência da temperatura é também um parâmetro importante que afeta a cinética da redução de sulfato e a atividade das BRS. Para BRS mesofílicas, a temperatura de atividade é moderada, variando entre 25 e 40 °C. Já para BRS termofílicas pode ser utilizado um ambiente mais extremo, variando a temperatura entre 50 e 70 °C (TANG *et al.*, 2009).

Considerando ampla versatilidade, as BRS representam um grupo de microrganismos de interesse no tratamento de efluentes (SARTI, 2007), pois além da capacidade de adaptação a diferentes nichos, reduzem diferentes fontes de enxofre, como sulfato, sulfito, tiosulfato e enxofre elementar (CYPIONKA, 2000).

Estas bactérias apresentam a capacidade de utilizar sulfato como aceptor final de elétrons e gás hidrogênio e diferentes compostos orgânicos, tais como lactato, acetato, propionato, alcoóis monovalentes como doadores de elétrons. Dessa forma, inicialmente as bactérias

empregam uma fonte de carbono, que é oxidada liberando elétrons e prótons. Estes compostos são transferidos para uma hidrogenase citoplasmática para gerar H_2 . O hidrogênio molecular difunde pelo periplasma onde é reoxidado liberando elétrons que são transportados pelo citocromo e em seguida transferidos pela cadeia transportadora de elétrons ao receptor final de elétrons. Os íons H^+ formados no periplasma são responsáveis pela produção de energia (ATP), e consequentemente na ativação de enzimas que atuam na redução de sulfato intracelular (Figura 4) (RAMPINELLI *et al.*, 2007). Existe uma distinção entre a redução assimilativa, em que o produto final é associado ao metabolismo das bactérias, e a redução dissimilatória do sulfato, onde o produto final é excretado.

Na redução dissimilatória, o íon sulfato atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica, da mesma forma como atua o oxigênio na respiração convencional. Uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, porém, a maior parte é excretada na forma de íons sulfeto, normalmente hidrolisados a sulfeto de hidrogênio (H_2S) livre (POSTGATE, 1984).

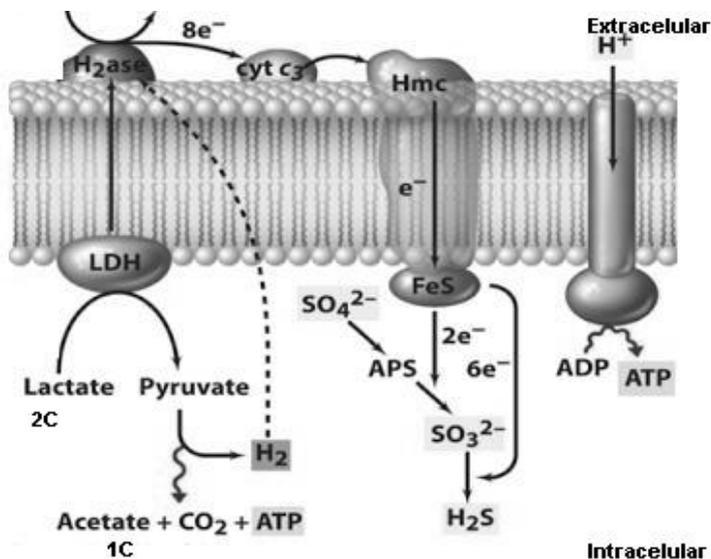


Figura 3: Rota metabólica da redução dissimilatória de sulfato em bactérias redutoras de sulfato. LDH – Lactato desidrogenase; $cyt\ C3$ – citocromo C3; H_2ase – hidrogenase; Hmc – complexo citocromo.

Fonte: MADIGAN e MARTINKO, 2006.

Com base nessas características fisiológicas, o tratamento da DAM, utilizando BRS para a redução de sulfato se mostra eficiente, proporcionando decréscimo da acidez, decorrente da redução do sulfato a sulfito (ALMEIDA, 2005), bem como a precipitação de elementos-traço na forma de sulfetos, como tem sido verificado para cobalto, cromo, cádmio, níquel e zinco (WHITE e GADD, 1996).

De forma geral, em tratamento de efluentes contendo elementos-traço, a redução de sulfato pelas BRS e consequente presença de sulfeto, podem ser vantajosas, pois os sulfetos de elementos-traço possuem solubilidade muito baixa em água, complexando e reduzindo a concentração desses metais (MOCKAITIS, 2008).

Segundo os estudos realizados na Austrália por Jong e Parry (2003) em escala piloto, o tratamento de água ácida em um biorreator de coluna anaeróbia contendo bactérias sulfato redutoras é bastante eficaz, alterando o pH de $\cong 4,0$ para cerca de 7,2, com remoção de mais de 80% do sulfato. Adicionalmente, o sistema também foi eficiente na remoção de mais de 97,5% de Cu, Zn e Ni, e mais de 82% de Fe. Além disso, o processo apresentou menores custos se comparado à neutralização por adição de uma substância alcalina.

Também em escala piloto, Xingyu *et al.* (2013) apresentaram um estudo sobre o tratamento da DAM utilizando lodo ativado, e obtiveram como resultado uma remoção de sulfato de 40%. Neste estudo a remoção de Cu foi de 60,95%, e a remoção de Fe superior a 97%, para um tempo de retenção hidráulica de 3 dias.

Diferentes fatores agem na velocidade que o sulfato será reduzido por microrganismos no ambiente. Quando o objetivo da pesquisa é avaliar a redução de sulfato por BRS em larga escala, seja para aplicar em processos de tratamento de efluentes líquidos ou em experimentos de inibição microbiana, um longo estudo da cinética de redução de sulfato em biorreatores se faz necessário (MOOSA *et al.*, 1999). Conhecimento quanto às formas de inibição das BRS fazem-se também necessários, sendo que, devido à complexação de elementos-traço citada anteriormente, a diminuição da disponibilidade de ferro para o metabolismo das BRS poderá estar inibindo a ação destas bactérias (MADIGAN *et al.*, 2004). Mais uma forma possível de inibição das BRS está relacionada ao fato de que, no ambiente natural, as bactérias redutoras de sulfato concorrem com as Archaea metanogênicas por substratos comuns que são o hidrogênio, formiato e acetato (JWH *et al.*, 1994).

Além destas possibilidades de inibição, outra característica restritiva às BRS é a necessidade de potenciais redox negativos que

propiciem condições favoráveis ao seu metabolismo. Rizzo e Leite (2004) descrevem que um dos pré-requisitos para o cultivo e crescimento de BRS, e consequente redução de sulfato, é que o potencial redox do ambiente esteja estabelecido inicialmente em torno de -100mV . No entanto, esses microrganismos podem sobreviver a longas exposições ao oxigênio, retomando sua atividade quando o ambiente redutor é restabelecido. Segundo Madigan *et al.* (2004), a própria produção de H_2S proveniente do metabolismo das BRS já seria suficiente para atingir os valores de potencial redox necessários. Assim, o potencial tem a tendência de diminuir com o passar do tempo, quando há a predominância de BRS em um cultivo microbiano, sendo que valores próximos a -200mV são aqueles considerados ideais para o bom funcionamento dessa comunidade de bactérias (SÉRVULO, 1991).

Apesar desses potenciais entraves, temos exemplos onde a utilização de bactérias redutoras na mitigação de problemas associados à DAM é viável. Porém, para a utilização destas bactérias de forma efetiva no tratamento biológico da DAM, deve-se transpor a dificuldade de estabelecer e estimular os grupos específicos de microrganismos, além de assegurar sua presença no foco da contaminação. Tal fato pode ser contornado a partir da utilização de uma matriz para imobilização das BRS, proporcionando o bioaumento dessas comunidades, associado a sua efetividade junto ao substrato que deve ser tratado. Uma alternativa de matriz para imobilização de BRS no tratamento de DAM é o biocarvão.

1.6 Biocarvão

O biocarvão, também conhecido como carvão vegetal, black carbon ou biochar, é um subproduto da queima de matéria orgânica sob condições mínimas de oxigênio (LEHMANN *et al.* 2003). É composto, portanto, pela matéria prima carbonizada, material volátil, cinzas e água (DOWNIE *et al.*, 2009). Tradicionalmente, o biocarvão tem sido utilizado em ambientes agrícolas a fim de proteger e estimular a colonização microbiana, desempenhando papéis fundamentais na disponibilização de nutrientes no solo, como fósforo, nitrogênio e enxofre, além de uma série de micronutrientes essenciais (WARNOCK *et al.*, 2007; ATKINSON *et al.*, 2010).

As estruturas químicas presentes no biocarvão são influenciadas pela temperatura de pirólise, sendo que geralmente a porosidade do biocarvão aumenta com o aumento de temperatura, até certo ponto, aumentando assim, sua área de superfície específica (BROWN *et al.*,

2006). A pirólise lenta consiste em uma sequência de reações com baixas taxas de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$) e por longo período de tempo, o que maximiza o rendimento do carvão, diminuindo as quantidades de bio-óleo e gases. Em contrapartida, a pirólise rápida empregando elevada temperatura em curto espaço de tempo ocasiona a produção de grande quantidade de vapores e aerossóis, além de carvão (LEHMANN e STEPHEN, 2012). Aliado às características de tempo e duração da pirólise, o material orgânico a ser empregado também influencia as características físico-químicas do biocarvão...

A porosidade do biocarvão é responsável pela maior parte das superfícies de cargas reativas. Estas estruturas periféricas reativas podem ser hidrofílicas, hidrofóbicas, altamente ou parcialmente reativas, sendo essa variação uma função da eletronegatividade de grupos funcionais que se ligam ao carbono das estruturas aromáticas, tais como OH, NH_2 , OR, ou O ($\text{C}=\text{O}$)R, o que gera uma heterogeneidade química de superfície (BRENNAN *et al.*, 2001).

A capacidade de troca catiônica (CTC) está relacionada à área de superfície específica, e é altamente dependente de sítios quimicamente reativos. Esses sítios são mais proeminentes em biocarvões mais velhos, quando as partículas são atacadas por microrganismos do solo, alterando as características químicas e físicas do biocarvão (COHEN-OFRI *et al.*, 2006). Talvez aí esteja a explicação do aumento da CTC do biochar com o passar dos anos em solos que contêm esse material. No Brasil, um bom exemplo do efeito benéfico do biocarvão para a fertilidade dos solos tropicais são os solos tradicionalmente conhecidos como terra preta de índio (ou terra preta arqueológica), que são solos antrópicos dos povos pré-colombianos da Bacia Amazônica (KAMPF e KERN, 2005).

O biocarvão, devido à estas características de porosidade e, conseqüentemente, a sua alta superfície específica, pode aumentar significativamente a capacidade de retenção de água, bem como promover alterações químicas e biológicas em função do surgimento de sítios quimicamente reativos e habitats de proteção para microrganismos (BRADY e WEIL, 2008). Neste contexto, o biocarvão, produto oriundo da pirólise de materiais orgânicos, pode servir como matriz reativa para a adição e incorporação de BRS (DOWNIE *et al.*, 2009).

O biocarvão interage, ainda, com o solo na adsorção de substâncias prejudiciais àquele meio (SPOKAS *et al.*, 2009). Desta maneira, quando em fragmentos muito pequenos, apresenta atividade química na sua superfície no sentido de adsorver compostos orgânicos solúveis, podendo servir também como abrigo para microrganismos do solo (BENITES *et al.*, 2005). Considerando tais especificidades, o

biocarvão tem sido utilizado com sucesso para imobilização de poluentes orgânicos e inorgânicos em solos poluídos (MAO *et al.*, 2012).

Unindo as premissas acima descritas, em que o biocarvão, além de servir como matriz para a imobilização de microrganismos (BENITES *et al.*, 2005), atua na adsorção de elementos-traço (MAO *et al.*, 2012) e na alcalinização do meio (VAN ZWIETEN *et al.* 2010). Além disso, deve-se considerar que a eficiência do tratamento biológico de efluentes com elevadas concentrações de sulfato é influenciada diretamente pelo volume de biomassa e pela estrutura da comunidade de BRS no interior do biorreator (BARBOSA, 2013). Dessa forma, o biocarvão poderá complementar esse processo, aumentando o tempo de contato das BRS com o efluente a ser tratado, servindo, portanto, como alternativa no tratamento de ambientes impactados pela mineração do carvão.

1.7 Métodos para caracterização de populações microbianas

Os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada que se conhece. Tradicionalmente, a detecção e identificação de bactérias eram feitas tomando-se como base suas formas de obtenção de carbono e energia, suas exigências nutricionais, e o emprego de meios de cultivo seletivo para seu crescimento. No entanto, apesar de haverem avanços, a utilização dessas metodologias fornece informações limitadas, devido ao fato de que ainda não é possível cultivar a grande maioria das espécies bacterianas em condições laboratoriais (BAKONYI *et al.*, 2003).

Como alternativas para sanar as dificuldades desses métodos de identificação, foram desenvolvidas várias técnicas, dentre as quais se destacam aquelas baseadas na detecção e/ou amplificação de ácidos nucleicos (REIS JUNIOR *et al.*, 2002). Os métodos moleculares, em oposição aos métodos clássicos, utilizam a caracterização de certos genes do genoma bacteriano, permitindo a identificação e o monitoramento mais eficazes dos microrganismos responsáveis por determinado processo, sem a necessidade do cultivo (DALY *et al.*, 2000 apud CORTEZ, 2009). Sendo assim, para a avaliação de comunidades microbianas tidas como não cultiváveis, uma alternativa é o uso de técnicas moleculares baseadas na extração direta de amostras ambientais, capazes de acessar comunidades bacterianas em seu meio natural, como, por exemplo, pela análise do gene 16S rRNA (AMANN *et al.*, 1995).

Regiões do DNA ribossomal (rRNA) são as mais utilizadas como cronômetros moleculares a fim de explorar taxonomicamente diferentes níveis de especificidade e descrever a filogenia da comunidade microbiana em diferentes habitats (ACINAS *et al.*, 2004). O uso de técnicas moleculares baseadas na análise do gene 16S rRNA para bactérias tem admitido muitos avanços no estudo de comunidades bacterianas (ANDREOTE, 2007). Conforme Amann *et al.* (1992), o estudo do gene 16S rRNA oferece vantagens consideráveis, como: (i) estar presente em todos os organismos, (ii) ser conservado estrutural e funcionalmente; (iii) apresentar tanto regiões conservadas, variáveis ou altamente variáveis; (iv) apresentar aparente ausência de transferência gênica horizontal; e (v) possuir tamanho aproximado de 1.500 nucleotídeos, o que é suficiente para a obtenção de inferências filogenéticas.

Dentre os métodos moleculares descritos na literatura para detecção e monitoramento microbiano, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis e Faloona (1987). A introdução da PCR resultou em grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA, e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma (MOLINA e TOBO, 2004).

Outra ferramenta da biologia molecular, complementar à técnica de PCR e bastante utilizada em estudos ambientais, é a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). A DGGE é uma técnica de *fingerprinting* comumente usada para avaliar a estrutura de comunidades microbianas, sendo uma análise rápida, pouco onerosa e que possibilita a avaliação simultânea de múltiplas amostras (MUYZER, 1999).

A técnica de PCR-DGGE, introduzida originalmente na ecologia microbiana por Muyzer, De Waals e Uitterlinden (1993), permite, portanto, caracterizar qualitativamente a estrutura de comunidades microbianas presentes no ambiente de interesse (HIRASAWA, 2007). Essa técnica mostra-se também como uma ferramenta eficiente na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função de alterações ambientais e/ou temporais nas amostras analisadas, principalmente para os casos onde as técnicas tradicionais de cultivo fornecem poucas respostas (FAKRUDDIN e MANNAN, 2013; CORTEZ, 2009). Todavia, a escolha de iniciadores apropriados é de extrema importância na confiabilidade dos resultados encontrados (BRESOLIN *et al.*, 2010). Pela utilização de iniciadores específicos, a

análise de PCR-DGGE permite índia estrutura da comunidade de grupos de organismos específicos de um ambiente (BATISTA, 2009).

Considerando as aplicabilidades da técnica da PCR-DGGE, Hirasawa (2007), trabalhando com estrutura de comunidade de BRS em lodo granulado em reator UASB, verificou 3 bandas constantes em todas as amostras analisadas, sendo as mesmas representativas de BRS do subgrupo Proteobacteria, determinada pelos iniciadores específicos 341CG/907R, indicando a manutenção destas comunidades bacterianas durante o tratamento neste reator.

Além da análise de *fingerprint* pela técnica de PCR-DGGE, é possível identificar os organismos representados pelas bandas no gel da DGGE a partir da excisão das bandas do gel, sequenciamento dos fragmentose, por análise comparativa às sequências dos bancos de dados, realizar a afiliação filogenética dos microrganismos (HIRASAWA, 2007).

Dentre as regiões do genoma elencadas para o desenho de iniciadores específicos, conforme Amman *et al.* (1992), o estudo do gene 16S rRNA oferece vantagens consideráveis, como: (i) estar presente em todos os organismos, (ii) ser conservado estrutural e funcionalmente; (iii) apresentar tanto regiões conservadas, variáveis ou altamente variáveis; (iv) apresentar aparente ausência de transferência horizontal de genes, e (v) possuir tamanho aproximado de 1.500 nucleotídeos, o que é suficiente para a obtenção de inferências filogenéticas.

Assim, visando as vantagens acerca da utilização do gene 16S rRNA, Maintinguer *et al.*, (2008), ao estudar a degradação anaeróbia de fenol em reatores em batelada sob condições fermentativas, e sob a utilização dos *primers* 341CG/907R, obtiveram resultados confirmatórios de que as BRS presentes no inóculo permaneceram nos reatores, apesar de terem sido operados sob condições nutricionais distintas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de biorreatores a base de biocarvão na redução de sulfato e elementos-traço em águas de drenagem ácida de mina da região carbonífera de Criciúma, SC.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de três fontes de inóculo microbiano associados a uma matriz de biocarvão na remediação de águas de DAM, a partir do monitoramento do pH, e dos teores de elementos-traço e sulfato.
- Monitorar e caracterizar as comunidades de bactérias totais e redutoras de sulfato em reatores biológicos a base de biocarvão empregados para o tratamento de águas de DAM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de coleta de água de DAM

A área da coleta da água de DAM está situada no município Lauro Muller, pertencente à região da bacia carbonífera de Criciúma, no Sul de Santa Catarina. A água de DAM a ser tratada foi coletada em área de surgência, na Mina 3G, município de Lauro Müller, SC (28° 23' 43.40'' S; 49° 27' 57.01'' W), em dezembro de 2013. A água foi acondicionada em tanques de polietileno com capacidade de 50 L e transportada até Florianópolis, SC.

Anteriormente ao início dos experimentos, uma amostra da água de DAM (500 mL) foi coletada e utilizada para a determinação de pH, temperatura, potencial redox (Eh), sulfato (SO₄), e dos elementos-traço: Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn.

3.2 Obtenção e enriquecimento do biocarvão

O biocarvão foi utilizado para a confecção dos biorreatores com o intuito de servir como matriz para imobilização das bactérias, bem como pelo seu sabido poder tamponante, além de manter o pH alcalino nos biorreatores. O biocarvão foi obtido junto à empresa SPPT Pesquisas Tecnológicas, situada Mogi Mirim, São Paulo a partir da pirólise lenta (400 °C) de cama de aviário, apresentando pH de 10,4 (em água).

Previamente à montagem dos biorreatores, foram adicionados inóculos primários de BRS ao biocarvão, materiais que tradicionalmente têm sido descritos como fontes destes grupos bacterianos, sendo os mesmos oriundos de sedimento de DAM, esterco bovino e lodo de esgoto doméstico, obtidos na região de Lauro Müller - Mina 3G, em Palhoça, e junto a CASAN-ETE Canasvieiras, Florianópolis, respectivamente (Figura 5).



Figura 4: Enriquecimento do biocarvão. A) Aspecto do sedimento liquefeito de bacia de tratamento de DAM coletado na Mina 3G, Lauro Müller, SC. B) sedimento em processo de mistura ao biocarvão. C) Aspecto geral do esterco bovino, coletado na região da Palhoça, SC, misturado ao biocarvão D) Aspecto do lodo de esgoto utilizado para montagem de experimento.

3.3 Implantação dos experimentos

Para os ensaios laboratoriais foram estruturados quatro biorreatores verticais de leito fixo e fluxo descendente. Os biorreatores foram confeccionados em recipientes plásticos com capacidade de 120 litros, tendo 70% do seu volume ocupado por uma mistura biocarvão (80%) mais fonte de inóculo de BRS (na proporção 4:1 v/v), disposto entre camadas de brita ($\frac{1}{4}$ " e areia grossa, de modo a manter uma estrutura compacta que garantisse a atividade das BRS (Figura 6).

Em cada biorreator foi instalado um bocal inferior para saída da DAM que passou pelo sistema filtrante, um ponto de coleta de substrato (abertura lateral no ponto vertical médio de cada biorreator), uma bóia elétrica para controle de nível, um aspersor, três parafusos em aço inoxidável (inferior, médio e superior) para a determinação da condutividade elétrica, que foi empregada para a determinação do

potencial redox (Eh), um reservatório para coleta de DAM que passou pelo sistema filtrante, e um sistema de bombeamento automático para realimentação dos biorreatores (Figura 6).

Os biorreatores foram acondicionados dentro da casa de vegetação, nas dependências do Grupo de Pesquisa “Microorganismos e Processos Biotecnológicos”, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, com acionamento de ventilação constante quando a temperatura ultrapassava os 28,0 °C. Como os biorreatores não possuem controlador de temperatura, a oscilação dos mesmos foi determinada de acordo com a oscilação local, variando entre 17,0 °C à noite e 37,5 °C durante os dias mais quentes. Este intervalo fica dentro da faixa mesófila (moderada) de temperatura que vai de 15-40 °C, e contempla a faixa entre 25,0 e 40,0 °C, que é ideal para o crescimento e manutenção de BRS não termofílicas, as quais são os organismos de interesse do presente estudo.

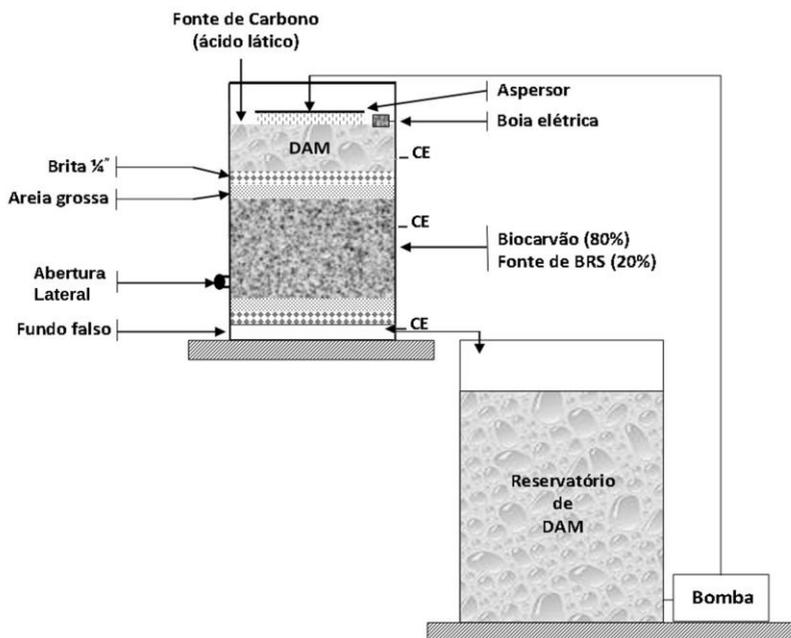


Figura 5: Modelo esquemático de construção e operação dos biorreatores para tratamento de DAM. (CE – Condutividade Elétrica).

Dessa forma, foram montados quatro biorreatores, três com biocarvão e as diferentes fontes de inóculo de BRS e um contendo apenas o biocarvão, permitindo assim avaliar a contribuição dos inóculos e do biocarvão no processo de tratamento da água de DAM.

Os biorreatores foram completados com de água de DAM, fechados e mantidos em batelada por um período de 30 dias, com o intuito de reduzir a população de coliformes fecais e microrganismos patogênicos, bem como favorecer o estabelecimento das comunidades de BRS. Após os 30 dias, os biorreatores foram drenados para a obtenção dos primeiros parâmetros de avaliação, e novamente completados com água de DAM, fechados e mantidos em funcionamento por sistema de batelada repetida e alimentada por um período de 150 dias (sendo, nesta etapa, retornada ao sistema a água que passou pelo sistema filtrante). O sistema era drenado quinzenalmente para coleta de amostras e medições de parâmetros pertinentes, sendo realimentado, conforme descrito acima, determinando, assim, um tempo de retenção hidráulica de 15 dias. Dessa forma, desde a instalação do experimento até o último dia de coleta de amostras para avaliação dos biorreatores, totalizaram 180 dias.

Em função da baixa disponibilidade de fontes de carbono nos materiais empregados nos tratamentos, o funcionamento dos biorreatores previu a adição semanal de lactato de sódio (batelada alimentada) na dosagem de 0,75 g/L semana (POSTGATE, 1984).

3.4 Coleta das amostras e parâmetros avaliados

Aos 30 dias após instalação dos biorreatores (batelada), e quinzenalmente após esse período (batelada repetida e alimentada), amostras de 500ml água de DAM foram retiradas pelos bocais inferiores dos biorreatores, amostras de 10g do filtro biológico (biocarvão + fonte de inóculo) pela abertura lateral, e feitas as mensurações de pH, temperatura da água dos biorreatores e do ambiente, e condutividade elétrica.

3.5 Parâmetros físico-químicos

A análise de pH, temperatura, e condutividade elétrica foram realizadas conforme os períodos descritos acima, no Laboratório de Diversidade Microbiana da UFSC. A determinação de pH foi realizada com pHmetro (Microprocessador pH Meter Model 99620), da temperatura

com termômetro digital, e a condutividade elétrica com um condutivímetro (Tec-4MP).

3.5.1 Identificação e quantificação de elementos-traço

Para quantificar os elementos-traço foram coletadas amostras de 250 mL de cada biorreator nos períodos mencionados. As amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno, onde se acrescentou três gotas de ácido nítrico concentrado, sendo posteriormente acondicionadas em refrigerador a 4 °C até análise. As análises foram efetuadas pelo Laboratório de Levantamento e Análise Ambiental do Centro de Ciências Agroveterinárias na Universidade do Estado De Santa Catarina, em Lages, SC. Foi realizada a determinação dos elementos-traço: Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn, quantificados pelo método de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com atomização em chama ar-acetileno e acetileno-óxido nitroso.

3.5.2 Quantificação de sulfato

Com o intuito de monitorar as concentrações de sulfato nos biorreatores, amostras de 250 mL de água de DAM foram coletadas, filtradas em papel filtro tipo Whatmann e armazenadas em frascos tipo amber de 250 mL, congeladas em freezer a -20 °C até análise. As análises foram efetuadas pelo Laboratório de Levantamento e Análise Ambiental do Centro de Ciências Agroveterinárias na Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages, SC. Para quantificação do sulfato das amostras coletadas foi utilizado o método turbidimétrico com precipitação com BaCl₂ (TABATABAI, 1974).

3.6 Análises microbiológicas

3.6.1 Detecção e quantificação de bactérias termotolerantes

Uma vez que na metodologia de tratamento de DAM utilizaram-se fontes de BRS oriundas de substratos como esterco bovino e lodo de esgoto doméstico, fez-se necessário o acompanhamento e determinação da contaminação fecal para possível liberação e uso do sistema em larga escala.

Para análise das bactérias termotolerantes foram coletadas amostras de 100 mL de água de DAM da saída dos biorreatores, aos 30

dias após a implementação dos biorreatores e ao final dos experimentos (180 dias), sendo os frascos mantidos refrigerados até as análises.

As análises foram realizadas no Laboratório de Diversidade Microbiana do Solo da UFSC, e a metodologia utilizada foi dos tubos múltiplos, determinando-se o Número Mais Provável (NMP 100 mL⁻¹) de bactérias, baseada no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (WAY, 2012), a qual é preconizada pela vigilância sanitária e outros órgãos regulamentadores. A verificação da presença e redução de microrganismos termotolerantes (fecais) com potencial patogênico se deu pela metodologia de Número Mais Provável, com a utilização de meios de cultura específicos (Caldos Lauril Triptose, Verde Brilhante e EC).

3.6.2 Monitoramento das comunidades bacterianas dos biorreatores

Como forma de avaliar o potencial do biocarvão como matriz para imobilização de bactérias, bem como a seleção de comunidades bacterianas nos biorreatores ao longo do tempo, amostras do substrato foram coletadas a cada quinze dias pela inserção de um amostrador helicoidal através da abertura lateral no ponto vertical médio de cada biorreator.

Previamente ao uso, o amostrador foi desinfetado com álcool 96° GL e esterilizado via flambagem com maçarico portátil. Uma vez coletadas, as amostras foram imediatamente transferidas para tubos de 2 mL e acondicionadas em freezer a -20 °C até a análise, que foi realizada no Laboratório de Diversidade Microbiana da UFSC.

A extração de DNA das amostras dos biorreatores, bem como das fontes de enriquecimento de BRS (inóculo inicial) e do biocarvão (controle), foi realizada utilizando-se o kit “PowerSoil DNA Isolation Kit” (MOBIO Laboratories Inc.), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0,8%, depois de corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria usando o equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Para a análise da estrutura das comunidades de bactérias totais, a região V3 do gene 16S rRNA de Bacteria foi amplificada com os iniciadores BAC338FGC e UN518R (Tabela 2) (ØVREÅS *et al.*, 1997). A amplificação foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U DNA polimerase Taq (Life Technologies, São Paulo,

Brasil), 0,4 µM de cada iniciador e 10 ng do DNA metagenômico, para um volume final de 25 µL. As condições no termociclador (T-100, BioRad, Hercules, CA, USA) foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C.

Para a análise da estrutura das comunidades de BRS foram utilizados os iniciadores 341FGC e 907R (Tabela 2) (NAKAGAWA *et al.*, 2002). Os reagentes e suas concentrações foram os mesmos utilizados para amplificação das bactérias totais. As condições no termociclador (T-100, BioRad, Hercules, CA, USA) foram de 5 min a 94 °C; 10 ciclos de 45 seg a 94 °C, 1 min a 62 °C e 80 seg a 72 °C; 25 ciclos de 45 seg a 94 °C, 1 min a 57 °C e 80 seg a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C.

Quantidades iguais dos produtos da PCR (200 ng) foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). O gel foi preparado com acrilamida:bisacrilamida (8% m/v e 37,5:1, m:m) e gradiente desnaturante de 15 a 55% com soluções de ureia e formamida (ØVREÅS *et al.*, 1997). A eletroforese foi feita com tampão TAE 1X a 60 °C e 200 V durante 180 min, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA). Após a eletroforese, o DNA foi corado com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a documentação dos géis feita em foto-documentador GelLogic 220Pro (Carestream Health, New York, USA).

Tabela 2: Iniciadores selecionados para avaliar a estrutura das comunidades de bactérias totais e bactérias redutoras de sulfato, por PCR/DGGE, em biorreatores para tratamento de água de DAM

Iniciadores	Bactérias	Sequências	Referências
338FGC	BT ¹	5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' Grampo GC - 5' CGC CCG CCG CGC GCG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG 3'	Ovreås <i>et al.</i> , 1997
518R	BT	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	Ovreås <i>et al.</i> , 1997
341GC	BRS ²	5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' Grampo GC - 5' CCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC 3'	Nakagawa <i>et al.</i> , 2002
907R	BRS	5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3'	Nakagawa <i>et al.</i> , 2002

¹ Bactérias totais;

² Bactérias redutoras de sulfato.

3.7 Análises Estatísticas

Os perfis de *amplicons* das estruturas das comunidades bacterianas totais e redutoras de sulfato, utilizando-se marcadores para o correto alinhamento dos géis, foram avaliados com o programa *Gel Compar II* “BioNumerics 7.5” (Applied Maths), a partir da análise de agrupamento hierárquico utilizando-se o índice de *Jaccard* e o modelo de agrupamento por UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages).

Para diferenciar os grupos foram testadas as diferenças entre o valor médio de similaridade entre as amostras (*rank*) dentro dos grupos e entre os grupos, a partir da análise de similaridade (ANOSIM), através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda., 2001), a qual calcula um valor R com base na comparação dos grupos, sendo o R recalculado com base em permutações, permitindo determinar diferenças estatísticas entre os perfis de bandas.

Com o objetivo de correlacionar a variabilidade dos perfis de bandeamento de bactérias redutoras de sulfato com os atributos químicos e físicos avaliados nos quatro biorreatores, foi realizada uma análise de escala multidimensional não-métrica (*Non-metric Multidimensional Scaling – NMDS*). O resultado (cálculo das coordenadas) foi utilizado para realizar a análise de redundância (RDA) através do programa CANOCO, versão 4.55 (TER BRAAK e SMILAUER, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química da água de DAM

Na caracterização físico-química da água de DAM utilizada na alimentação dos biorreatores, pode-se observar pH ácido e Eh positivos, indicando uma água extremamente ácida e oxidada (Tabela 3), condições comuns em águas de DAM (MACHADO *et al.*, 2008; SOUZA, 2012; BRANDELERO *et al.*, 2013).

Dos elementos analisados, Fe, sulfato (SO_4^{2-}), Al^{3+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cr e Mn, foram detectados com níveis acima dos padrões de efluentes de água aceitos para o Brasil (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005; CONAMA, 2011). Apenas os níveis de Cd^{2+} e Cu^{2+} ficaram abaixo dos limites de detecção (LD).

Esses resultados demonstram a problemática ambiental que a água de DAM pode provocar ao ambiente. Os efluentes ácidos e com concentrações excessivas de elementos-traço podem ser lixiviados e atingir corpos d'água, sendo assimilados no fitoplâncton e incorporados na cadeia alimentar (AMARAEL e KREBS, 2010).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos avaliados na água de DAM coletada da mina 3G no município de Lauro Müller, Santa Catarina

Parâmetros avaliados	DAM inicial	30 - 180 dias de tratamento	CONAMA
pH	2,7	Média: 7,8	5 à 9
Eh (mV)	200	Média: 58	-
Temperatura (°C)	24,5	Média: 29,5	-
Al^{3+} (mg/L)	1295	<LD	0,1
Cd^{2+} (mg/L)	<0,1	<LD	0,2
Cr (total) (mg/L)	0,3	<LD	0,005
Cu^{2+} (mg/L)	<0,1	<LD	1
Fe (total) (mg/ L)	2460	<LD	15
Mn (total) (mg/L)	120	<LD	1
Pb^{2+} (mg/L)	1,2	<LD	0,5
Zn^{2+} (mg/L)	19	<LD	5

*Eh - potencial redox.

Dessa forma, frente à caracterização da água de DAM da mina 3G no município de Lauro Müller, e a problemática ambiental desencadeada pela contaminação ambiental com esse efluente, evidencia-se a importância do desenvolvimento de projetos para o tratamento da água de DAM, bem como na remediação de áreas já contaminadas com esse efluente, focando principalmente na redução da acidez, remoção de elementos-traço e dos níveis de sulfato, previamente à sua liberação no ambiente.

4.2 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos dos biorreatores no tratamento da água de DAM

4.2.1 Determinação do pH

Após 30 dias de operação dos biorreatores em batelada houve um aumento expressivo do pH da água de DAM, estabilizando-se entre 7,4 e 8,3 (Figura 7), e mantendo-se assim até o final da condução dos experimentos, independente do tratamento. Esses resultados evidenciam os efeitos alcalinizantes e tamponantes do biocarvão (VAN ZWIETEN *et al.*, 2010), o qual, quando avaliado previamente à montagem dos biorreatores apresentou pH 10,4, importante para criar um equilíbrio entre o adsorvente e o adsorbato nos biorreatores, bem como proporcionou condições ideais de pH para a atividade das BRS.

A faixa de pH mais comumente empregada para o crescimento de BRS é de 7,2 a 7,6. Por outro lado, estudos indicam que as BRS conseguem sobreviver em ambientes com pH entre 5 e 9 (RIZZO e LEITE, 2004; JONG e PARRY, 2006). Desta forma, a manutenção do pH alcalino ao longo dos experimentos (30-180 dias) foi essencial para a atividade das BRS nos biorreatores.

Além da importância do pH para a manutenção das populações de BRS, a alcalinização da água de DAM é importante para a precipitação de elementos-traço. Possa e Santos (2003) sugerem que o primeiro passo do tratamento de água de DAM consiste em neutralizar a acidez da drenagem com a adição de uma quantidade de álcalis suficiente para elevar o pH. O fornecimento de íons hidroxila (OH^-) permite uma reação com os íons metálicos dissolvidos na água. O pH requerido para precipitar a maioria dos elementos-traço da água varia de 6 a 9, com exceção do hidróxido férrico que precipita em pH 3,5 e do hidróxido de alumínio em pH 5,5 (POSSA e SANTOS, 2003).

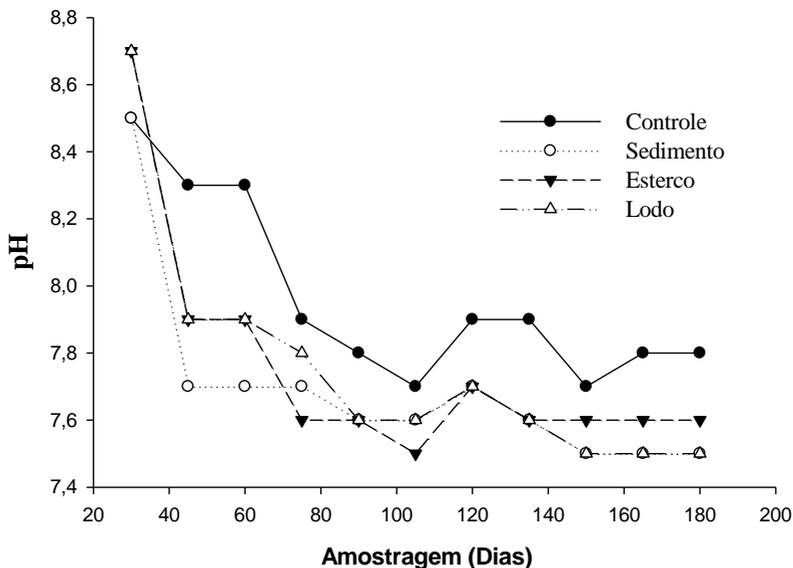


Figura 6: Valores de pH obtidos em biorreatores a base de biocarvão e bactérias redutoras de sulfato (BRS). Sedimento, esterco e lodo referem-se às fontes de inóculo de BRS, enquanto o controle indica não adição de BRS.

4.2.2 Determinação da Temperatura

A temperatura tem grande influência no crescimento de microrganismos. Em temperaturas mais favoráveis ao crescimento o número de divisões celulares, mensurado pela velocidade de crescimento, geralmente dobra (PELCZAR, 1996). A temperatura ótima de crescimento e atividade das BRS fica entre 25 e 40 °C. Já para BRS termofílicas pode ser utilizado um ambiente mais extremo, variando a temperatura entre 50 e 70 °C (TANG *et al.*, 2009).

A temperatura dos biorreatores, que no início dos experimentos estava entre 34 e 38 °C sofreu uma redução gradativa ao longo do tempo, estabilizando na faixa entre 28,0 a 30,0 °C após 90 dias de condução dos experimentos (Figura 8).

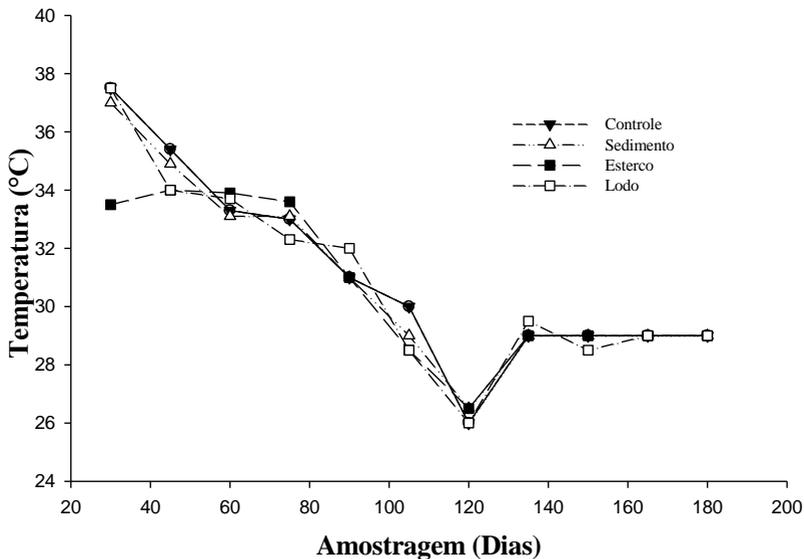


Figura 7: Variação da temperatura em biorreatores empregados para o tratamento de DAM a base de biocarvão e bactérias redutoras de sulfato (BRS). Sedimento, esterco e lodo referem-se às fontes de inóculo de BRS, enquanto o controle é sem a adição de BRS.

Estas condições são parecidas com as condições que provavelmente ocorrerão em campo, sendo condizente com uma seleção de um inóculo resistente a estas oscilações. Vale salientar ainda, que se tratando de um sistema de consórcio de bactérias, estas oscilações podem ser inclusive proveitosas, estimulando grupos distintos em diferentes momentos, o que eventualmente pode ser importante para o processo como um todo.

4.2.3 Determinação do Potencial Redox (Eh)

As BRS, apesar de serem considerados microrganismos anaeróbios, apresentam certa tolerância ao oxigênio (MEDIRCIO, 2004). Rizzo e Leite (2004) descrevem que um dos pré-requisitos para o cultivo e crescimento de BRS, e conseqüente redução de sulfato, é que o potencial redox seja negativo. Descrevem ainda que esses organismos necessitam de condições redutoras específicas para que possam efetivamente reduzir o sulfato e gerar as transformações esperadas. Os valores ideais de Eh para que essas reações ocorram devem ficar abaixo de -100 mV. No entanto, esses microrganismos podem sobreviver a

longas exposições ao oxigênio, retomando sua atividade quando o ambiente redutor é restabelecido.

A determinação do Eh pode se dar diretamente pela leitura do potencial redox, ou então pela determinação da condutividade elétrica. A condutividade elétrica é a capacidade que a água possui de conduzir corrente elétrica. Este parâmetro está relacionado com a presença de íons (partículas carregadas eletricamente) dissolvidos na água (MOLIN, 2011).

Os valores de Eh obtidos por Souza (2012) em água de drenagem ácida de mina, na região de oxidação no município de Forquilha/SC, estiveram em torno de +600mV, ou seja, muito acima daquilo considerado ideal. A DAM utilizada no presente experimento apresentou valores de Eh inicial em torno de +200 mV, também bastante distante do ideal. A partir do período de incubação, os valores obtidos nos biorreatores variaram de -40,8 a -73,0 mV, o que demonstra que os sistemas evoluíram para condições mais favoráveis, aproximando-se do valor originalmente almejado.

A própria produção de sulfeto pelas BRS já seria suficiente para atingir os valores de Eh necessários. Porém, as condições ideais podem ser atingidas com a adição de agentes redutores como ditionato de sódio, ascorbato de sódio e tioglicolato de sódio (GIBSON, 1990). Entretanto, o tioglicolato de sódio em altas concentrações pode inibir o crescimento de algumas espécies de BRS (MADIGAN *et al.*, 2004). Vale ressaltar que essa alternativa é apenas paliativa e prática em experimentos de avaliação com monitoramento constante. Em condições de campo esse nível de oxido-redução deve ser obtido com os substratos e reações participantes do sistema.

4.3 Determinação dos teores de elementos-traço

Embora o tratamento de efluentes seja complexo quando compostos por uma mistura de elementos com diferenças de solubilidade (WEBER, 1972), neste estudo, empregando biorreatores a base de biocarvão e BRS, os níveis de elementos-traço solúveis na água DAM, independente do tratamento utilizado, foram reduzidos desde os 30 dias de experimento, sendo esse padrão mantido durante os 180 dias. As reduções dos níveis de elementos-traço foram tão eficientes que em nenhuma das leituras realizadas foram detectados valores acima do limite de detecção operacional, que, concomitantemente, ficaram abaixo do limite máximo estabelecido pela resolução (Tabela 4).

Considerando que o biocarvão é conhecido pelo poder de adsorção de oligoelementos (SWIATKOWSKI *et al.*, 2004), este resultado pode ser reflexo direto da interação dos elementos-traço com o biocarvão, que se apresentou como um excelente componente de inativação desses elementos presentes na água de DAM.

Em pesquisa com biocarvão obtido pela pirólise de bagaço de cana de açúcar, objetivando a remoção de elementos-traço de águas subterrâneas, o biocarvão apresentou potencial como material reativo em uma barreira permeável construída. Mesmo com baixa área superficial, a composição química superficial propiciou a retenção, principalmente de Pb, Cu e Cr (BARBOSA, 2013). Esses resultados corroboram com os resultados experimentais obtidos e demonstram o efeito reativo do biocarvão. O biocarvão possui elevada superfície específica e porosidade, o que pode explicar o aumento de sua área superficial, sua maior capacidade de sorção, bem como seu potencial como matriz para imobilização de biomassa. Além disso, em sistemas de subsuperfície (tratamento de águas não subterrâneas), como é o caso do modelo dos biorreatores empregados nesse estudo, o biocarvão têm a capacidade de gerar alcalinidade, condição essencial para o tratamento de água de DAM, pois permite a precipitação de elementos-traço, bem como condições ideais para a ação das BRS (MANYA 2012). Apesar da eficiência comprovada de adsorção de elementos-traço, vários fatores podem afetar esse processo, tais como a estrutura molecular ou natureza do adsorvente, a solubilidade do soluto, o pH do meio e a temperatura (CAVALCANTE JR e AZEVEDO, 1995; MEZZARI, 2002).

O emprego de biocarvão como material adsorvente de elementos-traço é interessante por sua elevada disponibilidade, pois pode ser produzido a partir de materiais renováveis utilizados como matéria prima, possibilitando sua reutilização (KRISHNAN *et al.*, 2011). No entanto, apesar das vantagens destacadas da utilização do biocarvão no tratamento da água de DAM, cabe ressaltar que após a sua utilização como matriz adsorvente de elementos-traço, é necessária a correta destinação do biocarvão contaminado com esses elementos quando o sistema atingir a saturação (FLECK *et al.*, 2013). Devido à elevada concentração de íons metálicos, o biocarvão se torna um potencial passivo ambiental, com riscos eminentes ao meio ambiente. Uma alternativa para evitar essa problemática é realizar a regeneração do biocarvão pelo processo de dessorção, que consiste em remover os elementos-traço do biocarvão, permitindo sua reutilização.

Por meio do processo de dessorção, além da possível regeneração do material adsorvente, poderão ser recuperados alguns

elementos-traço de interesse. Deste modo, é possível operar as colunas de leito fixo em ciclos (adsorção/dessorção), etapa que pode ser alcançada com a utilização de vários agentes eluentes (sais, ácidos, bases) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Essa consideração é fundamental quando se pensa na operacionalização de sistemas contendo esse modelo experimental para tratar grandes volumes de água de DAM em campo. Com altas vazões espera-se que o elemento filtrante fique saturado em um tempo relativamente curto, o que requer um mecanismo que permite trocas desse elemento filtrante, bem como o descarte/reutilização adequados dessa matriz porosa.

Tabela 4: Determinação dos teores de elementos-traço em água de DAM tratada em biorreatores à base de biocarvão e bactérias redutoras de sulfato.

Tratamentos/ condicionantes	Teores de elementos-traço (mg/L)							
	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
LD	0,392	0,052	0,104	0,08	0,136	0,008	0,156	0,024
Controle	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Sedimento	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Esterco bovino	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Lodo de esgoto	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
ÁGUA DE DAM CONAMA 357/2005 430/2011	1295	<LD	0,3	<LD	2460	120	1,164	19,17
	0,1	0,2	0,05*	1	15	1	0,5	5

Os tratamentos referem-se as fontes de inóculo de bactérias redutoras de sulfato utilizadas em cada biorreator. (LD – Limite de detecção)

4.4 Quantificação do Sulfato

Uma das principais problemáticas no tratamento de água de DAM é a redução dos níveis de sulfato, sendo um ponto crítico na determinação do potencial de sistemas de tratamento. O sulfato da água de DAM é gerado pela oxidação de minerais sulfetados presentes em resíduos de mineração em ambientes com presença de água, oxigênio e de microrganismos acidificantes, como *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* (BATISTA, 2009).

A redução de sulfato, por sua vez, é o processo que remove os elementos sulfetados da água, auxiliando na mitigação dos problemas

relacionados à DAM, sendo mediada principalmente por microrganismos redutores de sulfato. Dentre os grupos principais nesse processo estão as BRS (ALMEIDA, 2005), as quais foram o foco desse trabalho.

Pelos resultados obtidos do tratamento da água de DAM nos biorreatores, pode-se observar reduções na concentração de sulfato no período de tratamento de 30 dias variando de 10 % (controle, sedimento e esterco) a 32 % (lodo), quando comparado com o nível inicial de sulfato na água de DAM (382,48 mg/L) que alimentou os biorreatores.

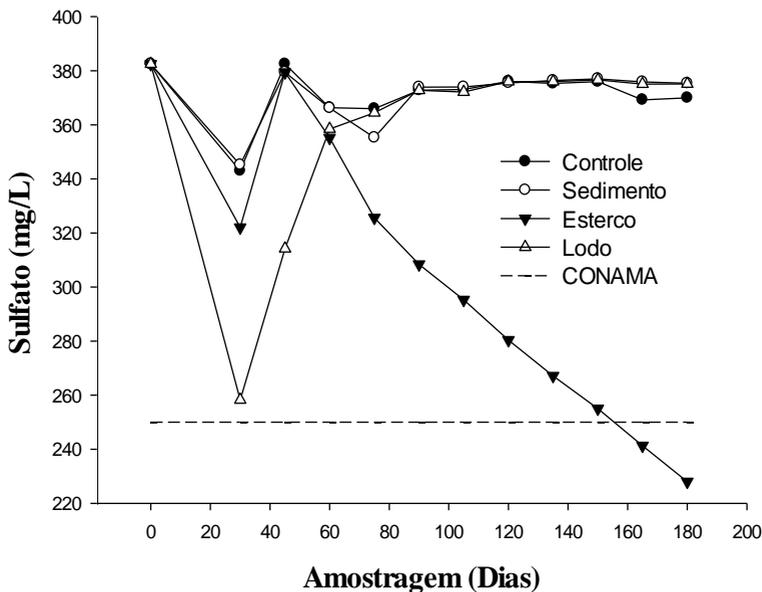


Figura 8: Quantificação de sulfato em água de DAM após os tratamentos em biorreatores a base de biocarvão e bactérias redutoras de sulfato (BRS). Sedimento, esterco e lodo referem-se às fontes de inóculo de BRS de cada tratamento, enquanto o controle é o tratamento sem a adição de BRS. CONAMA refere-se à concentração limite de sulfato para lançamento no ambiente.

Após a realimentação dos biorreatores com água de DAM para funcionamento em sistema de batelada repetida alimentada, os níveis de sulfato iniciais foram restabelecidos nos sistemas, permanecendo com esses níveis na maioria dos biorreatores ao longo dos 180 dias. Apenas o

biorreator inoculado com esterco bovino apresentou reduções significativas nos teores de sulfato.

A partir do segundo mês de operação dos reatores houve uma redução na concentração de sulfato nos tratamentos controle e com sedimento. Essa queda foi de aproximadamente 5 – 6 % (média de 361,57 mg/L), em comparação a água de DAM original. Esses tratamentos, juntamente com o biorreator contendo lodo de esgoto permaneceram estáveis (média de 371,88 mg/L) dos 90 até os 180 dias do experimento (Figura 9).

O único tratamento que diferiu desse comportamento foi o biorreator inoculado com esterco bovino, onde se pode observar, a partir dos 60 dias de funcionamento dos biorreatores, uma redução gradativa dos níveis de sulfato da água de DAM da saída do biorreator (Figura 9), chegando a 41 % de redução dos teores de sulfato quando comparado aos valores da DAM original, e 39 % em comparação à média dos demais tratamentos. Este resultado já atinge os padrões de lançamento estabelecidos pela resolução CONAMA 357/2005 (250mg/L).

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos que realizam a redução dissimilatória do íon sulfato, na qual este íon atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica (FARIAS, 2009). Os dois tratamentos com maior eficiência na redução de sulfato, lodo (mesmo que somente quando operado em batelada, aos 30 dias) e esterco, foram inoculados com elevadas cargas orgânicas, além do lactato de sódio adicionado semanalmente. Dias (2015) valorou a matéria orgânica encontrada no lodo de esgoto da Estação de tratamento anaeróbio da CASAN, localizada em Canasvieiras/Florianópolis, em 269,0 g/Kg. Já a quantidade de matéria orgânica encontrada em amostras de esterco bovino por Teixeira *et al.*, (2002), em estudo acerca da composição média de diferentes tipos de adubos, foi de 422,68 g/Kg.

Considerando que o controle e o biorreator com sedimento foram aqueles que receberam a menor carga orgânica, a baixa eficiência na redução de sulfato destes dois biorreatores pode estar relacionada a uma possível deficiência nutricional da comunidade bacteriana desses sistemas. Por outro lado, alta eficiência na redução de sulfato pelo biorreator com lodo até os 30 dias de experimento e o biorreator com esterco bovino quando o sistema foi operado em batelada repetida e alimentada pode ter sido proporcionada pela maior carga orgânica desses sistemas, sendo que elevada disponibilidade de matéria orgânica pode promover o crescimento de uma comunidade microbiana

(PEREIRA *et al.*, 2014), beneficiando o desenvolvimento e atividade das BRS e, neste caso, a redução de sulfato.

A alta eficiência na redução de sulfato demonstrada pelo biorreator enriquecido com lodo logo de esgoto aos 30 dias de operação pode ser explicada pelo fato que as BRS presentes nesse substrato já estavam adaptadas às condições do tratamento de esgoto anterior. Sendo assim, os microrganismos presentes naquela fonte de inóculo demonstraram atividade em período inferior ao observado para as demais fontes de inóculo ou ao tratamento controle. Algumas possibilidades podem ser elencadas para explicar a descontinuidade da eficiência do biorreator com lodo de esgoto após esse período inicial. Uma delas é o possível consumo e esgotamento da carga orgânica original, já que as variações de carga alimentada podem determinar o tempo de cada ciclo (tempo de retenção hidráulica) (VON SPERLING, 1996). Outra alternativa é a inativação das bactérias devido à possível oxigenação do meio, e a descontinuidade de condições favoráveis para a retomada do metabolismo microbiano naquele ambiente. Vale ressaltar a redução de sulfato após o período inicial de 30 dias também foi evidenciada nos demais tratamentos, porém, em menor proporção.

A redução dos teores de sulfato no tratamento de água de DAM tem importância adicional por contribuir no tratamento de águas residuais contendo elementos-traço (KASKONEN e PUHAKKA, 2007). O tratamento anaeróbico de águas residuais de elevado teor de sulfato produz principalmente H_2S , que é quimicamente instável e precipita em pH alcalino, complexando metais. Os sulfetos metálicos precipitam com o aumento do pH na ordem de $Cu > Zn > Pb > Cd > Fe > Ni$ (HAO *et al.*, 1996).

Desta forma, no tratamento de efluentes contendo elementos-traço, a redução de sulfato e consequente acúmulo de sulfeto pode ser vantajosa, pois os sulfetos metálicos formados possuem solubilidade baixa em água, reduzindo a concentração desses elementos-traço em solução. Além disso, os sulfetos podem ser reoxidados bioquimicamente a enxofre molecular em condições aeróbias, possibilitando a recuperação do enxofre como subproduto desse processo (MOCKAITIS, 2008).

No entanto, no presente trabalho não determinamos se o sulfeto, oriundo da redução do sulfato, está formando sulfetos metálicos ou permanece livre no meio aquoso, já que os elementos-traço podem ter sido adsorvidos diretamente no biocarvão. Dessa forma, e comprovando-se essa colocação, o acúmulo de sulfeto presente nesses sistemas poderia representar um passivo ambiental.

Desse modo, considerando a possível formação de H_2S por estes biorreatores, pode ser necessário um sistema de pós-tratamento, com a finalidade de removê-lo das águas residuárias. Visando a mitigação deste problema, existem muitas tecnologias capazes de remover H_2S dos efluentes gerados. Porém, algumas tecnologias disponíveis podem ser tecnicamente aplicáveis, mas economicamente inviáveis. Uma das soluções pode estar relacionada à precipitação química, devido ao fato de que o H_2S reage facilmente com óxidos e hidróxidos de ferro, por exemplo, para formar sulfetos de ferro ($FeO + H_2S \leftrightarrow FeS + H_2O$). A reação é ligeiramente endotérmica, necessitando de uma temperatura mínima de 12 °C para ocorrer, com um ótimo entre 25 e 50 °C (MERCADO, 2010). Segundo o autor, os sulfetos de ferro formados podem ainda ser oxidados e permitir a recuperação do óxido de ferro, paralelamente com enxofre elementar.

4.3 Análises Microbiológicas

4.3.1 Detecção e quantificação de bactérias termotolerantes

Com base nas fontes de inóculo de BRS utilizadas para alimentar os biorreatores, a avaliação deste grupo de bactérias é importante como indicador de qualidade microbiológica da água de DAM após o enriquecimento dos biorreatores. A avaliação da água de saída dos biorreatores indicou ausência de coliformes termotolerantes após 30 dias, permanecendo nessa condição quando avaliados aos 180 dias. Essa condição permite que, baseado nesse contexto, a água de DAM tratada pelo sistema não representa um risco ambiental quando lançada para o meio ambiente (CONAMA 430/2011).

4.3.2 Caracterização da estrutura das comunidades de bactérias totais nos biorreatores por PCR-DGGE

Como alternativa para monitorar a seleção e flutuação das comunidades bacterianas ao longo do tempo nos biorreatores com diferentes fontes de inóculo microbiano, bem como as diferenças das comunidades entre os biorreatores, foi empregada a técnica de PCR-DGGE. Os resultados obtidos revelaram um perfil de populações bacterianas totais distintas em função do tratamento empregado (Figura 9), o que evidencia que a partir dos inóculos utilizados (fonte = tempo 0), comunidades bacterianas específicas foram incorporadas aos

biorreatores. Apenas não é possível observar esse padrão para o biorreator inoculado com lodo.

Ao longo do tempo as comunidades bacterianas permanecem diferindo entre os tratamentos, mas também é possível evidenciar a seleção de grupos específicos dentro de cada tratamento (Figura 10). Este comportamento era esperado, uma vez que condições específicas foram geradas no interior dos biorreatores, proporcionando a seleção de comunidades bacterianas.

As diferenças entre as comunidades bacterianas podem ser comprovadas estatisticamente a partir da análise de ANOSIM (Tabela 5), onde é possível observar que o biorreator inoculado com esterco difere estatisticamente dos demais biorreatores, não havendo diferença significativa entre os biorreatores controle e o inoculado com sedimento, o que já era esperado tendo em vista que a água de DAM e o sedimento de DAM foram coletados do mesmo local, bem como do biorreator inoculado com lodo quando comparado com o biorreator inoculado com sedimento e o biorreator controle. Esses resultados podem ser explicados pela variabilidade da comunidade bacteriana total do tratamento com lodo.

Vale ressaltar que a estrutura e diversidade de comunidades de bactéria são influenciadas por vários fatores, entre elas a contaminação por poluentes e a matéria orgânica do meio. Os elevados níveis de metais pesados, bem como as concentrações de nutrientes, podem ser responsáveis pelas diferentes composições microbianas das amostras de drenagem (PEREIRA *et al.*, 2014).

Ao analisar a comunidade bacteriana em áreas contaminadas com metais pesados, Bouskill (2010) detectou a comunidade mais diversa e abundante no local com maior índice de contaminação, indicando que essa condição seleciona uma comunidade microbiana resistente aos metais. Neste caso, o teor mais elevado de metais, tais como cobre, níquel, zinco e nas amostras de DAM pode ter atuado para selecionar as bactérias resistentes a que dominaram neste ambiente (PEREIRA *et al.*, 2014), demonstrando a importância do meio para a seleção das comunidades bacterianas.

Além da relevância das condições de poluentes e de carga orgânica do meio, a opção que visa a utilização de sistemas em que a biomassa cresce aderida a suportes fixos, ao invés de crescer em suspensão, apresenta inúmeras vantagens, como, por exemplo, alta área superficial para o crescimento microbiano e o possível aumento no tempo de retenção celular, favorecendo assim, o crescimento de bactérias de crescimento lento (JAAR e WILDERER, 1992). Desta

forma, destaca-se a importância do biocarvão nesses biorreatores, de forma que seus microporos podem servir como abrigo para microrganismos (SANTOS *et al.*, 2012).

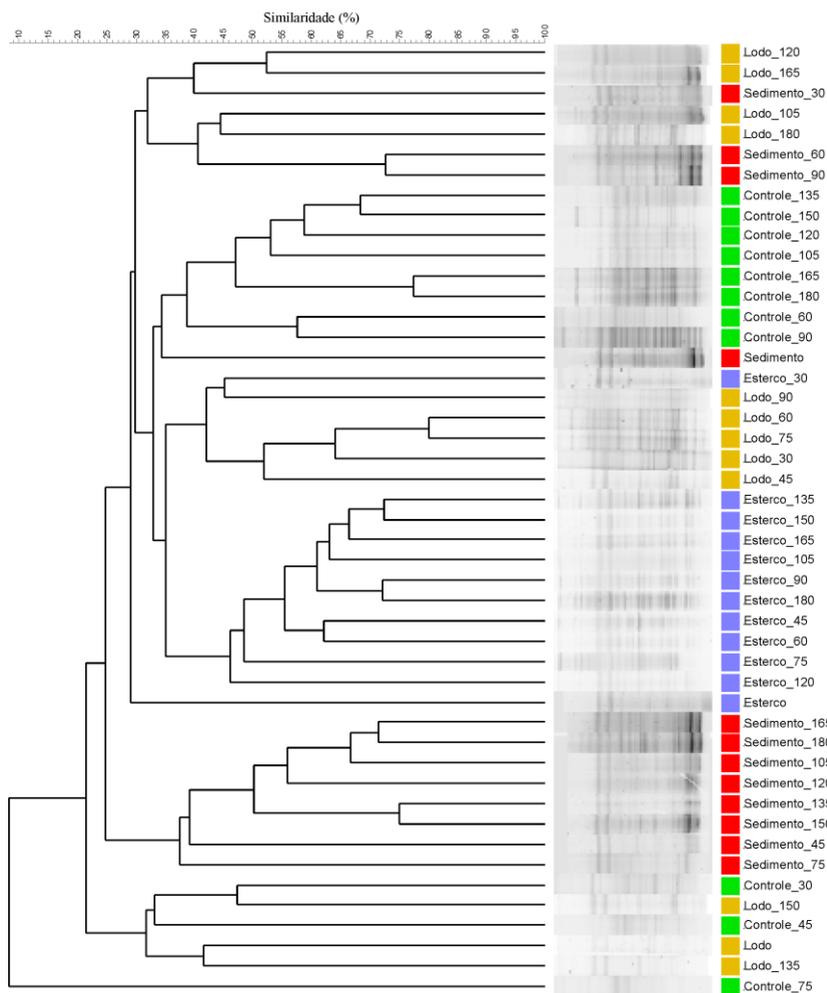


Figura 9: Agrupamento hierárquico obtido a partir da PCR-DGGE de bactérias totais em biorreatores para tratamento de água de DAM. Controle, sedimento, esterco e lodo foram os tratamentos avaliados em cada biorreator, enquanto os números referem-se aos dias de coleta de amostras de biocarvão dos biorreatores para análise.

Tabela 5: Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de *amplicons* da região do gene 16S rRNA de bactérias totais de amostras de substrato em biorreatores para o tratamento de água de DAM.

Tratamentos	R estatístico
Controle, Sedimento	0,314
Controle, Esterco	0,452*
Controle, Lodo	0,176
Sedimento, Esterco	0,613*
Sedimento, Lodo	0,374
Esterco, Lodo	0,416*

* Comparações que diferem estatisticamente. Nível de significância para R global = 0,403; $P < 0,01$.

4.3.3 Caracterização da estrutura das comunidades de bactérias redutoras de sulfato nos biorreatores por PCR-DGGE

O tratamento de efluentes em geral, considera a utilização de BRS como uma possível alternativa, de baixo custo operacional, quando comparado aos tratamentos químicos tradicionais (PINHEIRO, *et al.*, 2008), sendo utilizado como método para tratamento de efluentes industriais com alto teor de sulfato em países como Alemanha e Holanda (SCHEEREN *et al.*, 1992).

Na seleção de BRS visando tratamento de efluente, a presença de comunidades distintas é uma condição interessante, tendo em vista a maior chance de obter biorreatores com eficiências particulares no tratamento da água de DAM. Dessa forma, a utilização de diferentes fontes de inóculo, bem como a etapa de enriquecimento (bioativação), podem acarretar no estímulo e crescimento prévio de consórcios de BRS, e consequentemente diminuir o tempo de redução de sulfato em tratamento de DAM (PINHEIRO *et al.*, 2008).

A técnica de DGGE tem sido bastante utilizada para o estudo das comunidades de BRS em ambientes impactados pela DAM, sendo avaliado o gene 16S rRNA (MOHAPATRA *et al.*, 2011).

Decorrente dos resultados obtidos pela técnica de PCR-DGGE no presente trabalho, foi possível observar o agrupamento das amostras por tratamento, com exceção das amostras dos biorreatores controle e sedimento, as quais tiveram estruturas de comunidades similares ao longo do tempo (Figura 11), uma vez que a água de DAM e o sedimento foram coletados do mesmo local.

Este resultado é semelhante ao obtido na análise de bactérias totais, onde também houve seleção dos grupos decorrentes do

enriquecimento empregado, no entanto, as comunidades de BRS apresentaram uma maior similaridade dos tratamentos ao longo do tempo.

As diferenças entre as comunidades de BRS podem ser comprovadas estatisticamente a partir da análise de ANOSIM (Tabela 6), onde se observa que o controle e o biorreator enriquecido com sedimento de DAM não diferem estatisticamente entre si. Já os biorreatores com esterco e com lodo de esgoto diferem estatisticamente de todos os tratamentos.

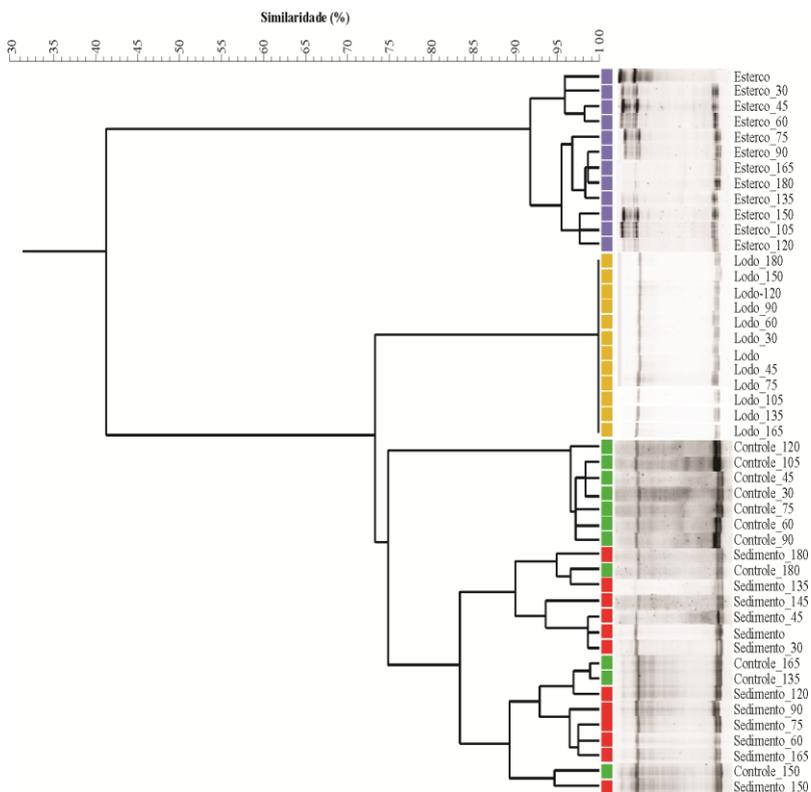


Figura 10: Agrupamento hierárquico obtido a partir da PCR-DGGE de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em biorreatores para tratamento de água de DAM. Controle, sedimento, esterco e lodo foram os tratamentos avaliados em cada biorreator, enquanto os números referem-se aos dias de coleta de amostras de biocarvão dos biorreatores para análise.

Tabela 6: Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de *amplicons* região do gene 16S rRNA de bactérias redutoras de sulfato de amostras de substrato em biorreatores para o tratamento de água de DAM.

Tratamentos	R estatístico
Controle, Sedimento	0,333
Controle, Esterco	0,907*
Controle, Lodo	0,667*
Sedimento, Esterco	0,925*
Sedimento, Lodo	0,569*
Esterco, Lodo	0,984*

* Comparações que diferem estatisticamente. Nível de significância para R global = 0,731; $P < 0,01$.

Apesar das comunidades de BRS terem diferido entre a maioria dos tratamentos, com exceção do controle e do sedimento, é possível observar pelo diagrama de Venn (Figura 12) a presença de *amplicons* comuns entre os biorreatores.

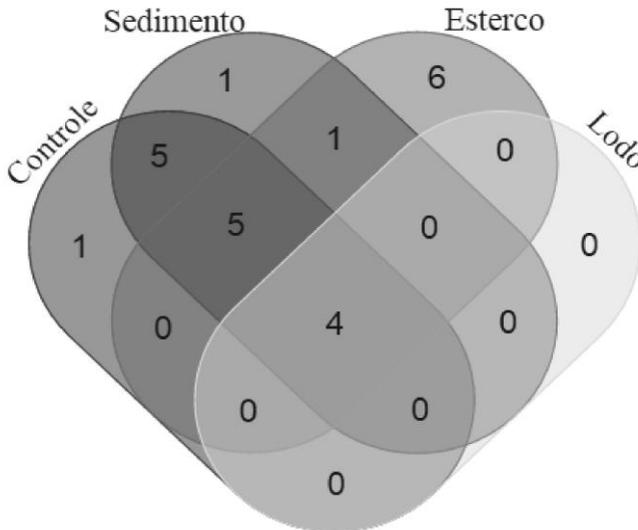


Figura 11: Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de *amplicons* do gene 16S rRNA de bactérias redutoras de sulfato das amostras de biocarvão de biorreatores utilizados no tratamento de água de DAM obtidas dos 30 aos 180 dias de tratamento. Controle, sedimento, esterco e lodo foram os tratamentos avaliados em cada biorreator.

Ao quantificar o número de *amplicons* nos tempos T0 (inóculo) e T180, podemos verificar diferenças na seleção de BRS entre os tratamentos (figura 13). Evidencia-se a presença de BRS na água de DAM, tendo em vista a detecção destas no controle aos 180 dias, bem como a ausência de BRS no biocarvão no controle no tempo zero (T0).

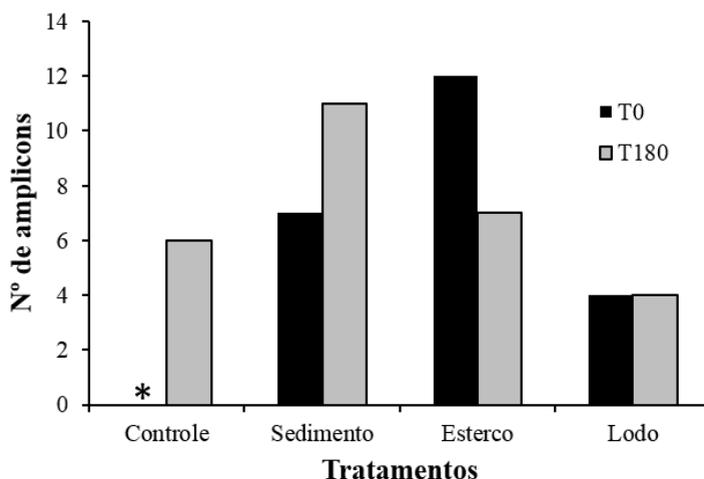


Figura 12: Número de *amplicons* totais iniciais (inóculo - T0) e ao final do tratamento (T180). *Tratamento controle (biocarvão) sem amplificação de BRS por PCR no tempo zero (T0).

No biorreator com sedimento ocorreu um aumento no número de *amplicons* ao longo do tempo, o que comprova que BRS que estavam presentes no sedimento foram estimuladas no processo, ou acrescidas das comunidades presentes na água de DAM, sendo detectadas nesse biorreator após 180 dias de experimento. Martins *et al.* (2011) em avaliação à comunidade bacteriana presente em duas minas abandonadas em Portugal, através de reator anaeróbico por leito fixo, verificaram também a detecção de novos *amplicons* no decorrer das análises, correlacionando esse aparecimento com a diferença na água de DAM com que os reatores foram alimentados.

Este resultado está de acordo com Almeida (2005), onde foi detectada maior ocorrência de BRS (NMP/mL) nas amostras de sedimento, do que na água ácida de minas de Urânio. Segundo o autor, esse era um fato esperado, uma vez que as concentrações de oxigênio dissolvido são menores no sedimento e este apresenta uma maior

quantidade de matéria orgânica em comparação com a água, atingindo 22 mg/L.

De modo geral, as BRS presentes no grupo controle e com sedimento, que receberam apenas enriquecimento, e consequente carga orgânica, do próprio local de DAM, demonstram que existem diferentes grupos atuando nas condições extremas do local. De acordo com KANDELER *et al.* (2010), após longo período de exposição à DAM, a comunidade bacteriana tende a estabilizar. A condição extrema pode alterar a estrutura da comunidade bacteriana, mas não afeta a diversidade após período de adaptação (PEREIRA *et al.*, 2014).

Apesar da seleção de BRS nos tratamentos controle e sedimento, como nos biorreatores as condições físico-químicas foram adversas ao ambiente de DAM de onde foram coletadas, principalmente pela tendência à alcalinização dos biorreatores, é possível que essas modificações tenham influenciado na eficiência de redução do sulfato. A efetividade quase nula desses biorreatores contendo somente água e sedimento de DAM, pode ainda elucidar-se pelo fato de que esses não receberam enriquecimento com fontes de matéria orgânica além do lactato, que foi igualmente adicionado a todos os biorreatores.

O biorreator contendo esterco bovino possui maior número de *amplicons* no inóculo (T0) comparado à análise aos 180 dias de tratamento, demonstrando a seleção de BRS no biorreator ao longo do processo. Este também foi o biorreator que apresentou o maior número de *amplicons* exclusivos. Esses dados podem ser relacionados aos teores de sulfato apresentados anteriormente, que revelaram o tratamento enriquecido com esterco bovino como tendo maior efetividade na redução desses teores. Silva (2011), em reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) tratando corantes nitrogenados, também detectou a existência de bandas exclusivas nas amostras das diferentes fases operacionais, incluindo aquelas com os melhores resultados do tratamento. Deste modo, podemos destacar que os *amplicons* exclusivos ao tratamento com esterco podem representar populações compostas por gêneros tipicamente mais efetivos na redução do sulfato que os presentes nos demais tratamentos, agindo de forma distinta e apresentando maior eficiência no modelo empregado nesse estudo. Destaca-se a necessidade de identificação dessas espécies, o que permitiria isolar esses organismos, excluindo a necessidade do período de enriquecimento, ocasionando maior efetividade do processo.

No caso do biorreator com lodo de esgoto, houve a manutenção do número de *amplicons* nos tempos T0 e T180, os quais também foram identificados como os mesmos pela análise de agrupamento hierárquico.

Ao analisar a comunidade bacteriana em reator USRB (*Upflow sludge bed reactor*), Beli (2014), detectou que o perfil de bandas obtidas provenientes do inóculo (lodo granular) e do reator, por PCR/DGGE, foi de 23 bandas diferentes distribuídas entre o inóculo e a fase operacional. O autor observou que as 7 bandas presentes no inóculo mantiveram-se ao longo de todo o tratamento de DAM. Isso indica que a microbiota presente na fonte de enriquecimento foi capaz de se manter em condições anaeróbias sulfetogênicas com a redução de pH e adição de elementos-traço, evidenciando a seleção sobre a comunidade bacteriana. Da mesma forma, considerando fontes similares de enriquecimento, e a fim de avaliar o perfil de bandas de DGGE da comunidade de BRS em tratamento de esgoto em reator *UASB*, Hirasawa (2007), utilizando os *primers* 341CG/907R, verificou 3 bandas constantes em todas as amostras, durante toda a operação, inferindo que a fonte de enriquecimento pode ter influência no perfil das comunidades de BRS, bem como nesse trabalho.

Embora o biorreator contendo lodo de esgoto não tenha *amplicons* exclusivos, e aparentemente tenha uma comunidade de BRS que não diferiu com o tempo, cabe salientar que o mesmo apresentou eficiência na redução de sulfato nos primeiros 30 dias de operação. Essa condição pode estar relacionada ao enriquecimento com a carga orgânica proveniente do lodo e pelo fato das comunidades presentes neste tipo de enriquecimento já terem sido pré-selecionadas pelas condições de tratamento anterior, nas diferentes fases da estação de tratamento de esgoto, principalmente pela passagem do material por uma fase anóxica. A perda de efetividade na redução de sulfato após os 30 dias de análise aponta para o possível consumo da fonte de carga orgânica do sistema, ou possível oxigenação, conforme descrito anteriormente. Tendo em vista que a maioria das BRS é anaeróbia, isso pode ter inativado as populações, que não puderam se reestabelecer.

Os resultados demonstrados acima indicam a influência das fontes de enriquecimento nos diferentes biorreatores, relacionado tanto à eficiência no tratamento de DAM, quanto às comunidades bacterianas estabelecidas. A análise por PCR/DGGE, desta forma, permitiu a visualização da dinâmica da população bacteriana presente em cada um dos biorreatores, em função do tratamento empregado, sendo dependente das condições do meio. Na técnica utilizada, as bandas em uma mesma posição possuem o mesmo padrão de desnaturação, mas não necessariamente a mesma sequência. Apenas o sequenciamento das bandas pode provar a identidade das sequências (BATISTA, 2009).

4.4 Análise de Redundância (RDA)

A correlação entre os dados ambientais e o perfil de bandas de BRS foi determinada pela análise de redundância (RDA). Assim, a RDA permite verificar a relação dos perfis obtidos por PCR/DGGE com os fatores ambientais.

O resultado da RDA permitiu avaliar os fatores que apresentam maior ou menor interferência na determinação do perfil de DGGE das BRS, e, por conseguinte, na condição da comunidade bacteriana redutora de sulfato.

A diversidade microbiana depende de diversos fatores. Dentre eles, pH e temperatura (ZILLI *et al.*, 2003). Neste caso, podemos perceber que a temperatura teve pouca influência sobre o agrupamento dos microrganismos, já que foi quase constante a todos os tratamentos. O pH demonstrou interferência no agrupamento, devido à expressiva elevação do pH da água de DAM na análise aos trinta dias de tratamento, proveniente do contato com o biocarvão, que teve o pH inicial de 10,4. Ao longo do tempo o pH estabilizou-se entre 7,5 e 8,0, sendo pouco relevante para o agrupamento bacteriano.

Em análise de comunidades bacterianas sujeitas à DAM, Beli (2014) verificou que diminuições de pH foram menos influentes na diversidade do que a adição de elementos-traço. Nesse estudo, como todos os biorreatores se mantiveram constantes para a análise de elementos-traço, ficando todos abaixo do limite de detecção, esses parâmetros não foram avaliados na RDA. Não podemos ignorar o efeito do biocarvão sobre os minerais sulfetados. Dentre as principais características do biocarvão, a elevada microporosidade associada à alta capacidade de troca de cátions e ânions garante uma afinidade de adsorção muito grande desse elemento por minerais presentes no meio. Assim, esse substrato pode ter garantido a remoção de uma grande quantidade de elementos-traço presente na água de DAM, sendo responsável por este resultado.

O fator preponderante foi o teor de sulfato reduzido ao longo do período de avaliação. Deste modo, o grupo enriquecido com esterco bovino esteve distante dos demais tratamentos, considerando que obteve maior eficiência (41 %) na redução de sulfato durante o tratamento da água de DAM, da mesma forma que o tratamento com lodo, aos 30 dias de análise (32 %) e aos 45 dias, onde ainda havia teores de sulfato inferiores aos demais tratamentos.

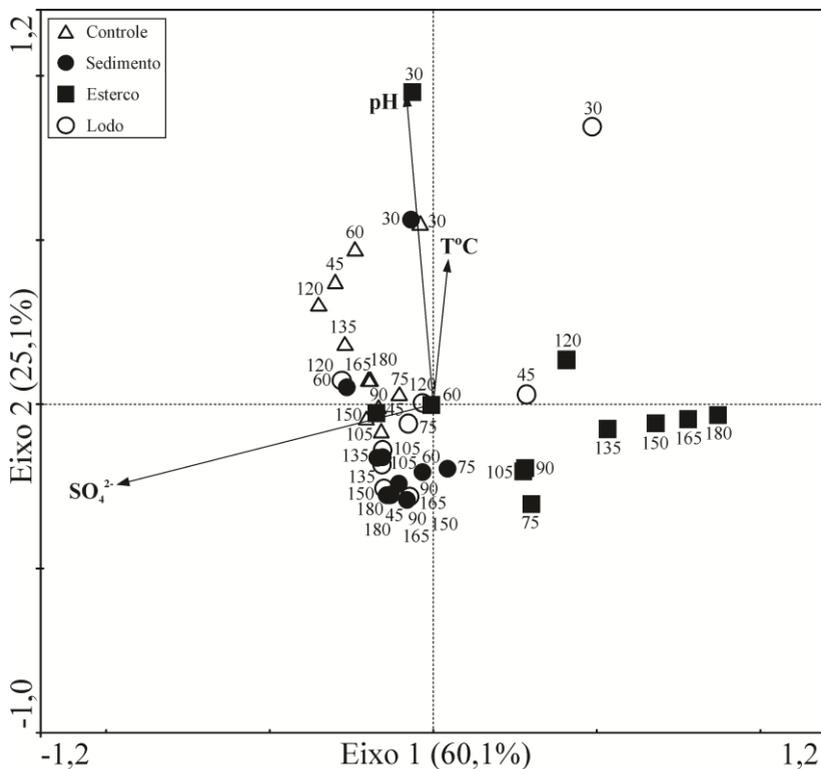


Figura 13: Agrupamento das amostras dos tratamentos empregados (controle, sedimento, esterco e lodo) com fatores físicos e químicos determinantes da comunidade de BRS obtido por DGGE.

5. CONCLUSÕES

Biorreator à base de biocarvão enriquecido com fontes de inóculo de bactérias redutoras de sulfato é eficiente no tratamento da água de DAM.

O biocarvão é uma boa matriz para a imobilização de comunidades bacterianas, bem como para a redução dos teores de elementos-traço e alcalinização de soluções ácidas como a água de DAM.

A utilização de esterco bovino como inóculo de bactérias redutoras de sulfato em biorreatores à base de biocarvão permite a redução dos níveis de sulfato da água de DAM.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos complementares são necessários acerca da geração de sulfeto, bem como da saturação do biocarvão e a potencialidade de recuperação elementos-traço, no modelo de biorreator avaliado.

São necessárias análises de grupos microbianos que possivelmente interagem com as BRS de forma competitiva, para a melhor compreensão do comportamento dessas BRS no tratamento empregado.

Pela eficiência do sistema avaliado em escala laboratorial, testes piloto a campo podem ser realizados para determinar as condições adequadas de operação *in situ*.

7. REFERÊNCIAS

ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.

ALMEIDA, S. K. **Detecção de bactérias Redutoras de Sulfato em efluente e sedimento de mina de Urânio**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) - Centro de desenvolvimento da tecnologia nuclear, Belo Horizonte, 2005.

AMARAL, J. E.; KREBS, A. S. J. Drenagem ácida da mineração de carvão e sua inter-relação com metais pesados e recarga de aquíferos na Bacia Carbonífera do Estado de Santa Catarina. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E XVII ENCONTRO NACIONAL DE PERFURADORES DE POÇOS. **Anais...** CPRM – Serviço Geológico do Brasil. São Luís – MA, 2010.

AMARAL FILHO, J. R. **Avaliação ambiental e do potencial de aproveitamento de um módulo de rejeitos de carvão na região carbonífera de Santa Catarina**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

AMANN, R. I.; STROMLEY, J.; DEVEREUX, R.; KEY, R.; & STAHL, D. A. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 58, p. 614-623, 1992.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3. ed. Brasília: ANEEL, 2008. 236p.

ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.

ATKINSON, C. J.; FITZGERALD, N.; HIPPS, A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and Soil**, v. 337, p. 1–18, 2010.

BAKONYI, T.; DERAKHSHIFAR, I.; GRABENSTEINER, E.; NOWOTNY, N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1504-1510, 2003.

BARBOSA, J. P.; SOARES, P.; BORMA, L. (2001). **Projeto conceitual para recuperação ambiental da bacia carbonífera sul catarinense**. Relatório Técnico. Santa Catarina, CETEM, v. 1. 2001.

BARBOSA, P. R. C.; BORBA, R. P.; SILVA, W. L.; COSCIONE, A. R.; CAMARGO, O. D. A. Uso do biocarvão de bagaço de cana na remoção de metais pesados de água sob diferentes Condições De Ph'S. In: III CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEIO AMBIENTE SUBTERRÂNEO. 2013, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2013.

BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. **Sulphate-reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems**. Cambridge, University Press: Cambridge, 2007.

BATISTA, L. A. **Análise das comunidades microbianas presentes em depósitos de minerais sulfetados com ocorrência de drenagens ácidas de minas e em sistemas de biolixiviação**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

BELI, E. **Estudo da diversidade microbiana em reator ASBR no tratamento de drenagem ácida de mina sintética sob diferentes condições operacionais**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2014.

BENITES, V. M.; MADARI, B. E.; MACHADO, P. L. O. A. Matéria Orgânica do Solo. In: WADT, P. G. S. (Ed.) **Manejo do Solo e Recomendação de Adubação para o Estado do Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2005. p. 93-120.

BERNARDEZ, L. A.; DE ANDRADE LIMA, L. R. P.; ALMEIDA, P. F. The hydrodynamics of an upflow packed-bed bioreactor at low Reynolds number. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 2, n. 3, 2009.

BORBA, R. F. Carvão Mineral. **Balanco Mineral Brasileiro, DNPM**, Brasília, 2001.

BOUSKILL, N. J.; BARKER-FINKEL, J.; GALLOWAY, T. S.; HANDY, R. D.; FORD, T. E. Temporal bacterial diversity associated with metal-contaminated river sediments. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 317-328, 2010.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. The nature and properties of soils. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA. 2008.

BRANDELERO, S. M.; MIQUELLUTI, D. J.; CAMPOS, M. L.; DORS, P.; RODRIGUES, M. D. S.; MOREIRA, R. A atividade carbonífera e a contaminação de água superficial por elementos-traço. In: XX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 2013, Bento Gonçalves RS. **Anais...**, Bento Gonçalves RS, 2013.

BRASIL. **Resolução CONAMA n. 357**, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente: CONAMA, Brasília, DF, 17 mar. 2005.

BRASIL. **Resolução CONAMA n. 430**, de 13 de maio de 2011. Conselho Nacional do Meio Ambiente: CONAMA, Brasília, DF, maio 2011.

BRENNAN, J. K.; BANDOSZ, T. J.; THOMSON, K. T.; GUBBINS, K. E. Water in porous carbons. **Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Oxford, v. 187–188, n. 1, p. 539–568, 2001.

BRESOLIN, J.D.; BUSTAMANTE, M.M.C.; KRÜGER, R.H.; SILVA, M.R.S.S.; PEREZ, K.S. 2010. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 391-403, 2010.

BROWN, R.A.; KERCHER, A.K.; NGUYEN, T.H.; NAGLE, D.C.; BALL, W.P. Production and characterization of synthetic wood chars for use as surrogates for natural sorbents. **Organic Geochemistry**, v.37, p.321-333, 2006.

CASTILHOS, Z.C.; FERNANDES, F. R. C. A bacia carbonífera sul catarinense e os impactos e passivos da atividade da indústria extrativa mineral de carvão na territorialidade. **Recursos minerais & sustentabilidade territorial: grandes minas**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, p. 361-386, 2011.

CAVALCANTE JR, C. L.; AZEVEDO, D. C. S. Adsorção e Peneiras Moleculares: um Novo Processo de Separação. **Revista Engenharia-Fortaleza**, v. 12, p. 61-66, 1995.

CASTRO, H.F.; WILLIAMS, N.H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2000.

CHI, R.; XIAO, C.; GAO, H. Bioleaching of phosphorus from rock phosphate containing pyrites by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**, v. 19, n. 9, p. 979-981, 2006.

CHIOCHETTA, C. G. **Remediação de solo ácido pelo uso de resíduos sólidos agro-industriais**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2013.

COHEN-OFRI, I.; WEINER, L.; BOARETTO, E.; MINTZ, G.; WEINER, S. Modern and fossil charcoal: aspects of structure and diagenesis. **Journal of Archaeological Science**, Boston, v. 33, n. 3, p. 428-439, 2006.

COSTA, P. F. **Cultivo de Bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na remoção de sulfato e arsênio utilizando pó de penas de galinha como substrato orgânico**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós - graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro preto, 2012.

CORTÉS, O. E. J.A. **Avaliação técnica da utilização de H₂S no tratamento de efluentes líquidos ácidos contendo metais pesados.** 2005. 105p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia. 2005.

CORTEZ, M.T.S.C. **Abordagem Molecular na Resolução de Problemas com Biocorrosão.** 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado)– Departamento de Biologia, Universidade de Aveiros, Portugal, 2009.

CUNHA, M. P. **Estudo e análise de reatores anaeróbios para o tratamento de drenagem ácida de mina(s).** 2014. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas – campus Poços de Caldas, MG, 2014.

CYPIONKA, H. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 54, p. 827-848, 2000.

DE PESQUISA ENERGÉTICA, Empresa. Ministério de Minas e Energia. **Balço Energético Nacional (Brazilian Energy Balance)**, 2003.

DIAS, S. S. H. **Lodo de esgoto na produção de mudas de bracatinga, (Mimosa scabrella), Crisântemo (*Dendranthema grandiflora*) e Petúnia (*Petunia x hybrida*).** 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DOWNIE, A.; CROSKY A.; MUNROE P. Physical Properties of Biochar , In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**, London, UK, 2009. p. 13-32.

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

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. **Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)**, v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

FARIAS, Y. P. T. M. M., Tratamento de Drenagem Ácida de Mina–DAM, por Bactérias Redutoras de Sulfato-BRS. In: XVII Jornada de Iniciação Científica. **Anais... CETEM – Centro de Tecnologia Mineral.** Rio de Janeiro – RJ, 2009.

FEIL, N. F.; KLIEMANN NETO, F. J. Produção conjunta no processo de beneficiamento de carvão mineral: custos conjuntos. **Produto & Produção**, v. 9, n. 2, p. 136-152, 2008.

FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG, E. Adsorventes naturais como controladores de poluentes aquáticos: uma revisão. **Revista EIXO**, Brasília, DF, v. 2, n. 1, p. 39-52, jan./jun. 2013.

FRANCO, V.A.C., MARIMON, C.M.P. **Tecnologias de Recuperação de Áreas Degradadas pela Mineração de Carvão e Usos Futuros do Solo Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Departamento de Geografia da UDESC**, 2008.

FRIPP, J.; ZIEMKIEWICS, P. F.; CHARLAVORK, H. Acid mine drainage treatment. In: EMRRP Technical Notes Collection. U.S. **Army Engineer Research and Development Center**, Vicksburg, MS, p. 1–7, 2000.

FUNGARO, D. A.; DE CIZIDORO, J. Remediação de drenagem ácida de mina usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 735, 2006.

GARCIA, C.; MORENO, D.A.; BALLESTER, A.; BLÀZQUZ, M.L.; GONZÁLEZ, F. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. **Minerals Engineering**, v. 14 (9), p. 997-1008, 2001.

GIBERT, O.; DE PABLO, J.; CORTINA, J. L.; AYORA, C. Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, n. 1, p. 327–333, 2002.

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

GTA - Grupo Técnico de Assessoramento. **5º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais**. Criciúma: Portal da Ação Civil Pública do Carvão, 2011.

GTA, 2012. **6º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais**. Processo nº. 2000.72.04.002543-9. Justiça Federal. 1ª Vara Federal de Criciúma, SC. Criciúma, 218 p.

GOMES, A. J. P.; CRUZ, P. R.; BORGES, L. P. Recursos minerais energéticos: carvão e urânio. **Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil, Brasília: CPRM**, p. 577-601, 2003.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. Springer Science & Business Media, 2012.

HIRASAWA, J. S. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de Biologia molecular**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo.

HAO, O. J.; CHEN, J. M.; HUANG, L.; BUGLASS, R. L. Sulfate-reducing bacteria. *Critical reviews in environmental science and technology*, 26(2), 155-187. Sulfate-reducing bacteria. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 26, n. 2, p. 155-187, 1996.

HERRERA, L.; HERNÁNDEZ, J.; BRAVO, L.; ROMO, L.; VERA, L. Biological process for sulfate and metals abatement from mine effluents. **Environmental toxicology and water quality**, v. 12, n. 2, p. 101-107, 1997.

HUBERT, C.; NEMATI, M.; JENNEMAN, G.; VOORDOUW, G. Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 338-345, 2003.

JAAR, M. A. A.; WILDERER, P. A. Granular activated carbon sequencing batch biofilm reactor to treat problematic wastewaters. **Water Science & Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 1195-1203, 1992.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. The microbiology of acidic mine waters. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 466-473, 2003.

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

JONG, T.; PARRY, D. L. Microbial sulfate reduction under sequentially acidic conditions in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Water Research**, v. 40, p. 2561-2571, 2006.

JONG, T.; PARRY, D.L. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. **Water Research**, v. 37, n. 14, p. 3379-3389, 2003.

JWH, S.; ELFERINK, O.; VISSER, A.; POL, H.; LOOK, W.; STAMS, A. J. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. **FEMS Microbiol Ver**, n. 15, p. 119-136, 1994.

KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. Sulfate reduction based process for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. **Engineering in Life Science**, v. 7, n. 6, p. 541-564, 2007.

KÄMPF, N. & KERN, D.C. O solo como registro da ocupação humana pré-histórica na Amazônia. In: TORRADO-VIDAL, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M. & SILVA, A.P., eds. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v.4. p.277-320.

KANDELER E.; TSCHERKO D.; BRUCE K.D.; STEMMER M.; HOBBS P. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. **Biology and fertility of soils**, v. 32, n. 5, p. 390-400, 2000.

KERSTERS, K.; VANCANNEYT, M. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2005.

KONTOPOULOS, A. Acid mine drainage control. In: CASTRO, S. H.; VERGARA, F.; SÁNCHEZ, M. A. (Eds.). **Effluent treatment in the mining industry**. Concepción: University of Concepción, 1998. p. 57-118.

KRISHNAN, K. A.; SREEJALEKSHMIM, K. G.; BAIJU, R. S. Nickel(II) adsorption onto biomass based activated carbon obtained from sugarcane bagasse pith. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10239-10247, nov. 2011.

LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. Amazonian dark earths: origin properties management. **Springer Science & Business Media**, 2007.

LEHMANN, J.; JOSEPH, S. **Biochar for environmental management: science and technology**. Routledge, 2012.

MACHADO, L. A.; SCHNEIDER, I. A. H. Ensaios estáticos e cinéticos para a prevenção da geração de drenagem ácida de minas da mineração de carvão com escória de aciaria. **REM-Revista Escola de Minas**, v. 61, n. 3, p. 329-335, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. **Tradução de Cynthia Maria Kiaw**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M. **Brock Biology of Microorganisms**, 11. Ed. NJ: Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 2006.

MAINTINGUER, S. I.; DUARTE, I. C.; SAKAMOTO, I. K.; SILVA, E. L.; MACIEL, C. D.; MARIA, V. B. Degradação anaeróbia de fenol em reatores em batelada sob condições fermentativas. **Tecno-Lógica**, v. 12, n. 2, p. 47-55, 2009.

MANYÀ, J. J. Pyrolysis for biochar purposes: a review to establish current knowledge gaps and research needs. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 15, p. 7939-7954, 2012.

MAO, J. D.; JOHNSON, R. L.; LEHMANN, J.; OLK, D. C.; NEVES, E. G.; THOMPSON, M. L.; SCHMIDT-ROHR, K. Abundant and Stable Char Residues in Soils: Implications for Soil Fertility and Carbon Sequestration. **Environ. Sci. Technol**, v. 46, p. 9571–9576, 2012.

MARTINS, M.; SANTOS, E. S.; FALEIRO, M. L.; CHAVES, S.; TENREIRO, R.; BARROS, R. J.; COSTA, M. C. Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 972-981, 2011.

MEDIRCIO, S. N. **Redução do teor de sulfato e de metais em águas pela utilização de bactérias redutoras de sulfato**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Ambiental - Pró-Água, Ouro Preto, 2004.

MENEZES, J.C.S.S. **Produção de coagulantes férricos na mineração de carvão**. 2009. 130 f. Tese (Doutorado em Engenharia – Área de concentração Tecnologia Mineral / Metalurgia Extrativa) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MERCADO, A. G. **Remoção de sulfeto de hidrogênio de biogás em instalação piloto com óxido de ferro**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MEZZARI, I. A. **Utilização de carvões adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas**. 2002. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MOCKAITIS, G. **Redução de sulfato em biorreator operado em batelada e batelada alimentada seqüenciais contendo biomassa granulada com agitação mecânica e Draft-Tube**. 2008. 344 f. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo. 2008.

MOHAPATRA, B. R.; GOULD, W. D.; DINARDO, O.; KOREN, D. W. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: a review of molecular methods. **Minerals Engineering**, v. 24, n. 8, p. 709-718, 2011.

MOLIN, J. P.; RABELLO, L. M. Estudos sobre a mensuração da condutividade elétrica do solo. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 1, p. 90-101, 2011.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Série - Biologia molecular. Atualização. Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v. 2, n. 2, p. 140-142, 2004.

MOOSA, S.; NEMAT, M.; HARRISON, S. T. A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part II: incorporation of temperature effects in the kinetic model. **Chemical Engineering Science**, v. 60, n. 13, p. 3517-3524, 2005.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335, 1987.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 3, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NAKAGAWA, T.; SATO, S.; YAMAMOTO, Y.; FUKUI, M. Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. **Water Research**, v. 36, n. 11, p. 2813-2823, 2002.

NASCIMENTO, F. M. F.; MENDONÇA, R. M. G.; MACÊDO, M. I. F.; SOARES, P. S. M. Resumos do I Congresso Brasileiro de Mina a Céu Aberto & II Congresso Brasileiro de Mina Subterrânea. **Belo Horizonte, Brasil**, 2002.

NORDWICK, S.; ZALUSKI, M.; BLESS, D.; TRUDNOWSKI, J. Development of SRB Treatment Systems For Acid Mine Drainage. **Electrometallurgy and Environmental Hydrometallurgy. Volume 2**, p. 1837-1846, 2003.

OLIVEIRA, J.S.; CAMARA, M. M.; COSSICH, E. S.; TAVARES, C. R. G. Dessorção de níquel da biomassa *Sargassum filipendula* em coluna de leito fixo. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Anais...** Uberlândia, - Minas Gerais, Brasil, 2009.

OSÓRIO, E.; VILELA, A.C.F.; HOFFMANN, C. Estudo Prospectivo do Setor Siderúrgico. **Associação brasileira de Metalurgia e Materiais, ABM, Brasília-DF, Brasil, 2008.**

OVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; & TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PELCZAR, J. R. M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Editora Makron Books, 1996. v. 1-2.

PEREIRA, L.; B.; VICENTINI, R.; OTTOBONI, L. M. M. Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96605, 2014.

PINHEIRO, A. C.; GAIDZINSKI, R.; SOUZA, V. P. Utilização de Bactérias Redutoras de Sulfato para o tratamento biológico de efluentes provenientes da indústria da mineração de carvão. **XVI Jornada de Iniciação Científica**. CETEM/MCT, 2008.

POSSA, M. V.; SANTOS, M. D.C dos. Tratamento de drenagem ácida de mina por processo de neutralização controlada. **Contribuição técnica elaborada para o Seminário Brasil-Canadá de Recuperação Ambiental de Áreas Mineradas, Florianópolis, SC**, v. 1, p. 1-25, 2003.

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2. ed. Cambridge: University Press, 1984. 209 p.

RAMOS, C. L. S. **Avaliação da cinética de redução microbiana de sulfato**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RAMPINELLI, L. R.; LEÃO, V. A.; SÁ, R. G. **Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. D. C.; TEIXEIRA, K. D. S.; Reis, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Embrapa Cerrados**. Documentos, 2002.

RIZZO, A.C. L.; LEITE, S. G. F. Produção de sulfeto em reator do tipo UASB e sua potencial aplicação na remoção de metais pesados de efluentes. **Série Tecnologia Ambiental**, n. 32, 2004.

SAMPAIO, C. H.; TAVARES, L. M. M. **Beneficiamento Gravimétrico: uma introdução aos processos de concentração mineral e reciclagem de materiais por densidade**. Editora da UFRGS, 2005.

SANCHEZ, E.; BORJA, R.; REYES, O.; CRUZ, M.; COLMENAREJO, M. F. Treatment of sewage water from tourist areas by anaerobic fixed-bed reactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 315-318, 1997.

SANTOS, J. L. S.; PETTER, F. A.; BORGES, C. D.; TSAI, S. M.; MADARI, B. E. Biocarvão na estrutura de comunidades bacterianas de solo e de rizosfera de soja (G. max). In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS. **Anais...** EMBRAPA – Arroz e feijão. Santo Antônio de Goiás. 2012.

SARTI, E. L. **Influência do oxigênio no crescimento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios em batelada**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica Sanitária) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos 2007.

SCHEEREN, P. J. H.; KOCH, R. O.; BUISMAN, C. J. N.; BAMES, L. J.; VERSTEEGH, J.H. New biological treatment plan for heavy metal-contaminated groundwater. **Trans. Instn. Min. Metall.** V 110, p. 190-199, 1992.

SCHNEIDER, C. H. **Caracterização do impacto ambiental e tratamento de drenagem ácida de Minas com Resíduos alcalinos na mineração de carvão de Santa Catarina: Mina Um II Verdinho, Criciúma.** 2006. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de pós graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais – PPGE- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2006.

SCHUMANN, W. **Rochas e Minerais.** Rio de Janeiro: Livro Técnico, 1985. 223p.

SÉRVULO, E. F. C. **Ação das bactérias oxidante e redutoras de enxofre sobre o xisto.** 2001. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SILVA, D. C. **Estudo da diversidade microbiana em reator UASB aplicado à degradação de azocorantes.** 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, MG. 2011.

SILVER, M. **Analytical techniques for research on the abatement of bacterial acid generation in pyritic tailing:** Canmet Report 86-3E, Minerals Research Program, Mineral sciences Laboratories, Ottawa, 1985.

SOUZA, M. R. R. D. **Avaliação do desempenho de diferentes tipos de cobertura seca aplicados a depósitos de rejeitos de carvão.** 2012. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SPOKAS, K. A.; KOSKINEN, W. C.; BAKER, J. M.; REICOSKY, D. C. Impacts of woodchip biochar additions on greenhouse gas production and sorption/degradation of two herbicides in a Minnesota soil. **Chemosphere**, v. 77, p. 574–58, 2009.

SWIATKOWSKI, A.; PAKULA, M.; BINIAK, S.; WALCZYK, M. Influence of the surface chemistry of modified activated carbon on its electrochemical behaviour in the presence of lead (II) ions. **Carbon**, v. 42, n. 15, p. 3057-3069, 2004.

TABATABAI, M. A. A rapid method for determination of sulfate in water samples. **Environmental Letters**, v. 7, n. 3, p. 237-243, 1974.

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

TEIXEIRA, L. B.; OLIVEIRA, R. D.; FURLAN JÚNIOR, J.; CHENG, S. S. **Comparação de Composto Orgânico de Barcarena com Adubos Orgânicos Tradicionais Quanto às Propriedades Químicas**. MAPA. Belém, 2002.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and User's guide to Canoco for windows: software for canonical community ordination (version 4.5)** Cajo JF ter Braak and Petr Smilauer. Centre for Biometry, 1998.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Bioremediation of acid mine drainage using sulfate-reducing bacteria**. Washington DC, USA, 2006. 65 p.

VAN ZWIETEN, L.; KIMBER, S.; MORRIS, S.; CHAN, K. Y.; DOWNIE, A.; RUST, J.; ... COWIE, A. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. **Plant and Soil**, v. 327, p. 235-246, 2010.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Editora UFMG, 1996.

XINGYU, L.; ZOU, G.; WANG, X.; ZOU, L.; WEN, J.; RUAN, R.; WANG, D. A novel low pH sulfidogenic bioreactor using activated sludge as carbon source to treat acid mine drainage (AMD) and recovery metal sulfides: Pilot scale study. **Minerals Engineering**, v. 48, p. 51-55, 2013.

YOUNG, J. C. Factors affecting the design and performance of upflow anaerobic filters. **Water Science & Technology**, v. 24, n. 8, p. 133-155, 1991.

WARNOCK, D.D.; LEHMANN, J.; KUYPER T.W.; RILLIG M.C.; 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and Soil**, v. 300, n. 1-2, p. 9-20, 2007.

WAY, C. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

WHITE, C.; GADD, G. M. Mixed sulphate-reducing bacterial cultures for bioprecipitation of toxic metals: factorial and response-surface analysis of the effects of dilution rate, sulphate and substrate concentration. **Microbiology**, n. 142, p. 2197–2205, 1996.

WEBER, W. J. **Physicochemical processes for water quality control**. Wiley interscience, 1972.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias**. 2003. 122 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2003.

ZHENGFU, B. I. A. N.; INYANG, H. I.; DANIELS, J. L.; Frank, O.; STRUTHERS, S. Environmental issues from coal mining and their solutions. **Mining Science and Technology**, n. 20, p. 215–223, 2010.

ZILLI, J. É; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; da COSTA C., H. L.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.