



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**CAROLINE RODRIGUES**

**TRATAMENTOS DE ÁGUA FLUVIAL CONTAMINADA COM DRENAGEM  
ÁCIDA DE MINERAÇÃO (DAM) VISANDO A REMOÇÃO DE SULFATO:  
BIOESTIMULAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E  
ELETROCOAGULAÇÃO**

**FLORIANÓPOLIS**

**2020**

CAROLINE RODRIGUES

**TRATAMENTOS DE ÁGUA FLUVIAL CONTAMINADA COM DRENAGEM  
ÁCIDA DE MINERAÇÃO (DAM) VISANDO A REMOÇÃO DE SULFATO:  
BIOESTIMULAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E  
ELETROCOAGULAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientação: Dr<sup>a</sup> María Ángeles Lobo Recio

Coorientação: Dr. Flávio R. Lapolli

FLORIANÓPOLIS

2020

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

RODRIGUES, Caroline

Tratamentos de água fluvial contaminada com drenagem  
ácida de mineração (DAM) visando a remoção de sulfato:  
bioestimulação de bactérias redutoras de sulfato e  
eletrocoagulação / Caroline RODRIGUES ; orientadora, María  
Ángeles Lobo Recio, coorientador, Flávio R. Lapolli, 2020.  
171 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Águas impactadas por  
drenagem ácida de mineração (AIDAM). 3. remoção de sulfato.  
4. bactérias redutoras de sulfato (BRS). 5.  
eletrocoagulação. I. Lobo Recio, María Ángeles. II. Lapolli,  
Flávio R. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

CAROLINE RODRIGUES

**Tratamentos de água fluvial contaminada com drenagem ácida de mineração (DAM)  
visando a remoção de sulfato: bioestimulação de bactérias redutoras de sulfato e  
eletrocoagulação**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Lucila Adriani Coral, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof<sup>a</sup>. Regina Vasconcellos Antonio, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina (*Campus Araranguá*)

Prof<sup>a</sup>. Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Ambiental.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr<sup>a</sup>  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

---

Prof<sup>a</sup>. María Ángeles Lobo Recio, Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora

Florianópolis, 2020.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora María Ángeles por ter depositado sua confiança em mim durante esta jornada, juntamente ao professor Flávio Lapolli, meu coorientador e supervisor do LaRA (Laboratório de Reuso de Águas), por sempre prover o necessário à nossa pesquisa. À professora Maria Eliza, também integrante do LaRA, pela amizade, além de companhia nas confusões na viagem à Austrália.

Agradeço à toda minha família, em especial ao meu lar nº 1: meus pais Marco e Carmem, e minhas irmãs Natália e Brígida, que souberam me ensinar respeitáveis valores que me conduziram até aqui. E também ao meu pequeno grande amorzinho, meu sobrinho João Marco. Aos meus queridos avôs Ruth, Alfredo e Jacy. À minha linda tia Fátima, exemplo de superação diária. E a todos os outros familiares, que direta ou indiretamente me ajudaram a trilhar meus caminhos. Todo meu amor a vocês!

Ao meu namorado Lucas Postal, pela paciência, compreensão, amor, apoio e toda parceria nesta jornada. Com certeza essa caminhada ao teu lado foi muito mais leve! <3

Aos grandes amigos e parceiros que fiz no LaRA: Tiago, Rady, Pauline, Jossy, Lucila, Dámaris, Ronaldo, Fernanda, Marcelo, Marie, Cris Folzke, André, Hioná, Ana Karla, Mauana, Vlade, Thamires, Rubia, Emerson, Ana Silvia, Beatriz, Raphael e tantos outros... Alguns já se foram do lab, outros ainda permanecem, certamente todos estão em meu coração, mas com certeza alguns vou levar para a vida! Obrigada!

À nova e velha guarda do PPGEA: Lorena (diretamente da graduação no IBILCE), Jamile, Wanderli, Bruna, Isa, Beda, Ju Muller, Fran, Karina, Tiago Vitor, Hugo, Cassio, Cris de Léis, Edí, Jéssica, Maria Joana, Henrique, Claudinha, Naiara Ramos, Cris Lalau. Obrigada pelas risadas, rolêzinhos, festinhas da UFSC, praias, trilhas, voleizinhos no sábado à tarde e encontros gastronômicos. Hoje diversos são professores, uns estão espalhados pelo Brasil e também pelo mundo: tenho muito orgulho de ter feito parte da jornada de cada um de vocês aqui em Floripa!

Aos demais amigos que fiz nessa Ilha da Magia, em especial a Rodrigo, Jéssica, Isaac e Dani Hock.

Às minhas colegas de apê que tive em Floripa, em especial à Marina, Lari e Renata, que além de dividirmos o teto e as contas a pagar (que por sinal não eram poucas), também dividimos muitas risadas e momentos de reflexão.

Aos membros da banca avaliadora, professoras Regina, Lucila e Maria Eliza, pela disponibilidade e auxílio no aprimoramento deste trabalho.

Além do LaRA, agradeço também ao PPGEA, ao Dep. Eng. Sanitária e Ambiental, ao LIMA (Lab. Integrado do Meio Ambiente), ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), e às duas agências de fomento à pesquisa: CAPES, pela concessão de bolsa doutorado e ao CNPq, pelo projeto CT-Mineral, pois o conjunto de todos estes viabilizaram a realização da minha pesquisa de doutorado.

Ao LED (Laboratório de Educação Digital), que possibilitou a defesa por videoconferência, pois devido à pandemia do COVID-19, houve suspensão de todas as atividades presenciais na Universidade.

E por último, mas não menos importante, às bolsistas de IC Bruna Ritzmann e Mônica Vitart, pelo exemplar auxílio no laboratório e por serem sempre responsáveis e muito solícitas às demandas, e também aos (agora ex-) servidores Elaine (LIMA), Gustavo e Jorge (secretaria ENS).

Fechando-se este ciclo, que não foi fácil, mas também não impossível, sou grata inclusive aos momentos difíceis que passei, pois tem um ditado que profere que nunca perdemos: nós ganhamos ou aprendemos. Portanto, posso dizer que aprendi e cresci bastante com todos eles!

*“If we knew what we are doing, it would not be called research would it?”*

Albert Einstein

## RESUMO

A atividade de mineração de carvão possui grande importância histórica e econômica para o estado de Santa Catarina. Entretanto, estima-se que haja em torno de mil minas abandonadas no estado, e por conta disto, a Bacia Carbonífera Catarinense é altamente impactada, pois mesmo abandonadas, estas minas continuam liberando Drenagem Ácida de Mineração (DAM). Desta forma, diversos rios e mananciais desta região são considerados mortos, por se tratar de um efluente extremamente tóxico, visto que além de ser ácido e rico em sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), a DAM apresenta elevada concentração de metais dissolvidos. A presente pesquisa visou a remediação de água de rio impactada por DAM (AIDAM) focando na remoção de sulfato, sendo utilizadas duas vertentes: a bioestimulação das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), e a eletrocoagulação (EC), ambas no tratamento da AIDAM oriunda do rio Sangão. No tratamento biológico, foram construídos microcosmos livres de oxigênio usando como fontes de carbono: quitina comercial (QUIT) e casca de camarão (CC). Variaram-se também outras condições de operação: adição ou não de inóculo, remoção prévia dos íons metálicos da AIDAM, adição de carbonato. Todos os ensaios efetuados com CC apresentaram sulfato-redução. Nestes ensaios foram avaliadas as cinéticas da remoção de sulfato e íons metálicos ( $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Mn}_t$ ), bem como a análise da comunidade microbiana através da técnica de sequenciamento *high throughput*. Excelentes remoções de poluentes foram obtidas após 41 dias de tratamento nos diferentes ensaios realizados utilizando CC como substrato, e embora tenham-se detectado BRS (gêneros *Desulfosporosinus* e *Desulfovibrio*), em nenhum dos casos as BRS representaram a maioria, apresentando abundância relativa em torno de 1% ou menos; já as bactérias fermentadoras, anaeróbias facultativas, produtoras de quitinase e/ou ligadas à atividade sulfato-redutora (gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Klebsiella*) predominaram. No ensaio com AIDAM livre de íons metálicos e CC, predominou o gênero *Comamonas*, e muito brandamente detectou-se *Desulfovibrio*. Concluiu-se com estes resultados, que a sulfato-redução esteve mais ligada à matéria orgânica disponível às BRS que a sua abundância, provavelmente porque as bactérias fermentadoras e produtoras de quitinase são as responsáveis por quebrar a estrutura complexa da quitina, deixando o substrato disponível para as BRS, através de uma relação de sinergia entre o consórcio microbiano. Para os ensaios utilizando QUIT como fonte carbônica, nenhum deles apresentou atividade sulfato-redutora, nem mesmo com correção de pH com carbonato, evidenciando que apenas a quitina não é substrato adequado para o desenvolvimento das BRS. Em consequência, deduz-se que a característica de substrato adequado para a sulfato-redução apresentada pela CC seja provavelmente devida a sua composição (quitina + proteínas

+ minerais). Nos ensaios de eletrocoagulação, foram testadas diferentes densidades de corrente (35, 50 e 65 A·m<sup>-2</sup>) e modos de exposição à corrente elétrica (intermitente ou contínuo), e juntamente a estes dados, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, no intuito de convergir para a melhor condição na remoção de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Após 5 horas de ensaio, a densidade de corrente de 65 A·m<sup>-2</sup> em modo de exposição contínuo mostrou-se a melhor condição, proporcionando eficiência de 70,95% na remoção de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, seguindo uma cinética de decaimento de terceira ordem. Para fins de comparação, e visando um possível uso não potável da água tratada, foram efetuados ensaios toxicológicos com *Landoltia punctata* para os efluentes resultantes dos tratamentos biológico e eletroquímico de AIDAM. Os resultados obtidos mostraram baixa toxicidade do efluente após eletrocoagulação e, em contrapartida, elevada toxicidade do resultante após ensaio biológico, provavelmente devido à presença de sulfeto de hidrogênio. Este resultado, aliado ao fato de o efluente possuir odor, impede a possibilidade de seu uso secundário não-potável, elevando, portanto, o tratamento por eletrocoagulação como a opção mais viável de tratamento testada neste trabalho para a remoção de sulfato de AIDAM.

**Palavras-chave:** Drenagem ácida mineral (DAM); águas impactadas por DAM (AIDAM); remoção de sulfato; materiais quitinosos; bactérias redutoras de sulfato (BRS); eletrocoagulação.



## ABSTRACT

The coal mining activity has historically great economic importance for the Santa Catarina State. However, it is estimated that there are around one thousand abandoned mines in the region, and because of this, the Santa Catarina Carboniferous Basin is highly impacted, because even if abandoned, these mines continue to release acid mine drainage (AMD). Thus, several rivers and watercourses in this region are considered to be dead, as it is an extremely toxic effluent, since besides being acid and rich in sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), AMD has a high concentration of dissolved metals. This doctoral research aimed the remediation of river water impacted by AMD (mine-impacted water – MIW), focusing on the sulfate removal, being used two strands: the biostimulation of sulfate-reducing bacteria (SRB), and the electrocoagulation (EC), both in the treatment of MIW from the Sangão River. In the biological treatment, oxygen-free microcosms were build-up using as carbon sources: commercial chitin (CHIT) and shrimp shell (SS). Other conditions were also varied: inoculum addition or not, using metal-free MIW, and carbonate addition. All assays using SS presented sulfate-reduction. In these assays the kinetics of sulfate removal and metallic ions ( $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , and  $\text{Mn}_t$ ) were evaluated, as well as the analysis of the microbial community, through the high throughput sequencing technique. Excellent pollutant removals were obtained after 41 days of treatment in the different assays performed using SS as a substrate, and although SRB (*Desulfosporosinus* and *Desulfovibrio* genera) were detected, in none of the cases the SRB represent the majority, with relative abundance of around 1% or less; fermenter, facultative anaerobic, chitinase-producing, and/or linked to sulfate-reducing activity (*Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, and *Klebsiella* genera) predominated. In the metal-free MIW and SS assay, *Comamonas* genus prevailed, and very mildly *Desulfovibrio* was detected. It was concluded from these results, that the sulfate-reduction is more linked to the available organic matter to SRB, than to its own abundance, probably because the fermenter and chitinase-producing bacteria are responsible for breaking the complex structure of chitin, leaving the substrate available for SRB, through a synergy relationship between the microbial consortia. For the CHIT assays, none of them exhibited sulfate-reducing activity, not even with pH correction with carbonate, showing that only chitin is not a substrate adequate for SRB development. As a consequence, it is deduced that the suitable substrate for sulfate-reducing presented by SS, is probably due to its composition (chitin + proteins + minerals). In the electrocoagulation assays, different current densities (35, 50, and  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ ) and modes of exposure to electric current (intermittent or continuous) were tested, and together with these data, was performed a  $2^2$ -factorial design, in order to converge

to the best condition regarding sulfate removal. After 5 h assay, the  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  current density, in continuous exposure mode, proved to be the best condition, providing 70.95% efficiency in sulfate removal, following a third-order decay kinetics. For comparison purposes, and aiming a possible non-potable use of treated water, toxicological tests were carried out with *Landoltia punctata*, for the effluents resulting from biological and electrochemical MIW treatments proposed in this research. The obtained results showed low toxicity for the resultant after electrocoagulation treatment and, on the other hand, high toxicity for the resultant after biological treatment, probably due to the presence of hydrogen sulfide. This result, allied to the fact that this last effluent has pungent odor, makes the possibility of its non-potable secondary use fall to the ground, thus raising the electrocoagulation treatment as the most viable treatment option tested in this work for the removal of sulfate from MIW.

**Keywords:** Acid mine drainage (AMD); mine-impacted water (MIW); sulfate removal; chitinous materials; sulfate-reducing bacteria (SRB); electrocoagulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delimitação da Bacia Carbonífera dentro das Bacias Hidrográficas do sul de Santa Catarina.....	25
Figura 2. Mapa das bocas de minas abandonadas na Bacia Carbonífera Catarinense. ....	27
Figura 3. Rio Sangão (Forquilha-SC), altamente contaminado por DAM.....	30
Figura 4. Principais efeitos oriundos de contaminação com DAM.....	31
Figura 5. Rota bioquímica da redução dissimilatória do sulfato. ....	36
Figura 6. (A) Cultura de enriquecimento de BRS: à esquerda, meio estéril, ao centro, um enriquecimento positivo revelando sulfeto ferroso (FeS). (B) Modelo de atenuação de AIDAM por sulfato-redução dissimilatória. ....	39
Figura 7. Adaptações de organismos acidofílicos em ambientes ácidos.....	41
Figura 8. Curva típica de crescimento bacteriano em batelada. ....	42
Figura 9. Ilustração esquemática para sequenciamento.....	45
Figura 10. Estrutura monomérica da quitina. ....	45
Figura 11. Esboço do mecanismo difusivo.....	50
Figura 12. Esquema de EC: as diversas espécies instáveis formadas começam agregando-se, iniciando a coagulação, floculação e flotação. ....	53
Figura 13. Interações de repulsão e atração entre as partículas ao longo da distância entre as mesmas, segundo a teoria DLVO.....	54
Figura 14. Fluxograma metodológico geral do estudo de tratamento de AIDAM.....	60
Figura 15. Coleta de AIDAM no Rio Sangão .....	61
Figura 16. Diferentes ensaios de bioestimulação de BRS com microcosmos: os ensaios 1 e 2 são referentes ao artigo 1 e os ensaios 3 ao 6 compreendem o artigo 2.....	64
Figura 17. Sistema de filtração em atmosfera de nitrogênio. ....	65
Figura 18. Esquema de como foram realizadas as análises de sequenciamento <i>high-throughput</i> a partir dos ensaios com microcosmos. ....	67
Figura 19. (A) Ilustração e (B) Fotografia dos ensaios de EC em escala de bancada; (C) Perfil superior e (D) Perfil lateral de reator de EC juntamente a seus eletrodos imersos. ....	68
Figure 20. Biochemical pathway of dissimilatory sulfate reduction.....	76
Figure 21. (A) Sulfate concentration and (B) pH variations over time of the SS-active and CHIT-actives sets of microcosms. The data points represent duplicate average values and the error bars represent the standard deviation.....	82
Figure 22. Microcosm of the SS-active essay on (A) day 0, (B) day 7, and (C) day 30 and CHIT-active essay on (D) day 0, (E) day 7, and (F) day 30. This illustrates the evidences of black	

sulfides formation in the SS-active assay but not the same for the CHIT-active assay, in the same period.....	83
Figure 23. Variation of sulfate concentration over time during log phase (higher metabolism) and its decay rate. ....	84
Figure 24. Variations of (A) Iron, (B) Manganese, and (C and D) Aluminum ion concentration over time. (D) chart is an emphasis of Aluminum concentration. The data points represent duplicate average measurements and the error bars represent the standard deviation. ....	85
Figure 25. Sulfate and metal removal (%) after 41 days.....	85
Figure 26. (A) Iron concentrations in the control tests over time and (B) chart is an emphasis of the concentration.....	86
Figure 27. Relative abundances at the genus level based on bacterial 16S rRNA gene classification of specimens with the highest number of sequences detected.....	88
Figure 28. Sulfate reduction is a redox reaction that with the energy source coming from the organic compound oxidation, reduces sulfate to hydrogen sulfide. ....	96
Figure 29. Integrated scheme of the different assays performed. MIW: mine-impacted water; SS:shrimp shell; CHIT: commercial chitin; MF-MIW: metal-free MIW by shrimp shell sorption removal. ....	97
Figure 30. (A) pH variation over time in the microcosms for SS, CHIT, and MF-SS assays. (B) Variation of sulfate concentration over time for SS, CHIT, MF-SS and CHIT-CaCO <sub>3</sub> -sediments assays. (C) Sulfate decay rate for SS and MF-SS from (approximately) the start to the end of the log phase. (D) Sulfide in solution measured over time for SS, CHIT, CHIT-CaCO <sub>3</sub> , and MF-SS assays. The data points of all graphics represent duplicate average values, and the error bars represent the standard deviation.....	102
Figure 31. Variation of sulfate concentration over time for assay 6 and a similar assay without sediment (CHIT+MIW+CaCO <sub>3</sub> ): both experiments did not present sulfate removal. The data points represent duplicate average values, and the error bars represent the standard deviation. ....	104
Figure 32. (A) Iron, (B) Manganese, and (C and D) Aluminum ion variations versus total days of microcosm with SS and CHIT. The data points of all graphics represent duplicate average values, and the error bars represent the standard deviation. ....	105
Figure 33. Removal efficiencies obtained at the end of the current assay: comparison with assay 1 (RODRIGUES et al., 2019).....	106

Figure 34. Top 20 relative abundances at the genus level based on bacterial 16S rRNA gene classification of specimens with the highest number of sequences detected from SS (3) and MF-SS (5) assays. The days represent the beginning and end of the higher metabolism of each assay. For the MF-SS assay, except for <i>Comamonas</i> , the other genera presented less than 1% of relative abundance. ....	108
Figure 35. EC scheme: the numerous unstable species formed start to aggregate, initiating the coagulation, flocculation, and floatation. ....	117
Figure 36. (A) An illustration and (B) A photograph of the EC tests, operated in laboratory scale. ....	119
Figure 37. (A) pH and (B) Sulfate concentration decay profile for the different electric current densities tested. The data points represent triplicate average values and the error bars represent the standard deviation. ....	122
Figure 38. Released $Al^{3+}$ estimation over time for different current densities tested, based on Faraday's law. ....	123
Figure 39. (A) Efficiencies for sulfate removal after 5 hours of continuous mode of exposure. (B) Comparison of the best sulfate removal efficiency for each current density (at different times of exposure). The bars represent the standard deviation of the mean values. ....	124
Figure 40. Graphical determination of the sulfate decay reaction order by the differential method: the curve slope is the order ( $n$ ), and the intercept is the logarithm of $kn$ . ....	126
Figure 41. (A) Residual distribution for the sulfate removal, indicating the goodness of fit ( $R^2 = 0.9928$ ) and (B) Pareto chart over the variables and the interaction between them. (C) Contour curve and (D) Response surface for % sulfate removal. ....	128
Figura 42. (A) Esquema e (B) fotografia para o aparato da remoção de sulfeto dos microcosmos, sendo (1) cilindro de nitrogênio; (2) trompa de passagem de gás com quatro divisões; (3) frascos de microcosmos; (4) Frasco com solução de NaOH. ....	134
Figura 43. Perfil da EC efetuada em escala de bancada. ....	134
Figura 44. Ensaio com <i>L. punctata</i> : (A) dez folhas foram inseridas em cada béquer; (B) Seis réplicas foram preparadas para cada uma das cinco diluições testadas. ....	136
Figura 45. (A) Taxa de crescimento ( $r$ ) de <i>L. punctata</i> após 7 dias de exposição à diferentes fatores de concentração. (B) Curvas-resposta, baseadas nas taxas de inibição ( $I$ ) com suas respectivas regressões, para obter-se os valores de $CE_{50}$ . ....	139

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais sulfetos metálicos típicos de regiões de mineração. ....	28
Tabela 2. Efeitos na biota aquática decorrentes do baixo pH da água. ....	32
Tabela 3. Principais efeitos na saúde humana de alguns metais. ....	33
Tabela 4. Fases de crescimento bacteriano. ....	42
Tabela 5. Normas ambientais vigentes. ....	56
Tabela 6. Metodologias para caracterização dos compostos de interesse da AIDAM. ....	62
Tabela 7. Alguns modelos para cinética de consumo de sulfato. ....	70
Tabela 8. Variáveis utilizadas no planejamento fatorial e a matriz da combinação das variáveis independentes. ....	71
Table 9. MIW analytical data. ....	81
Table 10. Kinetic parameters for Fe ion sorption on the sediment. ....	87
Table 11. MIW main effects. ....	95
Table 12. MIW analytical data for the initial condition assay. ....	101
Table 13. Analysis of variance for sulfate removal for assays 3 and 5. ....	103
Table 14. Factorial design results for sulfate removal efficiency by EC. ....	121
Table 15. Sulfate decay kinetics tested obtained from the integral method for $65 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ . ....	125
Table 16. Analysis of variance for the sulfate removal variables in $2^2$ -factorial design. ....	127
Tabela 17. Caracterização físico-química da AIDAM antes e após o tratamento com microcosmos e EC. ....	137
Tabela 18. Valores de FC para cada um dos ensaios atingir o $\text{CE}_{50}$ , sendo listado em ordem decrescente de toxicidade. ....	139

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>16S rRNA</b>	RNA ribossomal usado como marcador filogenético procariótico
<b>AIDAM</b>	Água impactada com drenagem ácida de mineração / <i>MIW</i> (inglês)
<b>AMD</b>	<i>Acid mine drainage</i> / DAM (português)
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>ANOVA</b>	Método de análise de variância
<b>APS</b>	Adenosina fosfo-sulfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BRS</b>	Bactérias redutoras de sulfato / <i>SRB</i> (inglês)
<b>CC</b>	Casca de camarão / <i>SS</i> (inglês)
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração de efeito para 50% da população amostrada / <i>EC<sub>50</sub></i> (inglês)
<b>CHIT</b>	<i>Commercial chitin</i> / QUIT (português)
<b>COD</b>	<i>Chemical organic demand</i> / DQO (português)
<b>COT</b>	Carbono orgânico solúvel total / <i>TOC</i> (inglês)
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional de Meio Ambiente (órgão ambiental do Brasil)
<b>CRD</b>	<i>Completely randomized design</i> / delineamento inteiramente casualizado (português), tipo de tratamento estatístico
<b>DAM</b>	Drenagem ácida de mineração / <i>AMD</i> (inglês)
<b>DO</b>	<i>Dissolved oxygen</i> / OD (português)
<b>DQO</b>	Demanda química de oxigênio / <i>COD</i> (inglês)
<b>dsr</b>	Dissimilatório sulfito-redutase (enzima)
<b>EC</b>	Eletrocoagulação / <i>Electrocoagulation</i> (inglês)
<b>EC<sub>50</sub></b>	<i>Effective concentration for 50% of the sample population</i> / CE <sub>50</sub> (português)
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> / referência da ONU de valores máximos de águas de irrigação para alimentação e agricultura
<b>FC</b>	Fator de concentração
<b>Fe<sub>t</sub></b>	Ferro total
<b>I</b>	Taxa de inibição (%) nos ensaios toxicológicos
<b>LaRA</b>	Laboratório de Reuso de Águas
<b>MAV</b>	<i>Maximum allowable value</i> / VMP (português)
<b>MIW</b>	<i>Mine-impacted water</i> / AIDAM (português)
<b>MF</b>	<i>Metal-free</i> / livre de metais (português)
<b>Mn<sub>t</sub></b>	Manganês total

<b>OD</b>	Oxigênio dissolvido / <i>DO</i> (inglês)
<b>OTU</b>	<i>Operational taxonomic units</i> / Unidade operacional taxonômica (português)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase (português)
<b>QUIT</b>	Quitina comercial / <i>CHIT</i> (inglês)
<b>r</b>	Taxa de crescimento nos ensaios toxicológicos
<b>SILVA</b>	Base de dados de sequências de genes alinhados de rRNA
<b>SRB</b>	<i>Sulfate-reducing bacteria</i> / BRS (português)
<b>SS</b>	<i>Shrimp shell</i> / CC (português)
<b>TOC</b>	<i>Total soluble organic carbon</i> / COT (português)
<b>VMP</b>	Valor máximo permitido / <i>MAV</i> (inglês)



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Justificativa.....	22
1.2. Hipóteses .....	23
1.3. Objetivos.....	24
1.3.1. Objetivo geral .....	24
1.3.2. Objetivos específicos .....	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. Mineração de carvão.....	25
2.2. Drenagem Ácida Mineral (DAM) .....	27
2.3. Efeitos prejudiciais na saúde e no ambiente: pH, metais e sulfato.....	30
2.4. Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e a sulfato-redução .....	35
2.5. Cinética de crescimento bacteriano .....	42
2.6. Análise de sequenciamento <i>high-throughput</i> 16S.....	43
2.7. Quitina .....	45
2.8. Cinéticas de adsorção .....	46
2.8.1. Modelo de pseudo-primeira ordem.....	47
2.8.2. Modelo de pseudo-segunda ordem .....	48
2.8.3. Modelo de difusão intrapartícula .....	49
2.8.4. Modelo de Elovich.....	50
2.9. Tratamentos químicos para DAM: opções disponíveis, vantagens e desvantagens.....	51
2.9.1. Eletrocoagulação (EC).....	52
2.10. Uso secundário da água e legislações ambientais aplicáveis .....	55
2.11. Ensaio toxicológicos .....	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1. Área de estudo e pontos amostrais .....	61
3.2. Caracterização da AIDAM .....	62
3.3. Obtenção e processamento da casca de camarão e da quitina comercial .....	62

3.4. Montagem dos microcosmos .....	63
3.4.1. Sistema de filtração dos microcosmos.....	65
3.4.2. Eliminação do sulfeto de hidrogênio nos microcosmos .....	65
3.5. Análise da comunidade microbiana.....	66
3.6. Eletrocoagulação na remoção de sulfato .....	68
3.6.1. Ordem da cinética de decaimento .....	69
3.6.2. Estudos estatísticos .....	70
3.6.3. Planejamento fatorial .....	70
3.7. Avaliação da toxicidade dos efluentes tratados.....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
4.1. Artigo 1 - Chitin as a substrate for the biostimulation of sulfate-reducing bacteria in the treatment of mine-impacted water (MIW).....	73
4.1.1. Introduction.....	75
4.1.2. Materials and methods .....	78
4.1.2.1. Collection and characterization of mine-impacted water (MIW).....	78
4.1.2.2. Chitin source.....	78
4.1.2.3. MIW treatment: experimental setup for microcosms.....	79
4.1.2.4. Adsorption kinetics of the sediments.....	79
4.1.2.5. High-throughput sequencing .....	80
4.1.3. Results and discussion .....	81
4.1.3.1. MIW characterization and microcosm tests .....	81
4.1.3.2. Microbial community analysis .....	88
4.1.4. Conclusions.....	91
4.2. Artigo 2 - Biostimulation of sulfate-reducing bacteria and metallic ions removal from coal mine-impacted water (MIW) using shrimp shell as treatment agent. ....	93
4.2.1. Introduction.....	95
4.2.2. Materials and methods .....	98
4.2.2.1. Sampling and characterization of MIW.....	98

4.2.2.2. <i>SS and CHIT processing</i> .....	99
4.2.2.3. <i>Microcosms flasks setup</i> .....	99
4.2.2.4. <i>Statistical analysis</i> .....	100
4.2.2.5. <i>Microbial community analysis</i> .....	100
4.2.3. Results and discussion .....	101
4.2.3.1. <i>MIW characterization and treatment</i> .....	101
4.2.3.2. <i>Bacterial community structure</i> .....	107
4.2.4. Conclusions .....	111
4.3. Artigo 3 - Sulfate removal from mine-impacted water by electrocoagulation: statistical study, factorial design, and kinetics .....	112
4.3.1. Introduction .....	114
4.3.2. Material and methods .....	118
4.3.2.1. <i>MIW collection and analytical methods</i> .....	118
4.3.2.2. <i>Experimental set-up for electrocoagulation</i> .....	118
4.3.2.2.1. <i>Statistical study</i> .....	119
4.3.2.2.2. <i>Kinetics studies</i> .....	119
4.3.2.2.3. <i>Factorial design</i> .....	120
4.3.3. Results and discussion .....	121
4.3.3.1. <i>pH rise and sulfate removal in continuous mode of exposure</i> .....	121
4.3.3.2. <i>Kinetics study over the highest sulfate removal assay</i> .....	125
4.3.3.3. <i>Factorial design</i> .....	126
4.3.4. Conclusions .....	129
4.4. Artigo 4 - Estudo de toxicologia aguda com <i>Landoltia punctata</i> como organismo-teste de água de rio impactada com drenagem ácida de mineração (AIDAM) após tratamentos paralelos via bioestimulação de BRS e eletrocoagulação. ....	130
4.4.1. Introdução .....	131
4.4.2. Materiais e métodos .....	132
4.4.2.1. <i>AIDAM: coleta e caracterização</i> .....	132

4.4.2.2. <i>Preparação da casca de camarão (CC), montagem dos microcosmos e remoção do sulfeto de hidrogênio</i> .....	133
4.4.2.3. <i>Ensaio de eletrocoagulação (EC)</i> .....	134
4.4.2.4. <i>Ensaio toxicológico</i> .....	135
4.4.3. Resultados e discussão .....	136
4.4.3.1. <i>Caracterização de AIDAM, ensaio com microcosmos e de eletrocoagulação</i> ...	136
4.4.3.2. <i>Ensaio toxicológico</i> .....	138
4.4.4. Conclusões .....	140
5. CONCLUSÕES - Síntese dos resultados obtidos .....	143
6. RECOMENDAÇÕES.....	145
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	147
8. APÊNDICES .....	169

## 1. INTRODUÇÃO

---

O processo de extração e beneficiamento de carvão mineral é uma das principais atividades econômicas do sul do Estado de Santa Catarina-Brasil (MACAN et al., 2012), com reservas de cerca de 1,53 bilhões de toneladas (BRASIL, 2017). Entretanto, a exploração do carvão mineral no estado foi historicamente realizada de forma extrativista, sem os devidos cuidados com os impactos que esta atividade poderia causar (NASCIMENTO et al., 2002). As minas de carvão que têm suas reservas esgotadas, ou mesmo inviabilizadas de operar, passam por processos de encerramento de atividades, onde estão elencados, entre outros procedimentos, a recomposição ambiental das áreas impactadas e fechamento das bocas de minas (KREBS et al., 2010). Atualmente, as minas em funcionamento não apresentam um grande problema, pois seus resíduos e efluentes, são em teoria, devidamente tratados; o desafio consiste nas minas desativadas e abandonadas.

Estima-se que haja mais de mil minas abandonadas na Região da Bacia Carbonífera de Santa Catarina e em função disto, esta região é impactada ambientalmente, pois mesmo após encerrarem suas operações, essas minas continuam liberando Drenagem Ácida Mineral (DAM), um efluente ácido, rico em íons metálicos e sulfato, contaminando as águas superficiais e subterrâneas (MACAN et al., 2012; MAMELKINA et al., 2017; VITAL et al., 2018). A maioria dos rios desta região são contaminados com DAM, e então nenhum uso pode ser dado à sua água (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a), como é o caso do Rio Sangão, em Forquilha – SC (28°45'38.7"S 49°25'58.1"W). A DAM é resultante de uma série de reações de oxidação do sulfeto (presente em pilhas de rejeitos das jazidas de carvão), que ocorre em presença de ar e água, de difícil controle de geração (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016). Estudos apontam um passivo ambiental em Santa Catarina de aproximadamente 200 milhões de toneladas de rejeitos de carvão, sendo responsáveis por gerar de centenas a milhares de metros cúbicos de DAM diariamente (BUZZI et al., 2013). A degradação ambiental oriunda da DAM é de resolução complexa, porque necessita tratamento químico contínuo, fato este que torna o processo oneroso e logisticamente inviável, em áreas de difícil acesso e sem energia elétrica, como é o caso das diversas minas abandonadas. Como resultado, esta região carbonífera apresenta poucas perspectivas de recuperação (LUZ; SAMPAIO, 2015).

Em estudos recentes, a biorremediação de DAM através de bactérias redutoras de sulfato (BRS) tem sido considerada uma alternativa promissora em relação aos métodos tradicionais, mostrando-se eficiente tanto em ensaios de campo quanto laboratoriais, sendo considerada uma tecnologia globalmente aceita (COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017; DEV et al.,

2015; DEV; ROY; BHATTACHARYA, 2017; GUO; KANG; FENG, 2017; HUSSAIN et al., 2016; LE PAPE et al., 2017; SÁNCHEZ-ANDREA; TRIANA; SANZ, 2012; ZHANG et al., 2017b; ZHANG; WANG, 2016). Também em estudos recentes, a técnica de eletrocoagulação tem apresentado resultados razoáveis no tratamento deste tipo de efluente (MAMELKINA et al., 2017, 2019; NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017; NARIYAN; WOLKERSDORFER; SILLANPÄÄ, 2018), principalmente por conta do baixo pH (característico da DAM), pois em condições mais ácidas, as espécies carregadas positivamente interagem eletrostaticamente com os ânions (como o  $\text{SO}_4^{2-}$ ), formando precipitados e espécies carregadas (como  $[\text{Al}(\text{OH})]^{2+}$ ;  $[\text{Al}(\text{SO}_4)]^+$ ;  $[\text{Al}(\text{OH})_2]^+$ ;  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ;  $[\text{Al}(\text{SO}_4)_2]^-$ ;  $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ ).

Neste estudo avaliou-se a biorremediação de água de rio impactado com DAM (AIDAM) através da construção de microcosmos, bioestimulando o crescimento destas bactérias. E como fonte de carbono, foram utilizados materiais quitinosos, oriundos da casca de diversos crustáceos, entre elas a casca de camarão (CC), por ser um resíduo abundante da indústria pesqueira de Santa Catarina, cuja produção em 2018 foi de 311,8 toneladas (EPAGRI; CEPA, 2019), aliado ao fato de sua disposição inadequada também gera problemas ambientais (KARDAS et al., 2012). Variaram-se também outras condições de operação: adição ou não de inóculo, remoção prévia dos íons metálicos da AIDAM, correção do pH com carbonato. Além do tratamento biológico, também foram feitos ensaios de eletrocoagulação (EC) no tratamento de AIDAM, variando-se a densidade de corrente e a forma de exposição à corrente elétrica (intermitente ou contínua), avaliando-se ambas formas de tratamento.

Desta forma, o presente trabalho de doutorado consistiu em avaliar sistemas de tratamento de AIDAM, visando principalmente a remoção do sulfato, adequando-o de acordo com os padrões legais pertinentes, viabilizando seu uso secundário não-potável, sendo o tema central do Laboratório de Reuso de águas (LaRA), que nos últimos anos vem desenvolvendo, entre outras linhas de pesquisa, a de tratamento deste tipo de efluente (NÚÑEZ-GÓMEZ (2014), ROSICH-GIMENEZ (2017), NÚÑEZ-GÓMEZ (2018), JEREMIAS (2019)).

### **1.1. Justificativa**

Diante dos sérios impactos causados pelas atividades de mineração ao redor do mundo e tendo em vista a importância da atividade mineradora na região da Bacia Carbonífera de Santa Catarina, aliada ao elevado número de minas abandonadas, a problemática ambiental da DAM emerge de forma intensiva, por conta da alta toxicidade e persistência no meio, podendo comprometer ainda mais os recursos hídricos da região.

A CC foi selecionada por ser um resíduo que contém entre outros compostos, a quitina,

cuja capacidade sortiva de metais já era conhecida e  $\text{CaCO}_3$ , que é um agente neutralizante de acidez. Desta forma, o presente trabalho pretendeu trazer contribuições científicas, tecnológicas e socioambientais, sendo elas:

- Utilização de técnicas de bioestimulação e eletrocoagulação para o tratamento de AIDAM priorizando a remoção do sulfato;
- Emprego de um resíduo, a casca de camarão, no tratamento, proporcionando dupla sustentabilidade ao trabalho;
- Elucidação da dinâmica bacteriana das BRS frente ao processo de sulfato-redução e na identificação das bactérias;
- Discussão sobre bactérias capazes de realizar sulfato-redução e não serem classificadas como BRS;
- Produção, via eletrocoagulação, de efluente final não tóxico, com baixa concentração de acidez, metais e sulfato, sendo adequado para uso não potável, no uso da água para fins menos nobres, poupando assim os escassos mananciais de qualidade da região.

## 1.2. Hipóteses

Com base na fundamentação da literatura, nesta pesquisa foram verificadas as seguintes hipóteses:

- A casca de camarão (CC) é melhor fonte de carbono do que a quitina comercial para o crescimento das BRS;
- A CC contribui no tratamento, possui capacidade de efetuar tratamento da AIDAM, pelos seguintes motivos:
  - I. A molécula de quitina possui uma relação C:N ótima para crescimento bacteriano;
  - II. A quitina possui conhecida capacidade sortiva de íons metálicos;
  - III. A CC possui carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em sua composição, que é um agente removedor de acidez (alcalinizante), além de outros compostos orgânicos, como proteínas.
- O sedimento de local contaminado com DAM (boca de mina) contém inóculo para cultivo das BRS.
- A correção prévia do pH viabilizaria o desenvolvimento das BRS;
- Nos ensaios de eletrocoagulação, a redução do tempo de exposição à corrente elétrica, bem como menores densidades de corrente, resultam em menores eficiências de remoção.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo geral**

Avaliar sistemas de tratamento alternativos para remediação de água de rio impactada por DAM (AIDAM) através da bioestimulação de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e de eletrocoagulação (EC).

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Comparar a eficiência de duas fontes de quitina (casca de camarão e quitina comercial) no desenvolvimento das BRS em ensaios com microcosmos;
- Analisar a influência das variáveis envolvidas no processo de desenvolvimento das BRS (adição ou não de inóculo, remoção prévia dos íons metálicos, correção do pH com carbonato);
- Determinar a eficiência de remoção de sulfato e taxa de remoção de íons metálicos ( $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Mn}_t$ );
- Identificar a comunidade bacteriana desenvolvida nos ensaios que apresentaram sulfato-redução;
- Avaliar a eficiência do tratamento eletroquímico de AIDAM através de ensaios de eletrocoagulação;
- Avaliar a possibilidade da obtenção de água adequada para uso secundário não-potável, por meio da comparação da composição dos efluentes tratados com os valores máximos permitidos (VMP) pela legislação vigente e de estudo toxicológico.

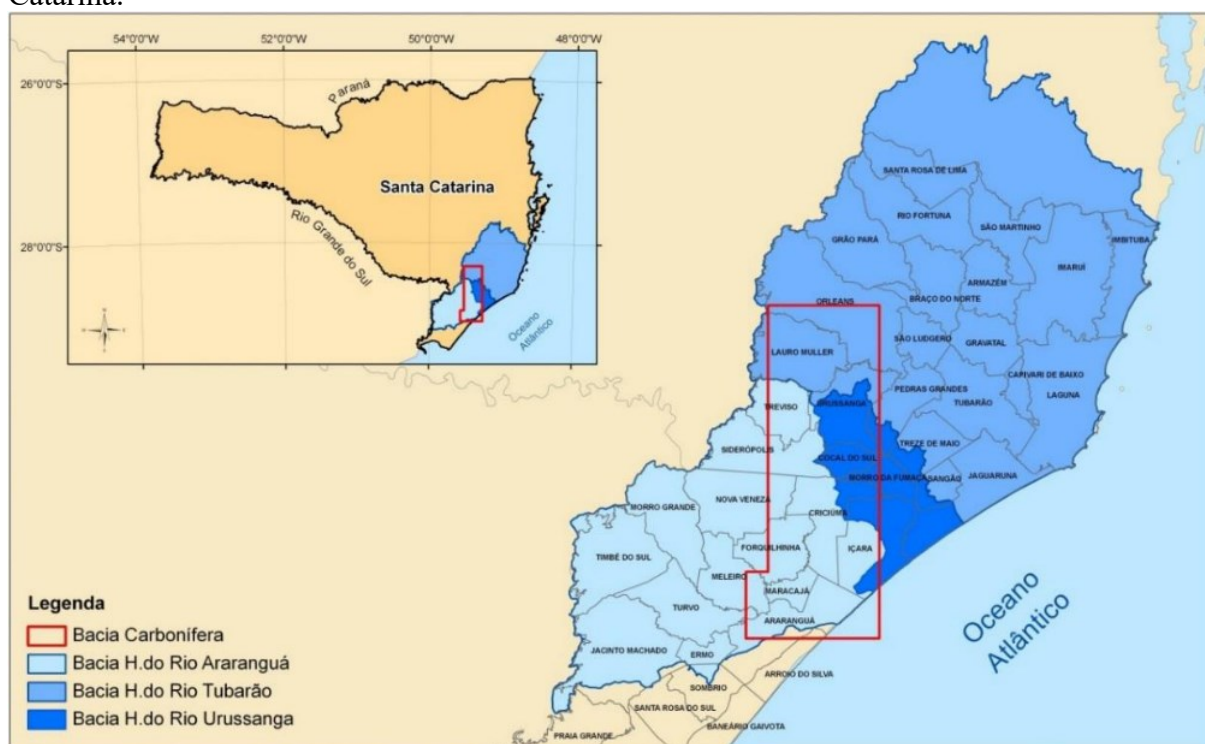


## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Mineração de carvão

Santa Catarina está entre os estados com uma das maiores reservas de carvão mineral do Brasil, possuindo cerca de 1,53 bilhões de toneladas (BRASIL, 2017). Estas reservas encontram-se na região sul de Santa Catarina, que caracterizou-se pela intensa exploração deste carvão a partir do século XIX e passou a ser denominada “Bacia Carbonífera de Santa Catarina” (delimitada na Figura 1). Atualmente, esta área apresenta uma extensão total de 1.850 km<sup>2</sup>, abrangendo as Bacias Hidrográficas dos rios Araranguá, Tubarão e Urussanga, que compreende os municípios de Orleans, Lauro Müller, Criciúma, Siderópolis, Treviso, Urussanga, Forquilha, Maracajá e Araranguá (NASCIMENTO et al., 2002).

**Figura 1.** Delimitação da Bacia Carbonífera dentro das Bacias Hidrográficas do sul de Santa Catarina.



Fonte: (BRASIL, 2018).

A exploração do carvão mineral de Santa Catarina foi considerada estratégica para a industrialização brasileira, pois durante as duas guerras mundiais, o país esteve à beira do colapso de atividades vitais para sua economia, devido à escassez de combustível para a indústria e transportes marítimo e ferroviário. Desta forma, a utilização do carvão serviu de

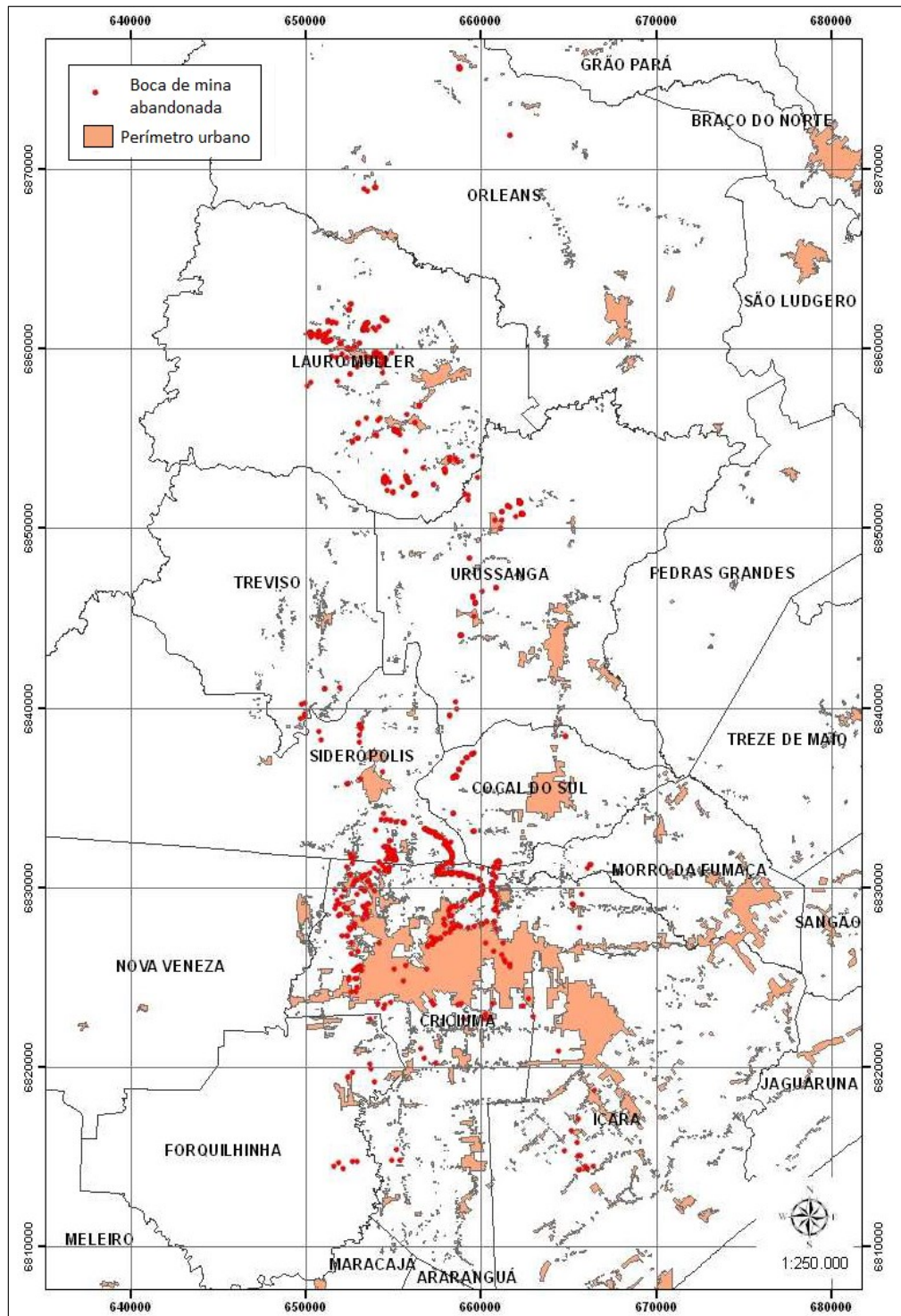
suporte, evitando maiores consequências no contexto social. Conseqüentemente, foi uma oportunidade para o surgimento das diversas empresas carboníferas na região (BELOLLI; QUADROS; GUIDI, 2002).

Atualmente, o Brasil, por ser bastante dependente de hidrelétricas, em épocas de estiagem prolongada ou com risco de apagão, ainda recorre às termelétricas (que incluem o uso do carvão, entre outras fontes de energia não-renováveis). Portanto, mesmo não sendo a fonte de energia ambientalmente mais limpa, o carvão ainda possui um valor estratégico para o estado de Santa Catarina e para o país.

O carvão mineral brasileiro possui baixo poder calorífico e alto teor de impurezas, entre elas, cinzas e o enxofre (em média 2%, podendo chegar a 8%) (BELOLLI; QUADROS; GUIDI, 2002) e os resíduos de pirita constituem cerca de 50 a 65% do carvão extraído (BUZZI et al., 2013). A extração do carvão pode ser realizada em minas a céu aberto ou subterrâneas, dependendo da profundidade em que se encontra a camada e da geologia do depósito mineral. Ambas exercem impacto significativo, entretanto as minas a céu aberto são potencialmente mais impactantes, em razão da produção de grandes quantidades de rejeitos que, dispostos de forma incorreta, juntamente com o problema de inversão da cama do solo, ocasionam sérios problemas ambientais, segundo dados do Serviço Geológico do Brasil (2014). A passagem de água pelos vazios subterrâneos deixados pelas atividades mineradoras, que foram depositadas sobre a superfície, ocasionam a formação da drenagem ácida de mineração (DAM) (BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017).

Embora a estimativa de minas abandonadas na região da Bacia Carbonífera Catarinense seja superior a 1.000 (LATTUADA et al., 2009), o número oficial segundo o 11º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais, apresentado ao Ministério Público Federal, aponta para 822 bocas de minas abandonadas já imputadas em juízo (BRASIL, 2018). Na Figura 2 tem-se uma estimativa da distribuição das bocas de minas na região. O termo "boca de mina" é usado para designar as aberturas construídas para acesso à camada de carvão nas minas (KREBS et al., 2010). A imagem da Figura 2 refere-se às bocas de minas cadastradas até abril de 2010, sendo o intuito meramente ilustrativo, uma vez que há uma certa dificuldade para encontrar-se dados e cartas topográficas consolidadas e atualizados para este tipo de informação.

**Figura 2.** Mapa das bocas de minas abandonadas na Bacia Carbonífera Catarinense.



Fonte: (KREBS et al., 2010).

## 2.2. Drenagem Ácida Mineral (DAM)

A drenagem ácida mineral (DAM) ocorre em áreas nas quais os resíduos de minas (pilhas de rejeitos provenientes do beneficiamento), ricos em sulfetos, permanecem expostos à água e

ao ar, sofrendo processos de oxidação (DEMERS et al., 2015; FRIPP; ZIEMKIEWICZ; CHARKAVORKI, 2000). Sua formação ocorre por uma série de processos químicos e biológicos, envolvendo a oxidação destes sulfetos, gerando um efluente com altas concentrações de sulfato, elevada acidez (pH entre 2 e 4) e consequentemente íons metálicos dissolvidos (Fe, Al, Mn, Zn, Cu, Pb, etc.) (COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017; MOREIRA et al., 2017; ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2014; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014), sendo normalmente o Fe o mais abundante dentre eles (SANTOS; JOHNSON, 2017). A natureza ácida da DAM favorece que os metais pesados se solubilizem (JOHNSON, 1998; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2011, 2012a), o que a torna altamente tóxica e corrosiva (NLEYA; SIMATE; NDLOVU, 2016).

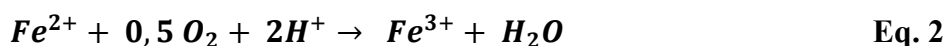
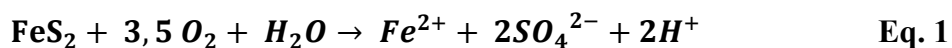
Segundo Skousen et al. (1998), estes sulfetos de origem geológica, que inicialmente estavam inertes sob condições anóxicas, oxidam quando são expostos à atmosfera, seja por atividades mineradoras ou outros tipos de escavações profundas. Na Tabela 1 são indicados os sulfetos mais comumente encontrados em regiões de mineração, os quais variam de acordo com a geologia do entorno.

**Tabela 1.** Principais sulfetos metálicos típicos de regiões de mineração.

<b>Fórmula química</b>	<b>Nome</b>
FeS <sub>2</sub>	Pirita e Marcassita
Fe <sub>x</sub> S <sub>x</sub>	Pirrotita
Cu <sub>2</sub> S	Calcosita
CuS	Covelita
CuFeS <sub>2</sub>	Calcopirita
MoS <sub>2</sub>	Molibdenita
NiS	Milerita
PbS	Galena
ZnS	Esfalerita
FeAsS	Arsenopirita
CoS	Cobaltita
FeNiS	Pentlandita

Fonte: (MASINDI; OSMAN; ABU-MAHFOUZ, 2017; NATARAJAN, 2008).

As Equações de 1 a 4 ilustram o conjunto de reações oxidativas (BWAPWA; JAIYEOLA; CHETTY, 2017; KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017; NLEYA; SIMATE; NDLOVU, 2016; SKOUSEN et al., 2017) e de natureza auto-catalítica. A pirita foi selecionada para representar a reação, pois reportam-se teores superiores a 95% deste mineral em rejeitos de minas (PÉREZ; SCHWARZ; URRUTIA, 2017) e também por ser mineral de sulfeto mais abundante da crosta terrestre (MOODLEY et al., 2018; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).



Na Eq. 1, a pirita é oxidada, gerando íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e acidez ( $\text{H}^+$ ). O  $\text{Fe}^{2+}$  em atmosfera suficientemente oxidante, é oxidado a íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), seguindo a Eq. 2, que por sua vez, em pH entre 2,3 e 3,5, é hidrolisado e precipitado a hidróxido férrico ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) (RYAN; KNEY; CARLEY, 2017), juntamente com formação de mais acidez, conforme a Eq. 3. Ou ainda, o  $\text{Fe}^{3+}$  pode agir como um catalisador, atacando diretamente a pirita e gerando grandes quantidades de íons ferrosos, sulfato e acidez (Eq. 4), cessando o processo apenas quando a pirita se esgotar. Esta oxidação catalítica ocorre de 18 a 170 vezes mais rápida que a da Eq. 1 (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2011).

A Eq. 2, além da via química, pode ocorrer biologicamente, pela ação das bactérias quimiolitotróficas acidofílicas de gênero *Thiobacillus*, podendo esta oxidação biológica ocorrer desde centenas até milhões de vezes mais rápida que a oxidação química (JING et al., 2018; NLEYA; SIMATE; NDLOVU, 2016; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2011).

A fim de evitar que haja oxidação de sulfetos e conseqüentemente aumento da acidez e capacidade de lixiviação do efluente, a eliminação do contato do ar e/ou água do sistema seria suficiente para cessar a oxidação da pirita (DEMERS et al., 2015). Tal condição, de fato ocorre nas regiões profundas ou no interior de rochas maciças, onde as condições de oxidação são limitadas. Desta forma, a pirita permaneceria inerte ou reagiria minimamente, sendo que a pouca acidez gerada poderia ser diluída ou mesmo neutralizada por rochas alcalinas. O infortúnio ocorre quando grandes quantidades de pirita são expostas a condições oxidantes por um longo período de tempo, assim, o problema surge de forma massiva, o que é o caso da mineração (MOODLEY et al., 2018; SKOUSEN et al., 1998).

Durante uma coleta da DAM ou mesmo numa fase inicial do estudo, reporta-se que um exame visual pode fornecer algumas informações qualitativas, tais como (FRIPP; ZIEMKIEWICZ; CHARKAVORKI, 2000):

- Manchas alaranjadas e água turva, podem indicar a presença de Fe e pH > 3,5.
- Manchas vinho e água límpida, podem indicar a presença de Fe e pH < 3,5.
- Manchas brancas podem indicar a presença de Al e pH > 4,5.
- Manchas castanho escuras podem indicar a presença de Mn e pH > 7.

- Em lagoas, a cor azul pode indicar Al e o marrom avermelhado pode indicar Fe.

Não há uma estimativa precisa da quantidade de DAM gerada no mundo, no entanto, acredita-se que uma única mina pode levar à formação desde centenas a milhares de metros cúbicos de DAM. E nos países em desenvolvimento, apenas uma fração desse valor é tratada ou gerenciada (VITAL et al., 2018).

### 2.3. Efeitos prejudiciais na saúde e no ambiente: pH, metais e sulfato

A DAM representa um problema ambiental significativo (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015; MOREIRA et al., 2017), representando a principal fonte de poluição de águas doces superficiais no planeta (MESA et al., 2017), sendo neste presente trabalho denominado AIDAM (águas impactadas por DAM). Diversos rios da região de Santa Catarina são considerados “mortos”, pelo elevado nível de toxicidade por ela causado (LATTUADA et al., 2009; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016; OSÓRIO et al., 2014). Estes problemas ambientais são frutos de mais de 130 anos de atividade mineradora, juntamente a outras fontes de poluição (SILVA et al., 2013). Na Figura 3 tem-se uma fotografia do Rio Sangão, um dos diversos rios impactados com DAM, localizado na Bacia do Rio Araranguá. Nele, é possível notar a existência de um revestimento amarelo-alaranjado acumulado no sedimento do rio.

**Figura 3.** Rio Sangão (Forquilha-SC), altamente contaminado por DAM.

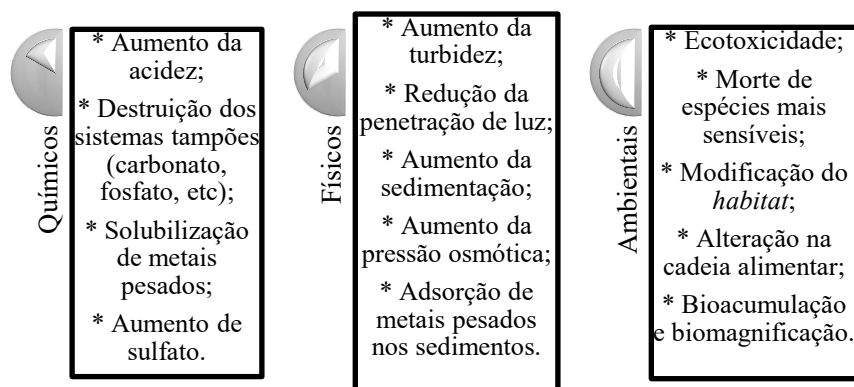


Fonte: a autora, em 28/08/2017.

Tal sedimento é o hidróxido férrico (Eq. 3), também chamado de ocre por alguns autores (JOHNSON; HALLBERG, 2005; SIMATE; NDLOVU, 2014) e de *yellow boy* por outros (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017; MOODLEY et al., 2018; NAME; SHERIDAN, 2014), o qual pode prejudicar o *habitat*, inclusive comprometer a desova de alguns peixes (BECERRA et al., 2009). Simate e Ndlovu (2014) reportam que esse acúmulo de sedimentos pode cimentar os substratos presentes no fundo do rio, que servem de alimento para organismos bentônicos, que por sua vez, servem de alimento para outros animais e assim sucessivamente, até esgotar a cadeia alimentar. Becerra (2010) cita que não foram encontrados peixes ou invertebrados ao longo de 2 km a jusante de um rio, após um único despejo de DAM oriundo de uma mineradora abandonada de pirita, em Massachusetts, EUA.

A produção e a circulação destas correntes ácidas, gera problemas para a recuperação destas áreas, pois impedem o estabelecimento da vegetação, inclusive provocando o desaparecimento da mesma já bem estabelecida (NAME; SHERIDAN, 2014). Diversos efeitos negativos diretos ou indiretos em cursos hídricos podem ser citados quando estes são contaminados com DAM, estando alguns dos principais compilados na Figura 4.

**Figura 4.** Principais efeitos oriundos de contaminação com DAM.



Fonte: Adaptado de (BECERRA et al., 2009; SANTOS; JOHNSON, 2017).

Em relação ao pH, um meio ácido pode comprometer os equilíbrios dinâmicos, como troca de íons e respiração dos organismos nele presentes, pois a maioria dos processos fisiológicos da biota aquática ocorre em pH entre 6-9 (SIMATE; NDLOVU, 2014). Quando o pH sai desta faixa, pode incorrer em numerosos efeitos subletais, como taxa de crescimento reduzida ou até mesmo em mortalidade. Na Tabela 2 são apresentadas as principais implicações no meio aquático causados pela acidificação.

**Tabela 2.** Efeitos na biota aquática decorrentes do baixo pH da água.

<b>pH</b>	<b>Efeito no corpo hídrico</b>
≤ 5	Espécies não desejáveis de plâncton e musgos começam a invadir, algumas espécies de peixes desaparecem.
< 4,5	Biota essencialmente desprovida de peixe.
< 2	Apenas algumas algas sobrevivem, sendo poucos os organismos deste tipo e as suas tolerâncias extremas não refletem o pH tolerado pela maioria.

Fonte: (SIMATE; NDLOVU, 2014).

Com o aumento da acidez do meio, também ocorre uma dissolução de metais, como Al, Mn, Fe (sendo oriundos das partículas de solo), Zn, Cu, Cd, As (metalóide), Cr, Hg, entre muitos outros (MOREIRA et al., 2017; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016). Os metais pesados presentes neste tipo de efluente, geralmente coexistem com outros metais, i.e., eles dificilmente são a única espécie catiônica presente, geralmente a AIDAM contém vários íons metálicos presentes, variando de acordo com a composição do solo (FLORENTINO et al., 2016b; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a; PAPIRIO et al., 2013).

O risco de absorção de metais nos seres humanos e em animais reside em dois aspectos: na capacidade de persistirem nos organismos por longos períodos (bioacumulação) e na capacidade de se acumularem em sucessivos níveis tróficos (biomagnificação) (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a), podendo assim causar doenças agudas e crônicas, afetando principalmente os seres humanos, pois estão no topo da cadeia alimentar. Em geral, os metais pesados causam alterações de funções metabólicas de órgãos vitais, bloqueio de atividades biológicas, podendo inativar enzimas, induzir estresse oxidativo severo, inibir a absorção de metais essenciais e causar danos irreversíveis, como lesões nos rins, fígado, cérebro, sistemas reprodutor e nervoso central, reportando-se até mesmo efeitos carcinogênicos e mutagênicos (BARBOSA et al., 2014; NAJIB et al., 2017; SIMATE; NDLOVU, 2014).

Os íons metálicos mais comumente encontrados em DAM de minas abandonadas de carvão são Fe, Mn e Al (SEO et al., 2017), sendo estes também os mais abundantes nas águas contaminadas do rio Sangão-SC (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016), objeto desta pesquisa. Para os metais Fe e Mn, embora sejam considerados essenciais, sua ingestão em excesso pode ocasionar danos irreversíveis à saúde humana, conforme indicado na Tabela 3.

O Al, além de não ser um nutriente, é bastante tóxico para várias formas de vida, mesmo quando presente em baixas concentrações; desta forma, sua remoção é altamente desejável e necessária antes que essas águas entrem em contato com ambientes prístinos e sua principal fonte em ambientes ácidos é a intemperização de minerais de aluminossilicato presentes nas rochas (FALAGÁN et al., 2017). Permanece em solução até pH 6: em pH inferior a 1,



predomina a forma  $Al^{3+}$ , já em pH entre 1,5 e 6, em águas ricas em sulfato, como é o caso da DAM, predominam as forma solúveis de complexos de sulfato (como  $AlSO_4^+$  e  $Al(SO_4)_2^-$ ) (FALAGÁN et al., 2017; SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007). Apesar de outros trabalhos (FRIPP; ZIEMKIEWICZ; CHARKAVORKI, 2000; SHEORAN; SHEORAN, 2006) reportarem que o Al já precipite em  $pH > 5$ , de forma que ocorre sua hidrólise e precipitação na forma de hidróxido. Fripp, Ziemkiewicz e Charkavorki (2000) e Sheoran e Sheoran (2006) também reportam que a precipitação do Mn ocorre em  $pH > 7$  e o  $Fe^{2+}$  (em ausência de oxigênio) precipita apenas em  $pH > 8,5$ , mas, em presença de oxigênio, este precipita em forma de  $Fe^{3+}$  em  $pH > 3,5$ .

**Tabela 3.** Principais efeitos na saúde humana de alguns metais.

<b>Metal</b>	<b>Função nutriente</b>	<b>Excesso</b>
Fe	Componente das proteínas do grupo heme, havendo de 3-5 g de Fe no organismo humano	Efeitos cardiovasculares e endócrinos, problemas hepáticos e diabetes.
Mn	Cofator de enzimas envolvidas na fosforilação e síntese de colesterol e ácidos graxos	Manganismo, necrose epitelial, afeta sistema nervoso central, rins, fígado, causa desordens psiquiátricas, irritabilidade.
Al	Metal não-essencial	Complicações renais e ósseas, incapacidade pulmonar, anemia, osteoporose, atrapalha absorção e metabolismo de diversos nutrientes, níveis elevados relacionados a mal de Alzheimer.

Fonte: (APHA, 2017; CETEM, 2001; LEE et al., 2018; NECULITA; ROSA, 2019).

Relacionado ao sulfato, embora possua risco ambiental relativamente baixo quando comparado com os outros poluentes, pois a maioria dos efeitos ambientais é indireto, sua alta concentração eleva o teor de sólidos totais dissolvidos nos corpos receptores, afetando sua utilidade a jusante, como potabilidade, irrigação ou mesmo uso industrial (MOODLEY et al., 2018; MOOSA; NEMAT; HARRISON, 2005). Alguns autores (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; MAMELKINA et al., 2017; MOODLEY et al., 2018; MORET; RUBIO, 2003; NAJIB et al., 2017; RUNTTI et al., 2018) citam alguns efeitos nocivos do sulfato:

- Pode causar diarreia quando ingerido em altas concentrações ( $> 500 \text{ mgL}^{-1}$ ), bem como mudanças no níveis de metemoglobina e sulfemoglobina;
- *Stress* osmorregulatório, podendo levar espécies aquáticas à letalidade;
- Na ausência de oxigênio e de nitrato (anaerobiose), pode atuar como acceptor de

elétrons e gerar gás sulfídrico ( $H_2S$ ). Este fenômeno cria problemas de odor, corrosão, além de ser tóxico para os seres humanos. Portanto, as águas residuais ricas em sulfato requerem tratamento antes de serem liberadas para o meio ambiente;

- O gás sulfídrico pode causar morte em seres humanos dentro de 30 minutos em concentrações gasosas entre a faixa de  $800 - 1.000 \text{ mg L}^{-1}$  ou morte instantânea em concentrações mais elevadas;
- Existem evidências de que altas concentrações de sulfato podem ocasionar liberação de fosfatos ligados ao sedimento, podendo causar eutrofização;
- Aumento do potencial de corrosão para tubulações e estruturas de tubulações.

A DAM é considerada um dos mais sérios problemas ambientais, pois seus efeitos em corpos d'água podem persistir por séculos (KEFENI et al., 2015; SILVA et al., 2013; SKOUSEN et al., 2017). Tal problemática encontra-se amplamente difundida em países onde houve ou há prática de atividades mineradoras em larga escala (PAPIRIO et al., 2013; SIMATE; NDLOVU, 2014). Outros autores relatam que tais efeitos são de abrangência global, à exceção da Antártica, que afetam seriamente os ecossistemas ao redor das áreas de mineração (GREMBI; SICK; BRENNAN, 2016; ZHANG; WANG, 2016). Diante deste cenário, estima-se que a verdadeira escala da poluição ambiental causada seja difícil de avaliar precisamente (JOHNSON; HALLBERG, 2005).

Ao longo dos anos, a medida que os efeitos ambientais advindos da DAM tornaram-se mais evidentes, estudos têm sido dedicados ao desenvolvimento de técnicas de remediação, controle de origem e de migração (MOODLEY et al., 2018; SIMATE; NDLOVU, 2014). Fundamentado em toda esta problemática e complexidade referente aos impactos gerados por lançamento de efluentes de mineração, o Ministério Público tem se tornado cada vez mais restritivo nas ações públicas: em 2000, moveu uma ação pública (sentença nº 20.097, de 05.01.2000, proferida pela Justiça Federal), condenando solidariamente a União, o estado de Santa Catarina e as empresas mineradoras a promoverem a recuperação ambiental da área atingida pela atividade de extração de carvão no sul do estado (KREBS et al., 2010).

Desta maneira, salienta-se a grande importância de pesquisas relacionadas ao tratamento da DAM, no sentido de evidenciar a problemática, cujos efeitos em corpos hídricos são significativos espacial e temporalmente, podendo comprometer a vida aquática nos corpos receptores, além de inviabilizar o uso desta água para abastecimento.

Como os ecossistemas resultantes de contaminação com DAM são muito ácidos e ricos em metais dissolvidos, a microbiota presente restringe-se quase inteiramente a alguns

microrganismos, cujas funções metabólicas são especializadas em lidar com estas condições severas, podendo inclusive ser de interesse biotecnológico (CHEN et al., 2016; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015), que serão discutidas no tópico a seguir.

#### **2.4. Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e a sulfato-redução**

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) são organismos anaeróbios, procarióticos (dos domínios bacteriano e arquea)<sup>1</sup>, que podem usar o sulfato como aceptor de elétrons no seu metabolismo energético, i.e., são capazes de realizar a redução dissimilatória do sulfato, convertendo-o a sulfeto (LIU et al., 2014; MUYZER; STAMS, 2008; RABUS et al., 2015; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013; ZHOU; XING, 2015). Este produto final da sulfato-redução, o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), é de extrema importância, pois participa de muitos processos biogeoquímicos, principalmente os que envolvem a presença do ferro e do enxofre (CHEN et al., 2016; MADIGAN et al., 2016; MUYZER; STAMS, 2008; SAUNDERS et al., 2005). Estudos estimam que a taxa anual de sulfato-redução seja de 1,3 tera mol, valor correspondente à oxidação de até 30% do fluxo de carbono orgânico para o fundo do mar (RABUS et al., 2015).

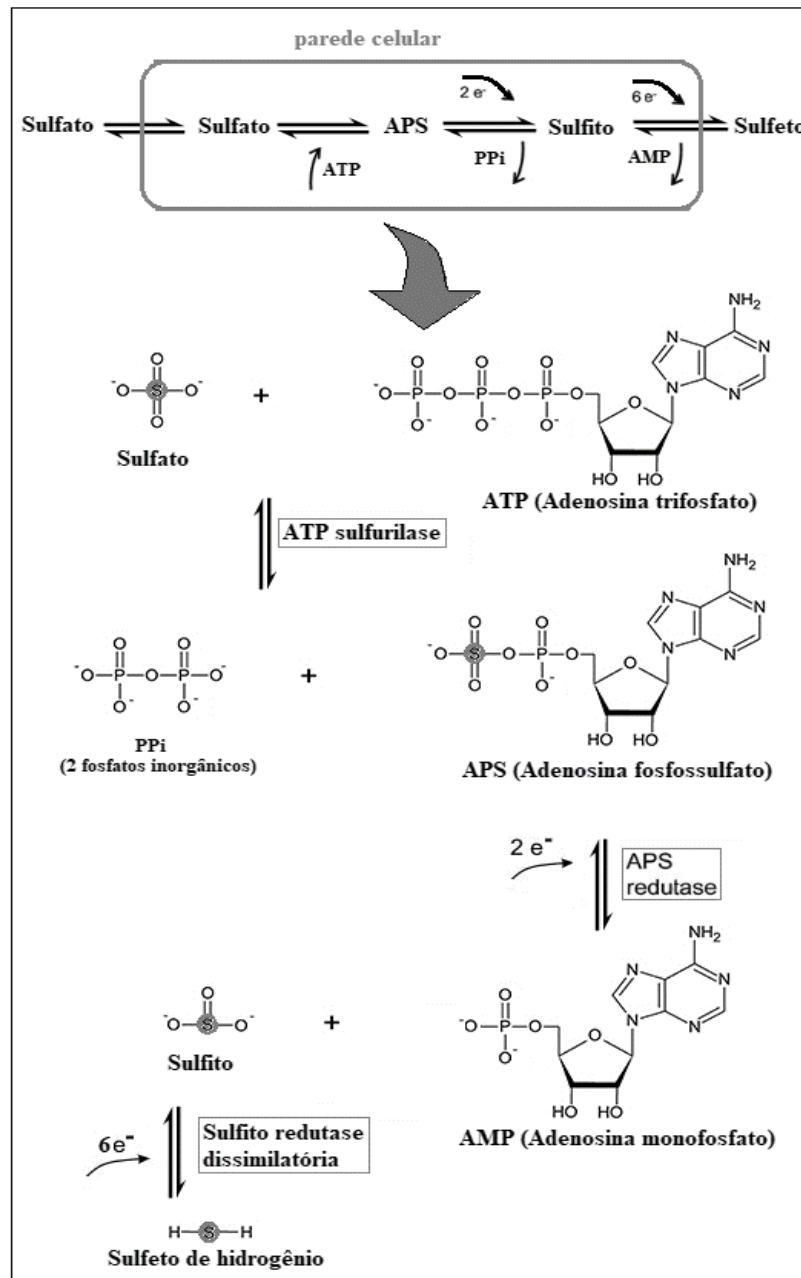
A redução biológica do sulfato pode ser realizada pelos metabolismos assimilatório e dissimilatório. No primeiro, o enxofre é incorporado no crescimento celular, sínteses proteicas, em alguns co-fatores, tais como biotina e em aminoácidos (como cisteína, metionina) (POSTGATE, 1984). Já no metabolismo dissimilatório, as BRS utilizam o sulfato como aceptor de elétrons na respiração anaeróbia celular, o sulfato é reduzido a sulfeto de hidrogênio e excretado no meio, sob condições anaeróbias (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). Estima-se que o metabolismo dissimilatório utilize de 10 a 100 vezes mais enxofre que o assimilatório (POSTGATE, 1965).

A redução dissimilatória do sulfato é ilustrada bioquimicamente pela Figura 5, sendo a redução endergônica a sulfito catalisada por enzimas solúveis (ATP sulfúrilase e APS redutase). Em seguida, ocorre a redução exergônica do sulfito, catalisada por sulfito redutase, a sulfeto de hidrogênio (THAUER; STACKEBRANDT; HAMILTON, 2007).

---

<sup>1</sup> Embora inclua as arqueas, o termo BRS foi utilizado para referir-se aos membros de ambos os domínios, assim como a maioria dos autores o fazem.

**Figura 5.** Rota bioquímica da redução dissimilatória do sulfato.



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES et al., 2019).

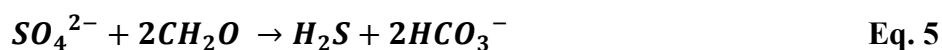
A enzima ATP sulfurilase também é denominada por SAT (sulfato adenilil transferase) e a APS redutase por AprBA (adenilil-sulfato redutase) por alguns autores (ANANTHARAMAN et al., 2018; GREIN et al., 2013). Esta redução de sulfato a  $H_2S$  requer oito elétrons e ocorre por meio de vários estágios intermediários: como o sulfato é bastante estável quimicamente, é ativado por intermédio do ATP (adenosina-trifosfato) e da enzima ATP sulfurilase, que catalisa a ligação do sulfato ao ATP, levando à formação de APS (adenosina-fosfossulfato). Esta ativação eleva o potencial de redução padrão em pH 7 do sulfato a sulfito ( $E^{0'} = -0,52$  V) para próximo de 0 V, fazendo a redução do sulfato possível. A porção de sulfato presente na APS é

reduzida a sulfeto ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) através da APS redutase, liberando AMP (adenosina-monofosfato), e o sulfeto juntamente à enzima *dsr* (dissimilatório sulfeto redutase), levando à formação de sulfeto de hidrogênio (MADIGAN et al., 2016).

As BRS estão naturalmente presentes numa ampla gama de *habitats*, como sedimentos anóxicos, fontes hidrotermais ou hipersalinas, regiões vulcânicas, locais contaminados com DAM, entre outros (DEV et al., 2015; MADIGAN et al., 2016; MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015; RABUS et al., 2015). Alguns autores reportam que sua presença é restrita a zonas anóxicas ou anaeróbias, por serem incapazes de tolerar oxigênio (SINGLETON; ODOM; SINGLETON JR, 1993). A toxicidade do oxigênio molecular é em grande parte devida à formação de espécies parcialmente reduzidas, aliadas à presença de grupos livres de ferro, sulfetos ou sulfidrilas, levando a formação de radicais superóxido e peróxidos (SASS; CYPIONKA, 2007). Contudo, Saunders et al. (2005) reportam que as BRS, são onipresentes em ambientes aquosos naturais, mesmo sob condições predominantemente aeróbias e Hao et al. (1996, 2014) citam que as BRS podem sobreviver a uma exposição temporária ao oxigênio e voltar a se tornar ativas em condições anaeróbias. Em estudos mais recentes, foram detectadas adaptações fisiológicas para lidar com o oxigênio, tal como a respiração aeróbia de algumas BRS (LIU et al., 2014; THAUER; STACKEBRANDT; HAMILTON, 2007). No entanto, esta “redução de sulfato aeróbia” ainda permanece duvidosa, dado que poderia ser explicada pela provável presença de microrregiões anóxicas nos sedimentos (SASS; CYPIONKA, 2007).

As BRS são diversas fisiológica e filogeneticamente (LIU et al., 2014; OKABE, 2007), podendo crescer num amplo espectro de ambientes: temperaturas de 0 a 100 °C, salinidade desde água doce à salinas (HAO et al., 2014) e pertencendo aos cinco maiores grupos bacterianos *Deltaproteobacteria*, *Clostridia*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermodesulfobiaceae*, *Nitrospirae*, e aos dois das arqueas *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* (DEV; ROY; BHATTACHARYA, 2016).

Além de condições anaeróbias, as BRS heterotróficas também requerem uma fonte carbônica (doador de elétrons) para a ocorrência da sulfato-redução (COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017; FLORENTINO et al., 2015; PAPIRIO et al., 2013). Como a DAM é escassa em matéria orgânica (COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017; FLORENTINO et al., 2015), faz-se necessário adicioná-la ao meio para que ocorra o processo de sulfato-redução. A Eq. 5 ilustra a redução heterotrófica, sendo  $\text{CH}_2\text{O}$  a representação de um composto orgânico genérico, que será a fonte energética da reação.



Hussain et al. (2016) reportam a preferência das BRS por compostos orgânicos de menor massa molecular como fontes carbônica e energética. Substratos mais simples, como ácidos graxos de cadeia curta, acetato ou etanol, podem ser utilizados diretamente pelas BRS (HAO et al., 1996; SÁNCHEZ-ANDREA; TRIANA; SANZ, 2012). Entretanto, os substratos mais complexos (proteínas ou oligo e polissacarídeos) devem antes ser hidrolisados e fermentados por outras bactérias, para tornarem-se disponíveis e serem utilizados pelas BRS (MUYZER; STAMS, 2008).

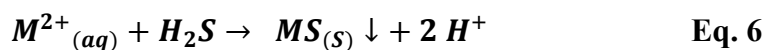
Alguns trabalhos (DAUBERT; BRENNAN, 2007; ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a, 2010, 2011) utilizaram com sucesso materiais quitinosos, como cascas de crustáceos (camarão ou caranguejo), como substrato para a bioestimulação de BRS, com a prerrogativa da quitina contida neste material possuir uma ótima relação C:N (6,9:1) para a atividade das BRS. Estes nutrientes são utilizados na síntese de compostos metabólicos para o crescimento microbiano (aminoácidos, proteínas, enzimas e cofatores enzimáticos) (DEV et al., 2015; DEV; ROY; BHATTACHARYA, 2017). A molécula de quitina será descrita com maiores detalhes adiante no item 2.8.

Nas condições padrão, estequiometricamente o consumo de 0,67 g de DQO (demanda química de oxigênio) por BRS, reduz 1 g de  $\text{SO}_4^{2-}$  (CAMILOTI et al., 2014; MATTEI et al., 2014). Isto significa que quando a relação DQO/ $\text{SO}_4^{2-}$  estiver abaixo de 0,67, mais substrato orgânico é necessário para atingir a remoção total de sulfato, via sulfato-redução (GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015). Entretanto, caso esta relação fique acima, numa cultura mista pode se intensificar a competição de BRS com outros procariontes (bactérias fermentativas, homoacetogênicas ou arqueas metanogênicas) pelo mesmo substrato (DAS et al., 2015). Damianovic e Foresti (2007) enfatizam que diversos outros fatores, como cinética de crescimento, propriedades de imobilização de microrganismos, difusão de substrato no biofilme, bem como condições ambientais (concentração de  $\text{H}_2\text{S}$ , pH, temperatura, etc.) também afetam a competição entre estes microrganismos.

Alguns estudos reportam problemas associados ao desenvolvimento de BRS: elevadas concentrações de metais podem causar inibição, sendo este um dos fatores cruciais na biorremediação (ZHANG; WANG, 2016). Outro problema associado é o baixo pH, que afeta seriamente o crescimento microbiano e compromete a performance da biorremediação (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

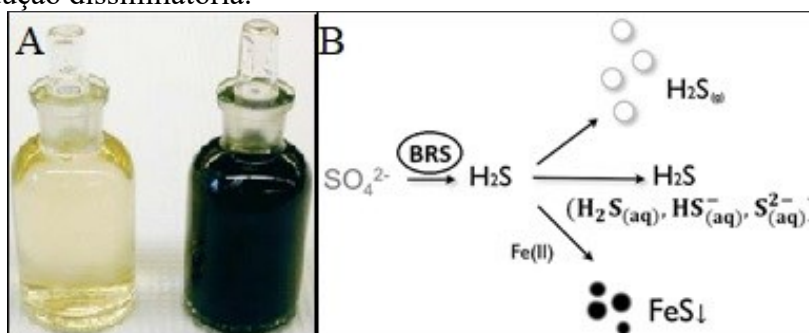
Uma vez gerado, o sulfeto de hidrogênio pode reagir com os metais dissolvidos, preferencialmente os bivalentes (carga  $2+$ , genericamente  $\text{M}^{2+}$ ), tipicamente presentes na DAM, precipitando-os na forma de sulfeto metálico (Eq. 6) (FLORENTINO et al., 2016a; SÁNCHEZ-

ANDREA; TRIANA; SANZ, 2012).



Este precipitado de sulfetos metálicos possui coloração preta (principalmente devido à formação de sulfeto ferroso), conforme pode ser observado na Figura 6A, podendo ser um indicador da atividade das BRS e sulfato-redução (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2012b). FeS geralmente é precursor da pirita (FeS<sub>2</sub>), portanto, precipitar metais na forma de sulfeto é, tipicamente fechar o ciclo que os removeu da origem, revertendo assim, a reação de oxidação (Eq. 1), cujo produto é liberado ao meio ambiente (SKOUSEN et al., 2017). Desta forma, ressalta-se que a sulfato-redução realizada pelas BRS tem duplo benefício: remove o sulfato (transformando-o em sulfeto de hidrogênio) e o sulfeto precipita metais pesados do efluente (KIRAN; PAKSHIRAJAN; DAS, 2017). Na Figura 6B, tem-se representada a rota de formação dos sulfetos de forma compartimentada.

**Figura 6.** (A) Cultura de enriquecimento de BRS: à esquerda, meio estéril, ao centro, um enriquecimento positivo revelando sulfeto ferroso (FeS). (B) Modelo de atenuação de AIDAM por sulfato-redução dissimilatória.



Fonte: (A) (MADIGAN et al., 2016) e (B) adaptado de (BECERRA, 2010).

Sabe-se que quando comparados com hidróxidos metálicos, os sulfetos metálicos são mais estáveis numa ampla faixa de pH, produzem menor volume de lodo e possibilidade de serem recuperados (AYALA-PARRA; SIERRA-ALVAREZ; FIELD, 2016; PAPIRIO et al., 2013). Entretanto, devido a sua baixa solubilidade, os sulfetos metálicos são de controle complexo durante a precipitação, pois muitas partículas pequenas são formadas durante este processo, como aglomerados nanométricos (2-10 nm) ou coloides (faixa de 1 µm). Desta forma, são de difícil recuperação da fase aquosa através de processos de separação sólido-líquido, como filtração (VILLA-GÓMEZ, 2013; VILLA-GÓMEZ et al., 2012). Alguns autores ainda reportam que a recuperação de metais sob forma de sulfeto, nem sempre pode ser alcançada, uma vez que os metais precipitam-se parcialmente na biomassa, dificultando sua recuperação

(VILLA-GÓMEZ et al., 2011).

Moosa, Nemati e Harrison (2005) ressaltam que em alguns casos, na ausência de metais suficientes para precipitarem o sulfeto, faz-se necessária uma etapa adicional para remover o excesso de sulfeto de hidrogênio, porque este exerce efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano (HAO et al., 1996; LIU; YU; LIU, 2015). Sulfeto de hidrogênio é um poluente atmosférico com odor desagradável, sendo tóxico para seres humanos.

Como o ciclo do enxofre é de alta complexidade para balanços de massa, pois a interface do biofilme não descreve as transformações dos ciclos internos, seria necessário explorar mais ferramentas analíticas a fim de superar este problema. A comunidade de BRS e seu rendimento metabólico em biofilmes e em tratamento de DAM ainda são tratados como “caixa-preta”, devido à limitação das técnicas tradicionais dependentes de cultura e à falta de técnicas analíticas suficientes para esta elucidação (VASQUEZ et al., 2018).

Muyzer e Stams (2008) enfatizam que embora tenham-se bastantes informações na literatura sobre a diversidade, fisiologia e bioquímica das BRS, a comunidade científica está apenas “arranhando a superfície” sobre elas e que novas tecnologias, como *high-throughput* (que será elucidada no item 2.6), podem aumentar o sucesso em identificar BRS ainda não elencadas. Hua et al. (2015) reiteram que, de uma forma geral, ainda são poucos os conhecimentos sobre os papéis ecológicos e funcionais dos microrganismos existentes nos ecossistemas terrestres.

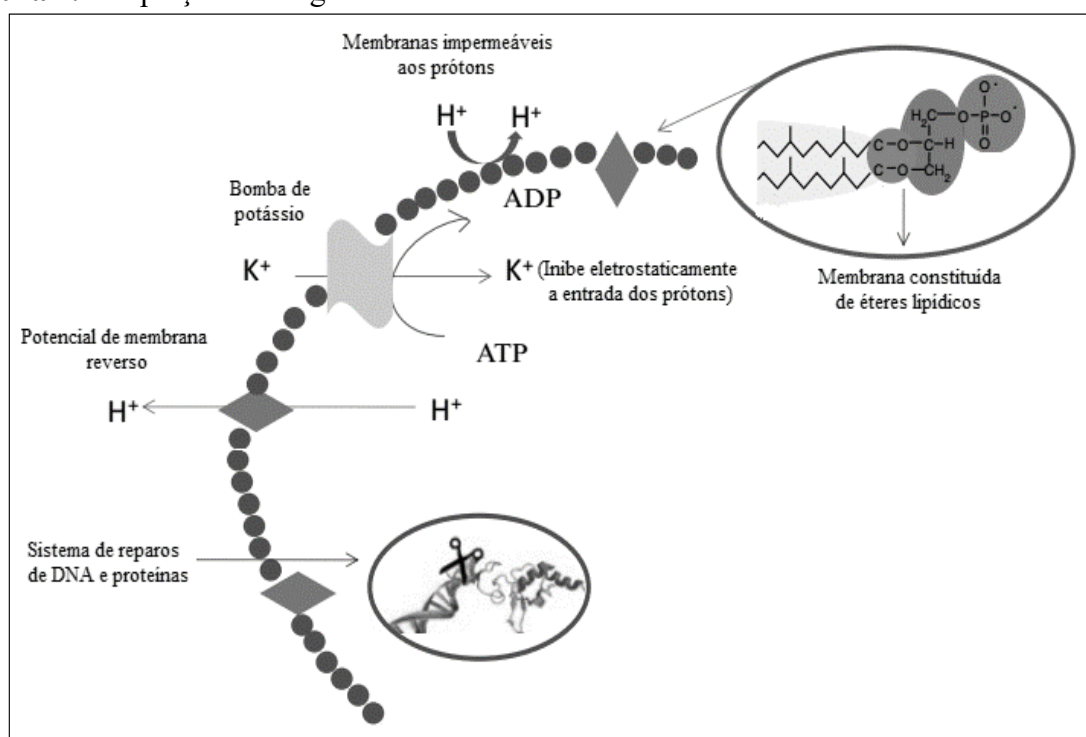
Sabe-se que a maioria das BRS conhecidas é neutrofílica e altamente sensível à acidez, sendo a faixa de pH ótima para crescimento entre 5 e 8 (GREMBI; SICK; BRENNAN, 2016). Inclusive, atribui-se que a principal falha com o uso de BRS no tratamento da DAM é a sensibilidade aguda dos microrganismos à acidez, o que limita consideravelmente sua aplicação (LIU; GONG; LIU, 2014). Todavia, nos últimos anos, têm sido reportadas diversas evidências de bactérias acidofílicas, bem como a tolerância à acidez (BATTAGLIA-BRUNET et al., 2012; KOSCHORRECK, 2008; RABUS et al., 2015; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014; ZHANG; WANG, 2016), como por exemplo:

- Kolmert e Johnson (2001) relataram o desenvolvimento de uma cultura mista acidofílica de BRS em pH 3;
- *Desulfurellaceae acetivorans* cresce a pH 4,3, embora o valor ótimo seja em pH 6-7 (FLORENTINO; STAMS; SÁNCHEZ-ANDREA, 2017);
- Atividade sulfato-redutora foi detectada numa cultura isolada de *Desulfosporosinus acididurans*, na faixa de pH 3,6-3,8 (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015) e também em biorreatores na faixa pH 2,2-2,5 (ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012).



No passado, já foi questionada a existência de BRS acidofílicas, e pensava-se que a presença destas em ambientes ácidos era explicada pela existência de micronichos de maior pH (KOSCHORRECK, 2008). As bactérias acidofílicas possuem mecanismos extras para manter a homeostase do pH, como o uso de enzimas específicas para bombear prótons para o meio extracelular (potencial reverso de membrana), permeabilidade seletiva, tamanho reduzido dos canais da membrana, aumento da capacidade tamponante e aumento de cargas superficiais positivas, entre outros. Por isso, os microrganismos acidofílicos suportam pH mais ácidos do que os neutrofílicos. Na Figura 7 ilustram-se os principais mecanismos estruturais presentes.

**Figura 7.** Adaptações de organismos acidofílicos em ambientes ácidos.



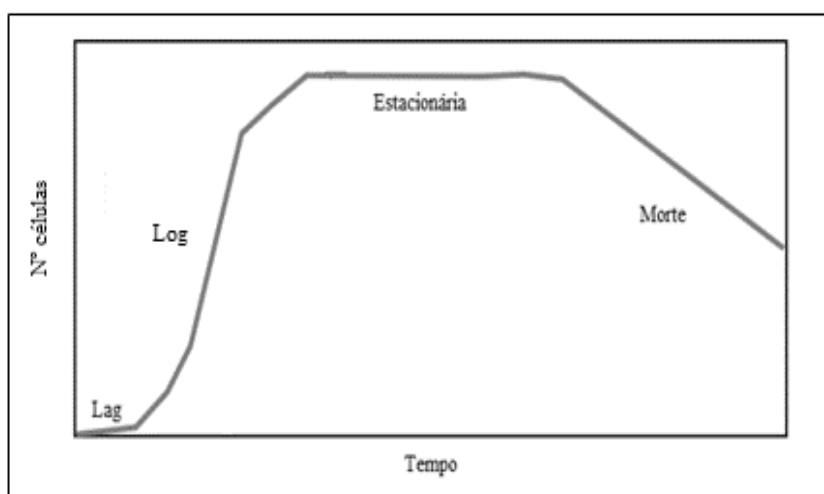
Fonte: adaptado de (SHARMA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2016).

De uma forma geral, as BRS acidofílicas possuem as membranas altamente impermeáveis e de baixa fluidez, para restringir a entrada de prótons para o citoplasma (SHARMA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2016). Quimicamente, estas membranas são mais rígidas e menos sensíveis à hidrólise ácida: possuem ligação éter ao invés de éster, que são comumente encontradas nas membranas bacterianas e eucarióticas. O baixo pH pode danificar biomoléculas na célula, que requerem mecanismos reparadores: isto pode explicar o maior número de genes reparadores de DNA e proteínas presentes no genoma de diversas acidofílicas (FLORENTINO et al., 2016b).

## 2.5. Cinética de crescimento bacteriano

Para melhor compreender uma cultura isolada de microrganismos, cujo meio possui nutrientes e condições bioquimicamente favoráveis, tem-se a cinética de crescimento bacteriano, podendo esta ser expressa em função do tempo, obtendo-se assim, uma curva de crescimento. Para culturas em batelada, existem quatro fases: *lag*, *log* (ou exponencial), estacionária e de declínio (ou morte). Na Figura 8 pode-se observar cada uma destas fases e na Tabela 4 encontra-se cada um de seus embasamentos teóricos.

**Figura 8.** Curva típica de crescimento bacteriano em batelada.



Fonte: adaptado de (MAIER, 2009).

**Tabela 4.** Fases de crescimento bacteriano.

Fase	Crescimento celular	Princípio	Equação
<i>Lag</i>	Muito baixo. Etapa de adaptação fisiológica e transitória.	-	-
<i>Log</i>	Etapa de maior crescimento, sendo proporcional ao nº de células, em qualquer instante desta fase.	$\frac{dX}{dt} = X \cdot \mu$	$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$
Estacionária	Sem aumento líquido celular, embora ainda haja crescimento, é contrabalanceado com o nº de mortes. Normalmente ocorre quando cessa algum nutriente.	$\frac{dX}{dt} = 0$	$X = \text{constante}$
Declínio	Decaimento celular. Apesar de também ser exponencial, é uma taxa um pouco mais lenta.	$\frac{dX}{dt} = -K_d \cdot X$	$X = X_0 \cdot e^{-K_d \cdot t}$

$X$  = nº células;

$X_0$  = nº células iniciais;

$\mu$  = taxa de crescimento;

$K_d$  = constante de decaimento.

Para a fase *lag*, não existe uma regra clara de quando ela termina e começa a exponencial, mas alguns autores (YATES; SMOTZER, 2007) citam ser quando o número de células duplica. Já para a fase estacionária, um exemplo clássico de escassez de nutriente é o metabolismo endógeno: quando a fonte de carbono se esgota, não necessariamente o crescimento cessará, pois pode haver a lise de algumas células mortas, suprimindo a necessidade deste nutriente (MAIER, 2009).

As BRS têm crescimento relativamente lento, quando comparado aos demais microrganismos presentes no solo e na água. Entretanto, possuem crescimento superior ao das bactérias metanogênicas (RODRIGUEZ et al., 2012), pois a sulfato-redução é cinética e termodinamicamente mais favorável que a metanogênese, em se tratando de substratos simples, como acetato e hidrogênio (LIU et al., 2014; SUN et al., 2014).

Em ambientes anaeróbios, a associação entre bactérias fermentadoras e BRS é energeticamente favorável: as fermentadoras podem quebrar substratos grandes em cadeias menores, tornando-as disponíveis para as BRS (DEV; ROY; BHATTACHARYA, 2016; MUYZER; STAMS, 2008; OREN, 2010). Nestes mesmos ambientes, as BRS coexistem com as metanogênicas, pois ambas são ativas em condições estritamente anaeróbias, com similar pH e temperatura de crescimento (GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015; MADIGAN et al., 2016; MATTEI et al., 2014; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). Entretanto, elas podem competir pelos substratos hidrogênio e acetato (KOSCHORRECK, 2008; MUYZER; STAMS, 2008).

## **2.6. Análise de sequenciamento *high-throughput* 16S**

As pesquisas com a tecnologia de sequenciamento *high-throughput* 16S, desenvolvidas ao longo das últimas décadas, têm promovido grandes avanços para a ciência e, especificamente para a microbiologia ambiental, por disponibilizar uma análise abrangente do genoma de diversos microrganismos, que desempenham papéis fundamentais para a manutenção dos ecossistemas (KONOPKA; LINDEMANN; FREDRICKSON, 2015; LEI et al., 2017; VANWONTERGHEM et al., 2014).

Estas novas metodologias de sequenciamento estão revolucionando a microbiologia, pois diversos microrganismos incultiváveis (por meio de cultura), podem agora ser identificados a partir da extração de seu DNA, de uma amostra ambiental, seguida da determinação da sequência de nucleotídeos que compõem seu DNA, garantindo resultados rápidos e de alta resolução (CAPORASO et al., 2011; CHRISTOFF et al., 2017; HUA et al., 2015; KLINDWORTH et al., 2013; MA et al., 2015). Para se ter uma ideia, estima-se que mais de

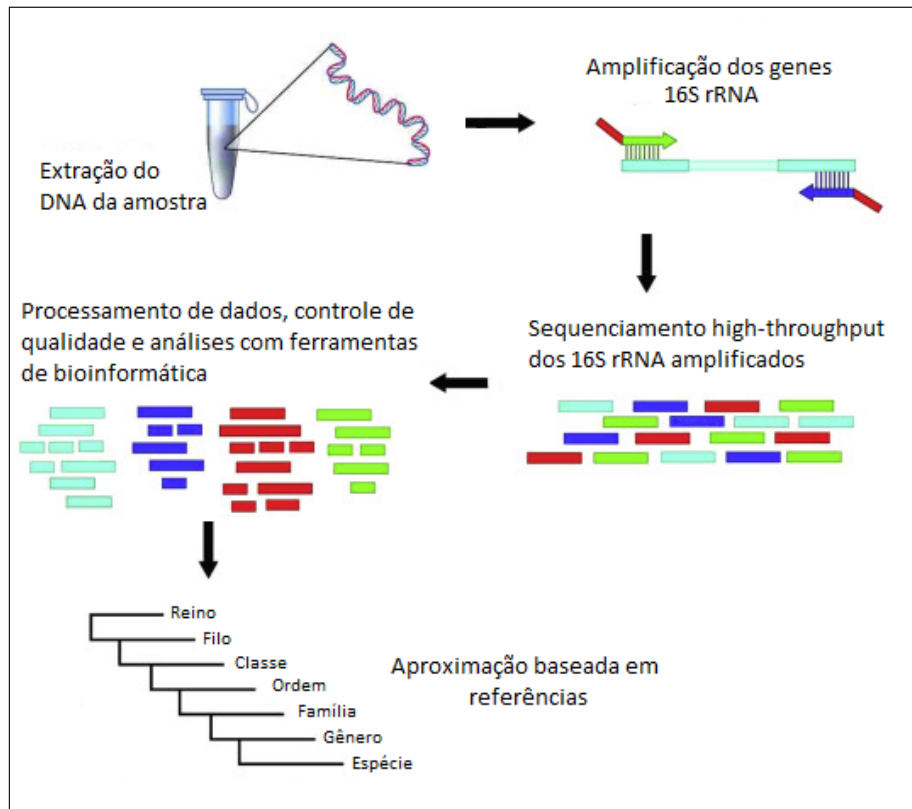
99% dos microrganismos ambientais são incultiváveis nas condições laboratoriais atuais (VOLLMERS; WIEGAND; KASTER, 2017). Desta forma, a análise de sequenciamento *high-throughput* 16S permite portanto, estudar de maneira mais ampla a diversidade estrutural de uma comunidade microbiana (LEI et al., 2017).

Largamente utilizado para identificar bactérias, o gene 16S rRNA (RNA ribossomal) é atualmente o marcador filogenético de maior compreensão disponível, pois apresenta uma boa resolução filogenética bacteriana e uma das maiores bases de dados de sequenciamento de DNA (CHRISTOFF et al., 2017; VANWONTERGHEM et al., 2014). É um excelente marcador filogenético, pois é conservado entre procariotos com regiões variáveis específicas, que podem ser usadas para classificações taxonômicas, permitindo a identificação de membros de diversas comunidades bacterianas (CAPORASO et al., 2011; JO; KENNEDY; KONG, 2016).

Após extraído o DNA, a primeira etapa desta análise, refere-se à amplificação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA (KLINDWORTH et al., 2013) por meio de ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que trata-se de uma técnica de biologia molecular empregada para obtenção de amplificações exponenciais de DNA *in vitro*, utilizando elementos do processo natural de replicação do DNA. Esta etapa de amplificação é necessária, pois a maioria da amostras ambientais, não possui quantidade suficiente de DNA, e por isso precisam ser amplificadas (CHRISTOFF et al., 2017). Por conseguinte, estes fragmentos são agrupados nas bibliotecas de sequenciamento para quantificação e normalização, dentro da plataforma Illumina *MiSeq*. Na sequência, por intermédio de um *software* de bioinformática, é realizado o processamento dos dados das leituras obtidas, para enfim chegar à classificação taxonômica. A Figura 9 representa de forma concisa, a série de procedimentos adotados para o sequenciamento.

O rápido aumento na capacidade de sequenciamento, levou a uma espécie de “corrida armamentista” na qual plataformas de sequenciamento, por gerarem dados em escalas sem precedentes, extrapolam as ferramentas existentes e, por consequência, novos *softwares* são lançados para explorar estas quantidades massivas de dados, de forma a processar e “traduzir” todas estas informações (CAPORASO et al., 2011). Assim, ferramentas computacionais foram utilizadas para conduzir o tratamento das sequências de DNA e posterior comparação com uma base de dados de 16S rRNA conhecida para identificação dos microrganismos.

**Figura 9.** Ilustração esquemática para sequenciamento

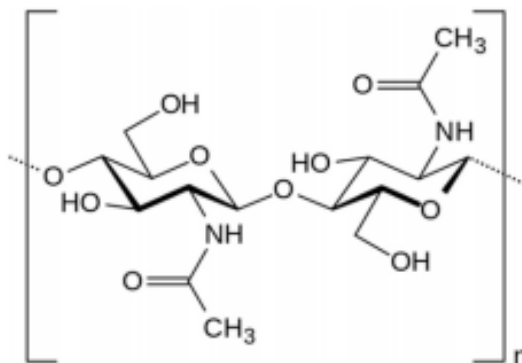


Fonte: adaptado de (JO; KENNEDY; KONG, 2016).

## 2.7. Quitina

A quitina é um polissacarídeo linear nitrogenado, de ocorrência natural, formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (LIU et al., 2013; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a; ZEMPLIČ et al., 2012). Sua estrutura possui de 1.000 a 3.000 unidades monoméricas (KARDAS et al., 2012; SHAHIDI; ABUZAYTOUN, 2005), sendo esta unidade representada pela Figura 10.

**Figura 10.** Estrutura monomérica da quitina.



Fonte: (WIKIPEDIA, 2007).

É o segundo polímero natural mais abundante, depois da celulose, por ser o constituinte do exoesqueleto de artrópodes (insetos e crustáceos), moluscos e alguns fungos (ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos), tendo função biológica estrutural (KARDAS et al., 2012; NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014; ZEMLJIČ et al., 2012). Estima-se que sua produção anual na biosfera seja superior a 10 giga toneladas ( $10^{13}$  kg) (SHAHIDI; ABUZAYTOUN, 2005). É pouco solúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e bases (BARIKANI et al., 2014).

Comercialmente, a quitina é extraída de cascas de camarão, siri e lagosta, entre outros crustáceos (KARDAS et al., 2012). A composição química da casca de camarão tem em média (base seca): 17 a 20% de quitina, 33 a 40% de proteína, e 32 a 38% de minerais (principalmente  $\text{CaCO}_3$ , cuja função é calcificar o exoesqueleto) (RØDDE; EINBU; VÅRUM, 2008). Os conteúdos variam de acordo com a idade e o ciclo reprodutivo dos animais: os espécimes mais antigos possuem exoesqueleto mais calcificado e uma porcentagem relativamente menor de quitina (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2003).

Por possuir grupos hidroxila e acetamido no anel de glicose, os pares de elétrons tornam-se disponíveis para coordenação, comportando-se assim como base de Lewis (SHI; ZHAO; ZHANG, 2007; SOFIANE; SOFIA, 2015). Por isso, a quitina possui capacidade de adsorver íons metálicos em solução aquosa ácida, formando complexos estáveis (BARIKANI et al., 2014; SHAHIDI; ABUZAYTOUN, 2005).

Diversos trabalhos (DAUBERT; BRENNAN, 2007; ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a, 2010, 2011) utilizaram materiais quitinosos oriundos de casca de crustáceos para remediação de DAM, obtendo-se satisfatoriamente a sulfato-redução. Em todos eles, afirmou-se que a quitina é adequada como substrato para a sulfato-redução, por sua degradação criar condições redutoras, que podem promover processos anaeróbios, pois durante a sua fermentação libera hidrogênio, acetato e alguns ácidos graxos, além de apresentar teor de nitrogênio relativamente alto (de 6 a 7% em sua composição estrutural) e proporcionando uma boa relação C:N.

## **2.8. Cinéticas de adsorção**

Metcalf e Eddy (2003) definem adsorção como o processo de acúmulo de substâncias que estão em solução numa superfície disponível, tratando-se de uma operação de transferência de massa, na qual um constituinte da fase líquida (solvato) é transferido à fase sólida (adsorvente), resultante do excesso de energia na superfície do adsorvente (energia livre superficial), que possibilita a interação entre as fases.

No processo de adsorção, a partícula de solvato é aderida à superfície do adsorvente. Já

no processo de absorção, o sorvato passa a fazer parte da estrutura interna do sorvente, sendo esta a diferença fundamental entre elas (MONTANHER; OLIVEIRA; ROLLEMBERG, 2007). Quando não se sabe exatamente qual o mecanismo (adsorção ou absorção), diz-se genericamente sorção (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014).

As ligações entre sorvato e sorvente podem ser físicas ou químicas (ATKINS; JONES, 2004; NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014). Na adsorção física (fisiossorção), há interações de *van der Waals*, que ocorrem por uma diferença de energia e/ou forças de atração de longo alcance (dipolos permanente ou induzido, sem alteração dos orbitais atômicos ou moleculares das espécies). Trata-se de uma adsorção exotérmica e reversível, de intensidade mais fraca, na qual o equilíbrio é estabelecido rapidamente e a adsorção pode ocorrer em multicamadas (ANDIA, 2009; NASCIMENTO et al., 2014).

Na adsorção química (quimiossorção), os íons unem-se por ligações químicas (usualmente covalentes) de intensidade mais forte e tendem a se acomodarem em sítios que propiciem o número máximo de coordenação (ATKINS; JONES, 2004; NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014). Neste processo, há compartilhamento de elétrons e rearranjo dos orbitais moleculares, havendo formação de monocamada. O processo inverso à sorção também pode ocorrer, sendo denominado dessorção.

No intuito de determinar a velocidade de adsorção e os mecanismos nela envolvidos, faz-se uso de estudos cinéticos. Estes estudos são importantes, pois além do mecanismo, descrevem a taxa que controla o tempo de contato na interface líquido-sólido (SAMUEL; SHANTHI; VASHANTHA, 2016). A cinética de adsorção tem alta dependência das propriedades físicas e químicas dos adsorventes, por isso o seu conhecimento é essencial na escolha das melhores condições de operação em larga escala (MONTANHER; OLIVEIRA; ROLLEMBERG, 2007).

Devido às diversas possibilidades de mecanismos envolvidos no processo sortivo, as taxas de transferência de massa são difíceis de prever; desta forma, recorre-se a diversos modelos cinéticos para caracterizar a natureza do processo sortivo (MONTANHER; OLIVEIRA; ROLLEMBERG, 2007). Todas as informações cinéticas permitem avaliar a natureza das etapas determinantes da velocidade, entretanto, uma equação de taxa satisfatória muitas vezes pode não oferecer todas as informações necessárias para elucidar o mecanismo; porém, podem ser de grande valia prática no quesito tempo e quantidade de material consumido (ANDIA, 2009).

### **2.8.1. Modelo de pseudo-primeira ordem**

O modelo cinético de pseudo-primeira ordem possui sua modelagem baseada na adsorção em fase sólida, sendo a taxa de adsorção baseada na capacidade do adsorvente (HO, 2006; NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014), tendo sido proposto inicialmente por Lagergren<sup>2</sup>. É amplamente usado para descrever processos líquido-sólido (WEI et al., 2017), e sua definição parte da Eq. 7:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1 \cdot (q_e - q_t) \quad \text{Eq. 7}$$

Onde  $q_t$  é quantidade de sorvato retida por grama do sorvente no tempo  $t$ ,  $q_e$  é quantidade de sorvato retido por grama do sorvente no equilíbrio e  $k_1$  é a constante de pseudo-primeira ordem. Integrando com as condições de contorno  $t=0$  e  $t=t$  e  $q_t=0$  a  $q_t=q_t$ , tem-se o modelo de pseudo-primeira ordem, mostrado pela Eq. 8:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 \cdot t \quad \text{Eq. 8}$$

Entretanto, este modelo apresenta algumas limitações, como não apresentar linearidade durante todo o tempo de contato e  $q_e$  ser desconhecido (MARTINS, 2004).

### 2.8.2. Modelo de pseudo-segunda ordem

O modelo de pseudo-segunda ordem, proposto por Ho e Mckay (1999), admite que a capacidade de adsorção é proporcional ao número sítios ativos no adsorvente. E também que esta interação envolve troca de elétrons, assumindo-se quimiossorção (HO; MCKAY, 1999; LOBO-RECIO et al., 2013; NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014; WEI et al., 2017). Neste modelo, admite-se que a taxa de adsorção depende da taxa adsorvida elevada ao quadrado, conforme mostrado pela Eq. 9:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 \cdot (q_e - q_t)^2 \quad \text{Eq. 9}$$

De maneira análoga, após a integração, obtém-se a Eq. 10, que sendo rearranjada resulta na Eq. 11.

$$\frac{1}{q_e - q_t} - \frac{t}{q_e} = k_2 \cdot t \quad \text{Eq. 10}$$

---

<sup>2</sup> LAGERGREN, S.Y. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. Kungliga Svenska Vetenskapsakad, Stockholm. v. 24 (4). p. 1–39, 1898.



$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad \text{Eq. 11}$$

O modelo de pseudo-segunda ordem possui a vantagem de  $k_2$  e  $q_e$  podem ser obtidos a partir do intercepto e da inclinação do gráfico de  $(t/q_t)$  versus  $t$ , sendo que não existe a necessidade de se conhecer previamente nenhum parâmetro, como se faz necessário para o modelo de pseudo-primeira ordem (HO, 2006; WU; TSENG; JUANG, 2001).

Embora muitos fatores possam influenciar a capacidade de adsorção, como concentração inicial do adsorvato, pH da solução, o tamanho da partícula adsorvente, entre outros, tal modelo cinético está focado apenas no efeito dos parâmetros observáveis na taxa global e tem sido aplicado com sucesso em diversas adsorções metálicas em soluções aquosas (HO; MCKAY, 1999) e também em muitas cinéticas de adsorção durante todo o período do ensaio (WEI et al., 2017). Em diversos casos, a capacidade de adsorção no equilíbrio é desconhecida, e a quimiossorção tende a tornar-se imensuravelmente lenta e a quantidade adsorvida é infinitamente menor que a adsorvida no equilíbrio (HO, 2006; HO; MCKAY, 1999).

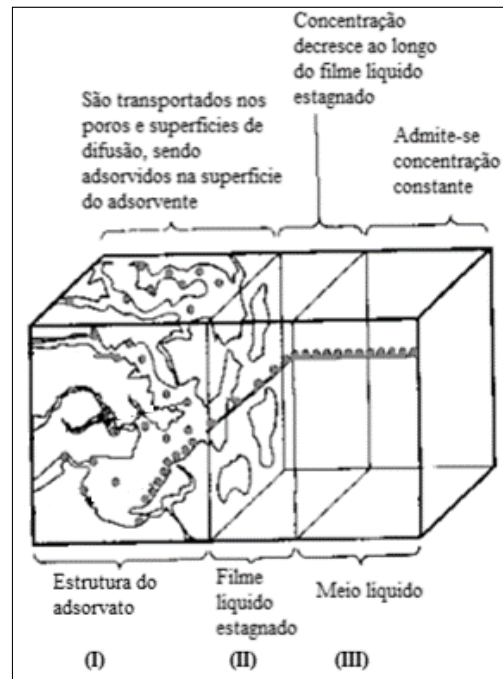
### 2.8.3. Modelo de difusão intrapartícula

O modelo de difusão intrapartícula, foi proposto por Weber e Morris (1963), no qual admite-se que a etapa limitante (lenta) do processo seja a adsorção sobre a superfície interna (intrapartícula), desprezando os processos difusivos do filme sobre o adsorvente (etapas rápidas) (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014; WEBER; MORRIS, 1963; WEI et al., 2017), sendo derivado da lei de Fick de Difusão (ANDIA, 2009). Este mecanismo está esboçado na Figura 11, na qual a estrutura I é a lenta, e as estruturas II e III instantâneas. É definido pela Eq. 12 e diferentemente das cinéticas de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordens, este modelo define o mecanismo do processo.

$$q_t = k_{in} \cdot \sqrt{t} + C_{in} \quad \text{Eq. 12}$$

Onde  $k_{in}$  é a taxa de difusão intrapartícula e  $C_{in}$  é a constante relacionada com a espessura da camada de difusão. Segundo alguns autores (HAMEED; TAN; AHMAD, 2008; WEI et al., 2017), caso a reta do gráfico passe pela origem, a difusão intrapartícula é a única etapa de controle de taxa, em caso negativo, outros mecanismos podem estar envolvidos no processo de adsorção.

**Figura 11.** Esboço do mecanismo difusivo



Fonte: (METCALF; EDDY, 2003).

Outros estudos (ANDIA, 2009; BERTOLINI; FUNGARO, 2011) também indicam que a adsorção pode ocorrer em duas ou mais etapas, podendo desta forma, os gráficos apresentarem multilinearidade, segmentando-o em retas diferentes, sendo cada uma destas etapas controlada por um processo diferente. Uma indicação prática de que há multilinearidade, é o fato de as constantes cinéticas variarem com o tempo ou com a concentração em fase sólida.

#### 2.8.4. Modelo de Elovich

O modelo de Elovich, originalmente apresentado por Zeldowitsch<sup>3</sup>, também é baseado na capacidade de adsorção e assume quimiossorção (HO, 2006). Inicialmente utilizado na descrição de gases em sólidos, este modelo é amplamente utilizado para adsorção lenta, assumindo-se superfície heterogênea (apresentando assim, diferentes energias de ativação) (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014; WEI et al., 2017). Assim como o modelo de pseudo-segunda ordem, o modelo de Elovich também admite quimiossorção, entretanto, este modelo não reflete com a mesma precisão os valores de  $q_e$  obtidos (WEI et al., 2017). A taxa de adsorção diminui com o tempo, devido ao aumento da cobertura superficial (WU; TSENG; JUANG, 2009), conforme

<sup>3</sup> ZELDOWITSCH, J. Über den mechanismus der katalytischen oxydation von CO an MnO<sub>2</sub>. Acta Physicochimica. URSS, v. 1, p. 364–449, 1934.

mostrado pela Eq. 13:

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha e^{-\beta \cdot q_t} \quad \text{Eq. 13}$$

Onde  $\alpha$  é a taxa inicial de adsorção ( $dq_t/dt = \alpha$ , quando  $q_t \approx 0$ ) e  $\beta$  é a constante de Elovich relacionada ao grau de cobertura no processo de quimiossorção (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2018). Após a integração entre 0 e  $q_t$ , obtém-se a Equação de Elovich, mostrada pela Eq. 14.

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln t \quad \text{Eq. 14}$$

## 2.9. Tratamentos químicos para DAM: opções disponíveis, vantagens e desvantagens

Em áreas de mineração abandonadas, que são de localização remota, a solução mais realista para tratamento de DAM seria o tratamento passivo, como é o caso da biorremediação, que é de tratamento duradouro, de baixo custo e ambientalmente sustentável, sem necessidade de fornecimento de energia. Skousen et al. (2017) definem o sistema passivo como tratamento baseado em ocorrências naturais. Entretanto, para alguns casos, onde é necessária a rápida remediação de enormes quantidades de água, o tratamento ativo é tido como alternativo ao tratamento passivo da DAM (MATTEI et al., 2014; SIMATE; NDLOVU, 2014).

Os métodos de tratamentos ativos utilizam agentes neutralizantes para aumentar o pH até atingir os padrões de qualidade, precipitar os metais em solução em forma de lodo insolúvel e em seguida enviar o efluente ao corpo receptor (SEO et al., 2017). Entre alguns métodos ativos, pode-se citar o uso de um agente precipitante de baixo custo para sulfato. No Brasil é bastante utilizado precipitação com cal ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Desta forma, os metais são convertidos a hidróxidos, precipitados e removidos por filtração e/ou sedimentação. Como possuem teor variável de sulfato, o desafio está justamente em encontrar um método eficaz para esta aplicação (FERREIRA; LIMA; LEÃO, 2011). A precipitação com cal pode ser utilizada no tratamento de DAM com alto teor de sulfato e metais, diferente dos métodos de remoção biológica e física (adsorção, troca iônica ou membranas). No entanto, a eficiência de remoção de sulfato por precipitação com cal é limitada à solubilidade do sulfato de cálcio ( $1.500\text{-}2.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), dependendo das condições da solução (TOLONEN et al., 2016).

Contudo, o método de precipitação exige uma grande dose de agentes alcalinizantes para aumentar o pH tipicamente ácido, e então precipitar e remover os metais tóxicos, gerando uma grande quantidade de lodo residual contendo hidróxidos metálicos, gesso e material inerte

(DEMERS et al., 2015). Além disso, este lodo residual não tem valor econômico, devido à dificuldade de reciclagem dos metais usados e também necessitam uma disposição dispendiosa, por ser descartado em aterros que ocupam grandes áreas de terra (NLEYA; SIMATE; NDLOVU, 2016; SEO et al., 2017; VITAL et al., 2018), o que requer projetos especiais para evitar a redissolução e posterior migração destes metais, podendo assim, inviabilizar seu uso (KEFENI et al., 2015; RUBIO; SILVA; COSTA, 2013). Desta forma, existe uma forte necessidade de uma tecnologia que ofereça sustentabilidade à este tratamento.

No que tange a remoção de sulfato da DAM e AIDAM, foi possível sua remoção utilizando-se quitosana, com remoções próximas à 90% da DAM (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2018). Entretanto, seu uso fica restrito a pH's superiores a 5, pois a quitosana, um biopolímero similar à quitina, quando em meio mais ácido, apresenta aspecto gelificado e inviabiliza seu uso.

### **2.9.1. Eletrocoagulação (EC)**

As recentes tendências da tecnologia de tratamento da DAM e AIDAM buscam recuperar metais, de forma que possam ser manipulados para subsidiar os custos de tratamento, redução de lodo, bem como seus custos associados à manipulação (RYAN; KNEY; CARLEY, 2017). Estudos recentes (MAMELKINA et al., 2017, 2019; NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017; NARIYAN; WOLKERSDORFER; SILLANPÄÄ, 2018) aplicaram eletrocoagulação (EC) para o tratamento deste tipo de efluente.

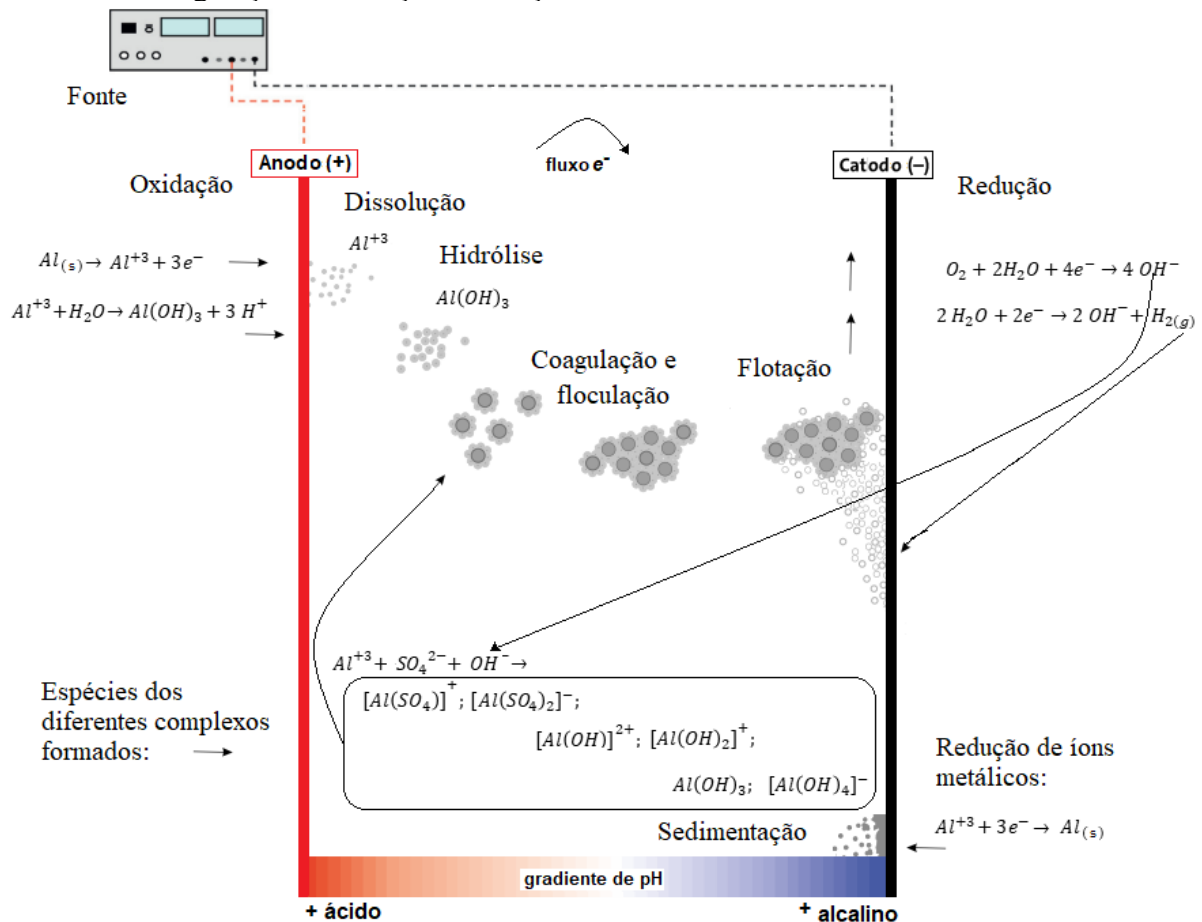
EC é uma tecnologia baseada na aplicação de corrente elétrica, para desestabilizar contaminantes em suspensão, emulsionados ou dissolvidos em uma solução, através de uma célula eletrolítica composta por um anodo e um catodo (MAMELKINA et al., 2019). No processo de EC, considerado um método eficiente e ambientalmente favorável (WU et al., 2019), diversos anodos podem ser usados, mas destaca-se o de Al e de Fe, por gerarem íons multivalentes, favorecendo assim o processo (AN et al., 2017). Não coincidentemente, estes são os eletrodos mais usados, sendo o de Al em meios ácidos ( $\text{pH} < 6$ ) e o de Fe em meios neutros e alcalinos (BENER et al., 2019).

Esta tecnologia destaca-se por promover boas eficiências de remoção de sulfato em pH muito baixos (que é típico de DAM). Tal eficácia é devida ao fato de que em meios ácidos as diversas espécies catiônicas presentes podem interagir eletrostaticamente com os ânions, formando precipitados, enquanto que em pH's neutros e alcalinos o mecanismo é diferente: as espécies coagulantes primárias são precipitados como hidróxidos metálicos amorfos, que conforme sua carga superficial, podem adsorver os íons em suas superfícies, com uma elevada

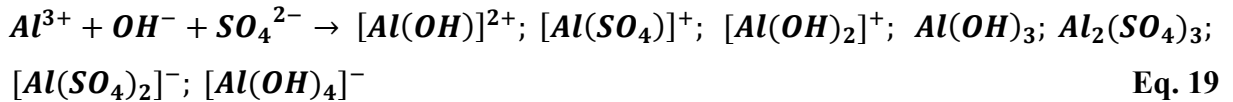
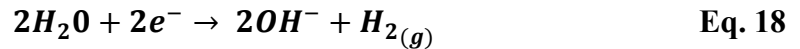
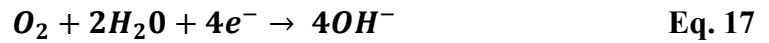
gama de possibilidades para fixação dos íons sulfato (MAMELKINA et al., 2017). Os ânions sulfato que são atraídos para estas superfícies carregadas, formam hidroxissulfatos metálicos, que são grandes estruturas que varrem os íons ao longo da solução (SINGH; RAMESH, 2014). Ademais, a eletrocoagulação eleva o pH ácido do meio e seu lodo gerado é muito mais compacto, quando comparado à precipitação convencional (NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017).

Na eletrocoagulação (Figura 12), a oxidação e redução ocorrem simultaneamente: na superfície do anodo ocorre a oxidação, causando a dissolução dos íons e hidrólise do  $Al^0$  liberando  $Al^{3+}$  no meio (Eq. 15 e 16). Estes cátions por sua vez, ligam-se com os hidróxidos ( $OH^-$ ) produzidos a partir da redução que ocorre na superfície do catodo (Eq. 17 e 18), que juntamente com os ânions  $SO_4^{2-}$  presentes na solução, geram complexos sulfatados de alumínio, que formam partículas coloidais (Eq. 19), cuja especiação varia conforme o pH do meio (VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2020).

**Figura 12.** Esquema de EC: as diversas espécies instáveis formadas começam agregando-se, iniciando a coagulação, floculação e flotação.

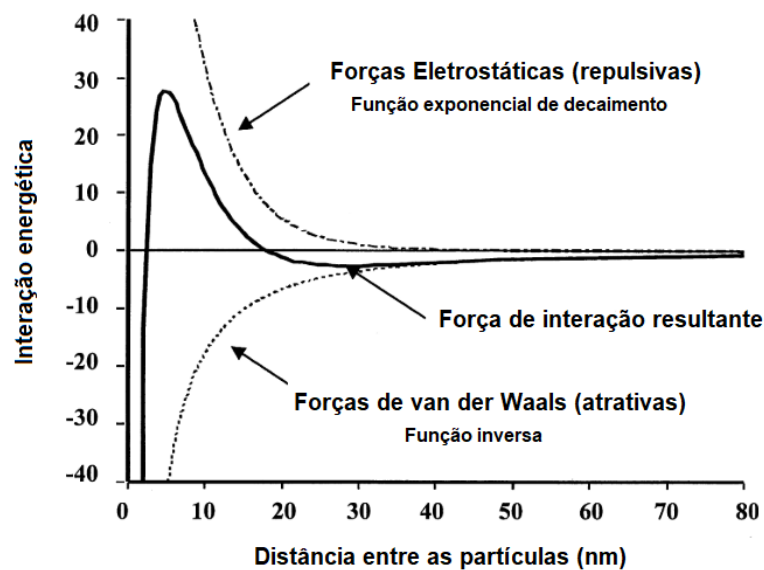


Fonte: Adaptado de (NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017; SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007; VEPSÄLÄINEN, 2012).



Os coloides são estáveis em água devido às interações resultantes das forças repulsivas eletrostáticas e atrativas de *van der Waals* entre as partículas (SHAMAEI et al., 2018; VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2020). Quanto mais forças repulsivas entre as partículas, maior será a dispersão entre elas, e conseqüentemente, maior a estabilidade (ADAI; SUVACI; SINDEL, 2001), sendo esta força repulsiva causada pela sobreposição das camadas de elétrons (VEPSÄLÄINEN, 2012). No processo de coagulação, estas partículas coloidais são desestabilizadas pela diminuição desta energia repulsiva ocasionada pelo coagulante, sendo mais facilmente aglomeradas. E a floculação ocorre quando estas partículas aglomeradas ligam-se umas às outras através de uma ligação fraca (*van der Waals*), sendo esta força inversamente proporcional à distância entre as partículas, conforme descrito pela teoria DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek, Figura 13) (SHAMAEI et al., 2018).

**Figura 13.** Interações de repulsão e atração entre as partículas ao longo da distância entre as mesmas, segundo a teoria DLVO.



Fonte: Adaptado de (ADAI; SUVACI; SINDEL, 2001).

Uma vez formados, estes flocos podem ser flotados (aderidos às bolhas) pelo H<sub>2</sub> produzido no cátodo (VEPSÄLÄINEN et al., 2011; VEPSÄLÄINEN; PULLIAINEN; SILLANPÄÄ, 2012). Estes mesmos flocos também poder ser removidos por sedimentação (no caso destas partículas serem de maior densidade). A taxa de reações eletroquímicas é proporcional à densidade de corrente, mas em pH alcalino, esta taxa é inferior à calculada pela lei de *Faraday* (Eq. 20), indicando assim, que diversas outras reações podem ocorrer no ânodo (VEPSÄLÄINEN, 2012).

$$m = \frac{I_a \cdot t \cdot M_w}{z \cdot F} \quad \text{Eq. 20}$$

Onde  $m$  é a quantidade de metal dissolvido do eletrodo (g),  $I_a$  é a densidade de corrente aplicada ( $A \cdot m^{-2}$ ),  $t$  é o tempo (s),  $M_w$  é a massa molecular do eletrodo ( $Al = 26,98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $z$  é nº de oxidação (elétrons transferidos,  $Al = 3$ ), e  $F$  é a constante de *Faraday* ( $96.485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) (NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017).

## 2.10. Uso secundário da água e legislações ambientais aplicáveis

Segundo o Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH, 2014), o Brasil tem como um de seus maiores desafios a implementação de saneamento básico a toda sua população. Diante da grande demanda que isto representa, torna-se importante adotar estratégias alternativas que possam contribuir para a redução dos custos. Sugere-se, entre outras medidas, o investimento no reuso de águas, pois é considerado uma opção inteligente de preservar os mananciais da região, pois reduz a demanda sobre água de qualidade para abastecimento populacional (NÚÑEZ-GÓMEZ, 2014; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016; TELLES; COSTA, 2007).

No presente trabalho, os padrões adotados para o reuso da água foram utilizados como norte para o uso secundário não-potável da água. As águas de reuso podem ser utilizadas para fins menos nobres do que a potabilidade, como: irrigação, usos industriais, refrigeração de motores, usos urbanos, como rega de jardins, lavagem de calçadas, pátios, ruas, sistemas decorativos, descargas sanitárias, entre outros.

Mesmo para fins menos nobres, esta água de reuso deve atender a critérios e diretrizes estabelecidas para a prática de reuso direto não-potável. Pode-se citar as Resoluções CONAMA 357/2005 e 430/2011 como referências nacionais e *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 1985) como referência internacional. A Resolução CONAMA 357, que classifica corpos hídricos, atribui para rios de classe 3 usos como irrigação, pesca amadora,

recreação de contato secundário, entre outros (BRASIL, 2005). A FAO recomenda e orienta quanto a valores máximos para águas de irrigação, assegurando padrões mínimos de segurança, principalmente em locais áridos, ou com pouca oferta da água potável. O Manual de conservação e reuso da água na indústria (HESPANHOL et al., 2006) também pode ser citado, apresentando bons exemplos de gestão de recursos hídricos e de consumo de água, entretanto possui mais enfoque para a indústria. Na Tabela 5 são apresentadas, de forma compilada, estas legislações, normativas ou mesmo guias, no sentido de orientar a viabilidade de se realizar uso secundário não-potável dos efluentes tratados.

**Tabela 5.** Normas ambientais vigentes.

<b>Norma</b>	<b>Definição</b>
Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005)	Dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, também estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, entre outras providências.
Resolução CONAMA 430 de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011)	Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.
Water Quality for Agriculture (FAO, 1985)	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, referência para países em desenvolvimento, para assegurar boas práticas agrícolas e segurança alimentar. Recomenda valores máximos para águas de irrigação.
Resolução CNRH 54 (2005)	Estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reuso direto não potável de água, e dá outras providências.
Manual de conservação e reúso da água na indústria (HESPANHOL et al., 2006)	Orienta quanto à prática do reuso em sistemas industriais, desenvolvimento e a implantação de planos de conservação e reuso de água.

Além dos critérios e padrões previstos nas normas, deve-se também avaliar a segurança deste uso (como por exemplo, na irrigação). Tal estimativa pode ser realizada através de ensaios toxicológicos, por meio dos quais é possível identificar os riscos associados à exposição, desde curto até longo prazo. Esta questão será discutida no tópico a seguir.

### **2.11. Ensaio toxicológicos**

Os ensaios toxicológicos são um conjunto de investigações destinadas a avaliar a toxicidade de poluentes, seu grau e natureza, sobre determinados seres vivos. São ferramentas



de extrema importância para avaliar a qualidade das águas e os efeitos nocivos causados pela exposição de organismos vivos a elas, garantindo níveis seguros de exposição (LEE et al., 2018). Nestes ensaios, é possível identificar os riscos associados a tal exposição, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas, não são capazes avaliar mudanças metabólicas e morfológicas causadas pela exposição. Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem estas análises físico-químicas tradicionais, apenas complementam-nas (COSTA et al., 2008). A escolha do organismo-teste, deve incluir, entre outros fatores, facilidade de reprodução e cultivo, baixo custo, boa disponibilidade, facilidade de manipulação, bem como um razoável base de dados na literatura para comparações (LEE et al., 2018).

As plantas são organismos que desempenham um papel muito importante como fonte de alimentos dentro de ecossistemas aquáticos, participam dos ciclos biogeoquímicos produzindo oxigênio, removendo excesso de nutrientes e também na ciclagem de íons metálicos (STEGEMEIER et al., 2017). Aliado ao fato que organismos de níveis tróficos mais baixos, além de bioacumular poluentes, podem bioamplificar para os próximos níveis tróficos os efeitos tóxicos aos organismos (LALAU et al., 2015; MARTINS, 2014).

*Landoltia punctata* é uma macrófita lemnácea, membro de um grupo de pequenas plantas aquáticas flutuantes (STEGEMEIER et al., 2017), que tem sido usada com sucesso nos ensaios toxicológicos nos últimos anos, principalmente em tratamento de efluentes (LALAU et al., 2015, 2020; PEREIRA et al., 2018; PERREAULT et al., 2010; PERREAULT; SAMADANI; DEWEZ, 2013).

A partir dos ensaios toxicológicos com *Landoltia punctata*, as respostas obtidas em diferentes diluições nas taxas de crescimento ( $r$ ), e conseqüentemente de inibição ( $I$ ), são precedidas por alterações nas estruturas bioquímica e fisiológica, em níveis tecidual e celular, que podem causar danos no metabolismo fotossintético, e conseqüentemente inibir o seu desenvolvimento (LALAU et al., 2020).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Reuso de Águas (LaRA), no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC. Os tópicos seguintes descrevem em maiores detalhes os procedimentos e metodologias adotados para determinação dos objetivos pertinentes a este estudo. Na Figura 14 têm-se ilustrado de forma esquemática as etapas desenvolvidas neste estudo de doutorado, juntamente aos quatro artigos<sup>4</sup> resultantes desta pesquisa, que foram denominados da seguinte forma:

- ❖ **Artigo 1** - Chitin as a substrate for the biostimulation of sulfate-reducing bacteria in the treatment of mine-impacted water (MIW)
  
- ❖ **Artigo 2** - Biostimulation of sulfate-reducing bacteria and metallic ions removal from coal mine-impacted water (MIW) using shrimp shell as treatment agent
  
- ❖ **Artigo 3** - Sulfate removal from mine-impacted water by electrocoagulation: statistical study, factorial design, and kinetics
  
- ❖ **Artigo 4** - Estudo de toxicologia aguda com *Landoltia punctata* como organismo-teste de água de rio impactada com drenagem ácida de mineração (AIDAM) após tratamentos paralelos via bioestimulação de BRS e eletrocoagulação

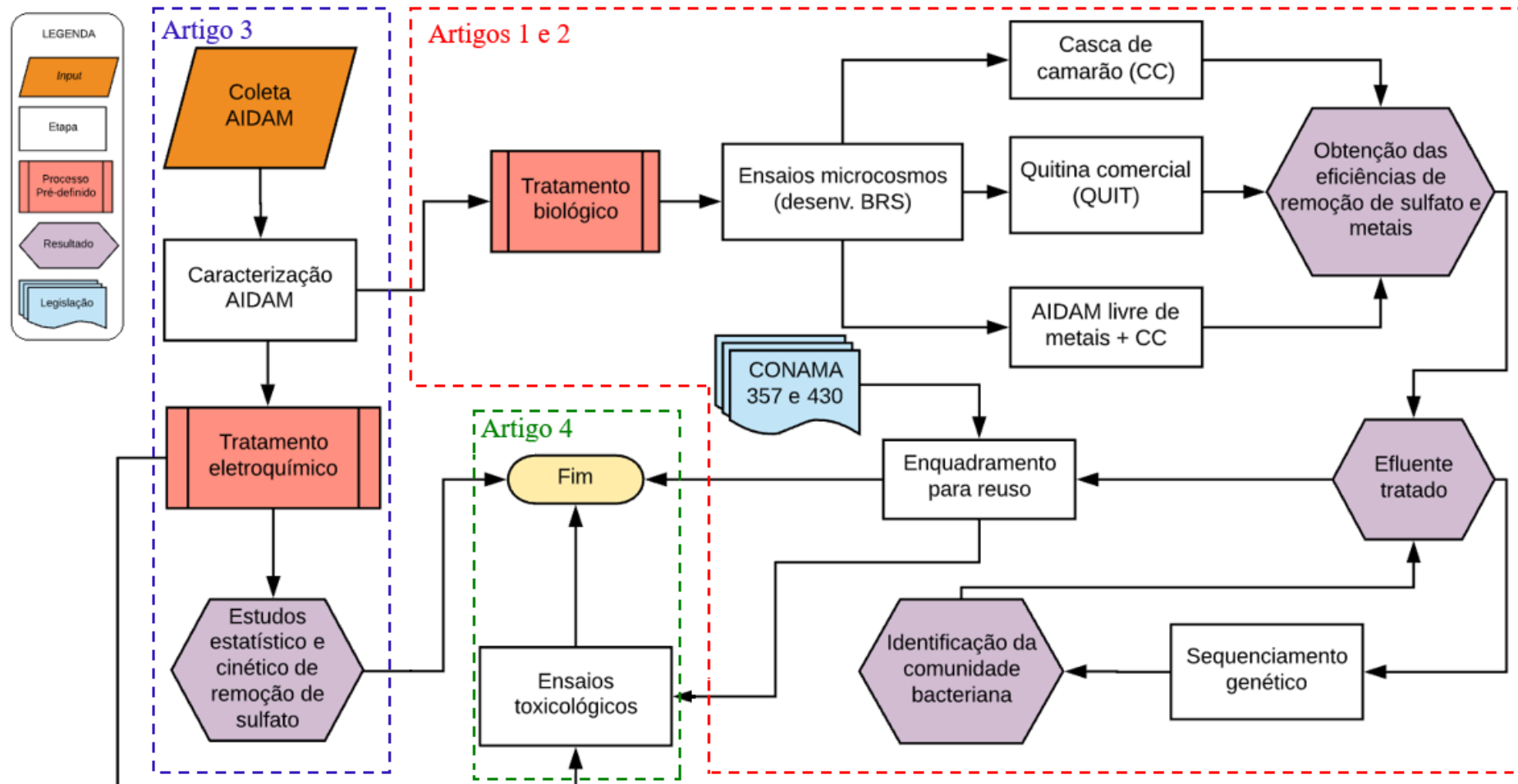
---

<sup>4</sup> Os artigos 1 e 2 foram publicados no *Journal of Hazardous Materials* (ISSN 0304-3894), periódico científico de alta relevância, listado em 3º colocado no *ranking* CiteScore (2019) da categoria Engenharia Ambiental, entre outras categorias (<https://www.scopus.com/sourceid/25858#tabs=1>), e 11º no *ranking* de fator de impacto na área de Ciências Ambientais (<https://www.scijournal.org/impact-factor-of-j-hazard-mater.shtml>). Fator de impacto 2019: 9,038.

O artigo 3 será publicado no periódico *Environmental Science and Pollution Research* (ISSN 0944-1344 e 1614-7499), elencado em 26º no *ranking* CiteScore (2019) da categoria Poluição, (<https://www.scopus.com/sourceid/23918?origin=sourceInfo&zone=refpointrank#tabs=1>), e 69º no *ranking* de fator de impacto na área de Ciências Ambientais (<https://www.scijournal.org/impact-factor-of-enviro-sci-pollut-r.shtml>). Fator de impacto 2019: 3,056.

O artigo 4 está em fase de confecção, para submissão futura.

**Figura 14.** Fluxograma metodológico geral do estudo de tratamento de AIDAM.



### 3.1. Área de estudo e pontos amostrais

As amostras para realização dos ensaios foram coletadas de dois locais diferentes, dentro da Bacia Hidrográfica do Rio Araranguá (Região Hidrográfica 10: “Extremo Sul Catarinense”): as amostras de AIDAM foram coletadas no Rio Sangão e os sedimentos bênticos em uma boca de mina de carvão desativada, localizada no município de Urussanga-SC.

No rio Sangão, que é um curso hídrico superficial impactado com os efluentes ácidos da mineração, dentre outros efluentes industriais e urbanos (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016), foi realizada a coleta em local de fácil acesso, no bairro de São Roque, em Forquilha-SC ( $28^{\circ}45'38,7''\text{S}/49^{\circ}25'58,1''\text{W}$ ), conforme mostrados na Figura 15. As amostras foram coletadas em garrafas não-estéreis de polipropileno, sem *headspace* (APHA, 2012; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017).

**Figura 15.** Coleta de AIDAM no Rio Sangão



Fonte: a autora.

O local de coleta dos sedimentos bênticos consiste numa boca de mina desativada, tendo como geologia de entorno uma região que sofreu extração de carvão a céu aberto ( $28^{\circ}29'19,7''\text{S}/49^{\circ}22'58,1''\text{W}$ ). Trata-se de um manancial subterrâneo impactado pela grande quantidade de pirita exposta na área, devido à inversão do perfil edáfico (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016). Reporta-se na literatura que tal ambiente é uma fonte promissora de BRS do tipo acidofílica, além de algumas bactérias fermentativas e resistentes à presença de metais pesados (FLORENTINO et al., 2015). As alíquotas de sedimento foram transportadas em tubos *falcon*, estéreis, mantidos a 4 °C (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a).

### 3.2. Caracterização da AIDAM

Na Tabela 6 são apresentadas de forma compilada as metodologias empregadas na caracterização dos parâmetros de interesse da AIDAM, sendo metodologias baseadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2017). As análises fotocolorimétricas ( $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Mn}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{S}^{2-}$ ) foram feitas com kit's da HACH®.

**Tabela 6.** Metodologias para caracterização dos compostos de interesse da AIDAM.

Parâmetro	Metodologia	Faixa de leitura	Equipamento
$\text{Fe}_t$	Ferover <sup>1</sup>	0,02-3,00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Espectrofotômetro HACH DR 5000
$\text{Mn}_t$	Oxidação por periodato <sup>2</sup>	0,1-20,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
$\text{Al}^{3+}$	Aluminum <sup>3</sup>	0,008-0,800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
$\text{SO}_4^{2-}$	Sulfaver <sup>4</sup>	2-70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
$\text{S}^{2-}$	Azul de metileno <sup>5</sup>	5–800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
DQO	Colorimétrico de refluxo fechado c/ digestão <sup>6</sup>	3-150 $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$	
COT <sup>7</sup>	Carbono org. não-purgável	-	Shimadzu TOC-LCSH
pH	Leitura em pHmetro	1-14	pHmetro Thermo Scientific Orion
OD <sup>8</sup>	Leitura em oxímetro	-	Sonda ótica YSI ProODO
$\text{CH}_4$	Balanço do fluxo c/ pressão estática e diferencial	0–200 ppmv	GEM 5000 <i>gas analyzer</i> Landtec

<sup>1</sup> Converte  $\text{Fe}_{\text{total}}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  solúvel, que reage com 1,10-fenantrolina, formando cor alaranjada, proporcional à  $[\text{Fe}]$ , com leitura em 510 nm.

<sup>2</sup>  $\text{Mn}_{\text{total}}$  reage com  $\text{IO}_4^-$ , sendo oxidado à  $\text{MnO}_4^-$ , cuja cor roxa gerada é proporcional à  $[\text{Mn}]$ , com leitura em 525 nm.

<sup>3</sup> Indicador reage com Al, formando uma cor laranja-avermelhada, proporcional à  $[\text{Al}]$ , com leitura em 522 nm.

<sup>4</sup>  $\text{SO}_4^{2-}$  reage e precipita como  $\text{BaSO}_4$ . A turbidez formada é proporcional à  $[\text{SO}_4^{2-}]$ , com leitura em 450 nm.

<sup>5</sup>  $\text{H}_2\text{S}$  reage com sulfato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina, formando azul de metileno, cuja cor azul é proporcional à  $[\text{S}^{2-}]$ , com leitura em 665 nm.

<sup>6</sup> Matéria orgânica é aquecida e oxidada com excesso de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , que reduz-se à  $\text{Cr}^{3+}$ . O remanescente de  $\text{Cr}^{6+}$  é determinado, com leitura em 420 nm.

<sup>7</sup> COT = Carbono orgânico solúvel total.

<sup>8</sup> OD = oxigênio dissolvido.

### 3.3. Obtenção e processamento da casca de camarão e da quitina comercial

A casca de camarão (CC) foi adquirida de peixarias locais, sendo esta escolhida por ser fonte de quitina e possuir  $\text{CaCO}_3$  (agente neutralizante de acidez) em sua composição. A CC

foi imediatamente refrigerada até seu processamento, apenas físico, que deu-se conforme o procedimento proposto por Núñez-Gómez (2016, 2017a, 2018, 2019), que consiste em lavá-la com água corrente e secá-la em estufa por 72 horas (48 horas à 100 °C e 24 horas à 50 °C), para eliminar umidade, restos de matéria orgânica e outros materiais grosseiros da CC. Posteriormente, a CC foi pulverizada em liquidificador e peneirada, de modo a homogeneizar e promover elevada superfície de contato. Até o momento do uso, a CC foi mantida em dessecador, para evitar absorver umidade da atmosfera e consequentemente haver um comprometimento na qualidade da mesma.

A quitina comercial, por consistir em flocos secos de quitina com pureza de 70%, segundo informações da fabricante (Polymar Ciência e Nutrição S/A), foi pulverizada, peneirada, e mantida em dessecador até o uso.

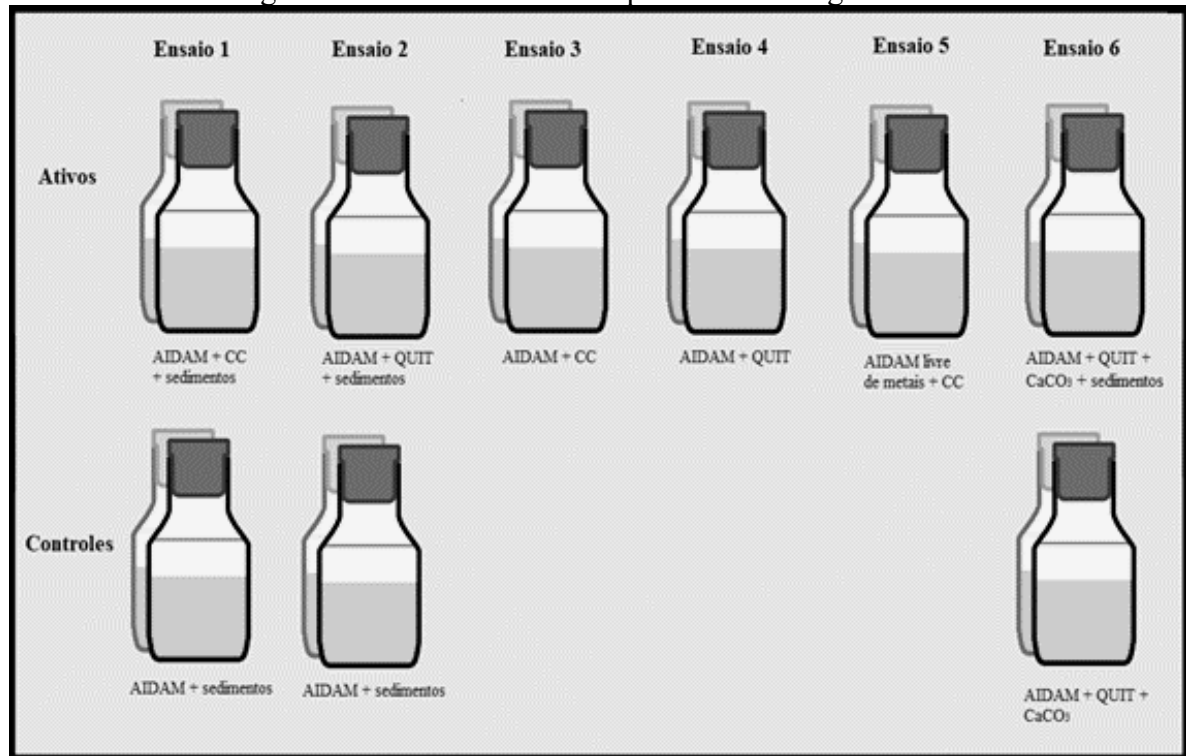
### **3.4. Montagem dos microcosmos**

A montagem trata-se de uma adaptação baseada na metodologia de Robinson-Lora e Brennan (2009a), que construíram instrumentos para cultivo de BRS, chamando-os de microcosmos, para remoção de metais e sulfato de AIDAM, usando casca de crustáceos como substrato para desenvolvimento de tais bactérias.

As amostras de AIDAM foram purgadas com gás N<sub>2</sub> e monitoradas com o oxímetro, de modo a garantir um mínimo de anoxia ( $OD \leq 0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os frascos de vidro também foram purgados com N<sub>2</sub> antes, durante e após a inserção da AIDAM, que foi feita com auxílio de uma bomba peristáltica (para evitar uma reoxigenação e aumentar OD), e demais reagentes, permanecendo devidamente selados durante os experimentos. Os frascos foram dispostos em local protegido da incidência de luz (para evitar uma possível ocorrência de fotossíntese), mantidos em sala climatizada à temperatura de 20 °C, controlada por termômetro de parede.

Nos Ensaios 1 e 2, nos quais houve uso de sedimentos, existem os microcosmos ativos e controles, sendo estes diferenciados pela presença ou não da fonte carbônica (nos controles não há adição de CC ou QUIT, não fomentando assim, o desenvolvimento das BRS). Já nos Ensaios 3 e 4, não houve adição de sedimento, apenas AIDAM e a fonte carbônica (CC ou QUIT), e no Ensaio 5, a AIDAM foi previamente submetida a um processo de remoção de metais, em seguida tratada com CC. No Ensaio 6 utilizou-se como fonte carbônica a QUIT juntamente com CaCO<sub>3</sub>. A Figura 16 ilustra o conteúdo de cada um dos seis diferentes ensaios de bioestimulação nos microcosmos realizados.

**Figura 16.** Diferentes ensaios de bioestimulação de BRS com microcosmos: os ensaios 1 e 2 são referentes ao artigo 1 e os ensaios 3 ao 6 compreendem o artigo 2.



Fonte: a autora.

Os volumes em cada frasco consistiram em: 260 mL de AIDAM, 2,6 g de fonte carbônica (CC ou QUIT), proporcionando uma relação CC/AIDAM (ou QUIT/AIDAM) de  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e (especificamente para os Ensaios 1, 2 e 6) 8,15 g de sedimento úmido (equivalendo esta alíquota a 0,23 g de sedimento seco). Durante o período de incubação, os microcosmos foram agitados manualmente uma vez ao dia e, em dias pré-estipulados, os frascos foram abertos e seu conteúdo filtrado e analisado. Estes dias (1, 2, 7, 9, 11, 16, 20, 24, 30 e 41 dias) foram estipulados com base na cinética de desenvolvimento das BRS (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a). Em cada um destes dias, as análises foram realizadas em duplicata, de modo a minimizar os erros experimentais e superar as discrepâncias que um sistema biológico pode apresentar. Trata-se de um método do tipo “sacrifício” no qual os frascos analisados são abertos e as amostras analisadas, e tais frascos não retornam ao experimento.

Para o Ensaio 1, foram também realizadas esporadicamente análises qualitativas dos gases formados dentro dos microcosmos, de modo a aferir a formação de metano nos mesmos. Esta caracterização dos gases foi feita por meio do aparelho medidor de gases GEM 5000 *gas analyser*, da marca *Landtec*.

Para os ensaios nos quais houve sucesso na sulfato-redução (ensaios 1, 3 e 5), foram congeladas amostras do início e fim da fase *log*, para posteriores análise de comunidade

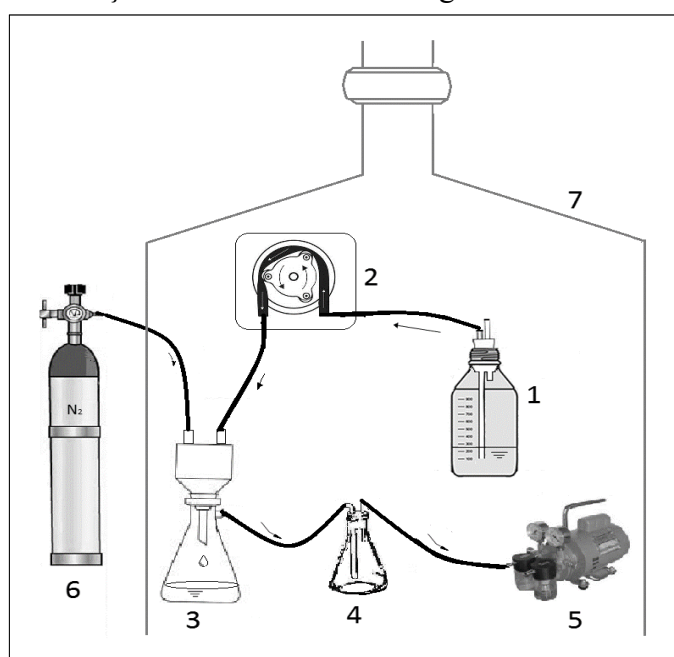


microbiana, que será elucidada adiante no tópico 3.5.

### 3.4.1. Sistema de filtração dos microcosmos

Para a realização das análises físico-químicas nos dias de abertura dos microcosmos, foi montado um sistema de filtração em atmosfera de  $N_2$ , no intuito de preservar os compostos a serem analisados, para evitar possível oxidação. Para este sistema, foi montada uma linha de  $N_2$  que foi conectada ao sistema de filtração a vácuo, composto por *kitasato* com membrana filtrante de acetato de celulose de  $0,45\mu m$  de diâmetro de porosidade, bomba à vácuo e bomba peristáltica. As amostras foram bombeadas dos microcosmos e transferidas diretamente ao sistema de filtração. Todo o procedimento foi realizado dentro de uma capela, para evitar a inalação de possíveis gases tóxicos, liberados pela amostra, conforme ilustrado pela Figura 17.

**Figura 17.** Sistema de filtração em atmosfera de nitrogênio.



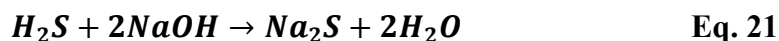
1-Microcosmo. 2-Bomba peristáltica. 3-Kitasato. 4-Armadilha de vácuo. 5-Bomba à vácuo.  
6-Cilindro  $N_2$ . 7-Capela de exaustão.

Fonte: a autora.

### 3.4.2. Eliminação do sulfeto de hidrogênio nos microcosmos

Simultaneamente à remoção de sulfato da AIDAM pelas BRS, ocorre a formação de sulfeto de hidrogênio. Em comparação com o sulfato, o sulfeto de hidrogênio possui toxicidade muito mais elevada (YANG et al., 2015), sendo também afetada pelo pH: quanto mais ácido o meio, mais tóxico o sulfeto de hidrogênio é (DAMIANOVIC; FORESTI, 2007). Foi removido

o sulfeto de hidrogênio através da purga dos microcosmos com N<sub>2</sub> (gás inerte), para arrastá-lo e fazê-lo entrar em contato com uma solução de NaOH, de maneira a gerar sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) solúvel, conforme mostrado na Eq. 21.



### 3.5. Análise da comunidade microbiana

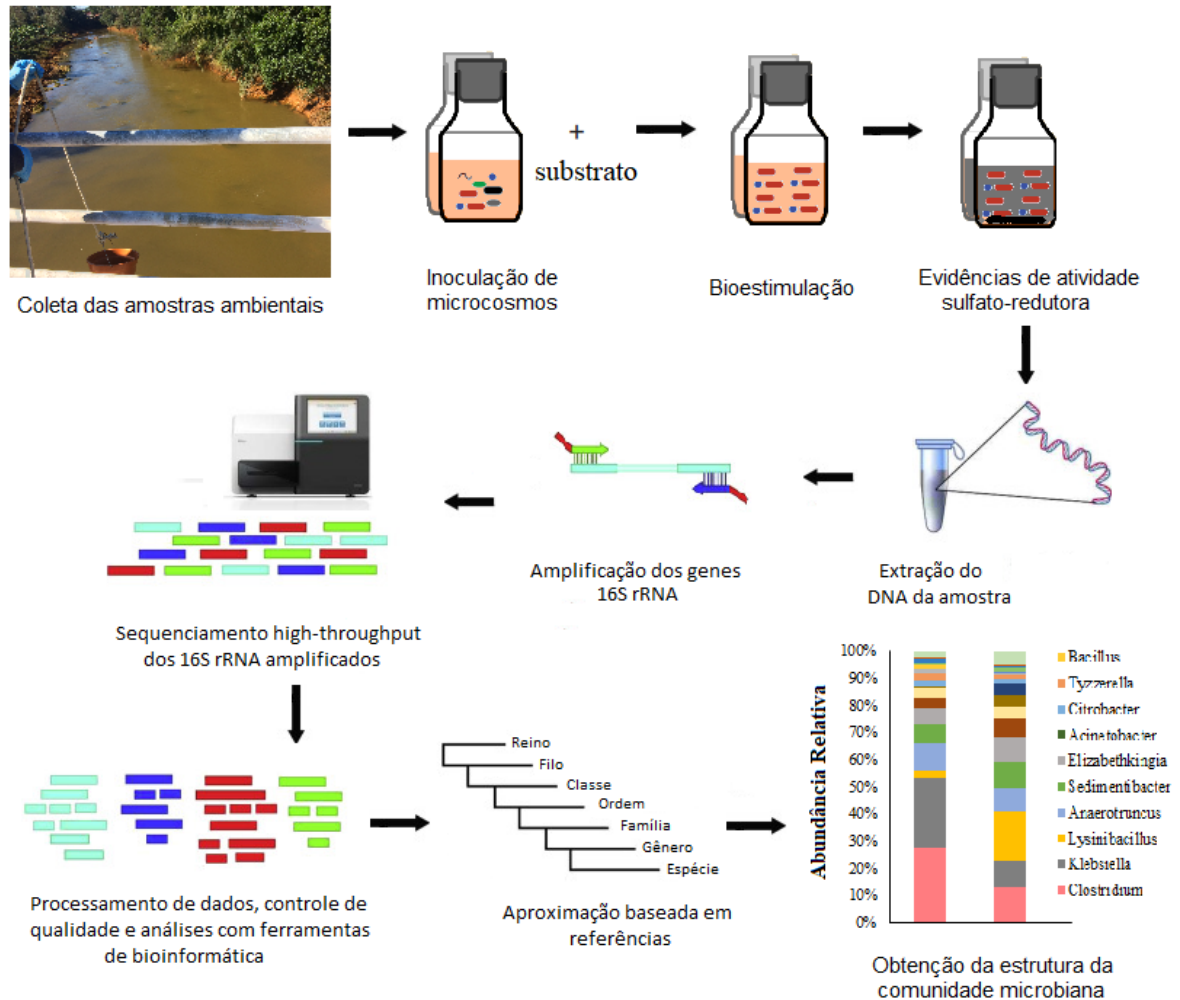
Com o intuito de obter informações mais detalhadas a respeito do perfil das comunidades microbianas, que podem estar atuando nos processos de sulfato-redução e discernir sobre os microrganismos-chave envolvidos (ex. BRS), foi realizada análise de sequenciamento *high-throughput* do gene 16S ribossomal (rRNA). Amostras do conjunto lodo e AIDAM, foram coletadas no início e fim da fase *log* (de maior atividade metabólica) dos microcosmos, sendo armazenadas a -20 °C até o momento das análises. As amostras brutas foram enviadas para a empresa Neoprospecta Microbiome Technologies, Inc. (Florianópolis, Brasil), para extração do DNA (Kit PowerSoil DNeasy) e subsequente metodologia molecular, para o sequenciamento do gene 16S rRNA (RNA ribossomal). O procedimento foi conduzido num sequenciador *Illumina Genome Analyser-Miseq*, que promove o sequenciamento do DNA, numa plataforma capaz de gerar informações sobre milhões de bases, numa única análise. Os resultados da diversidade filogenética foram expressos em forma de abundância relativa dos diferentes níveis taxonômicos dos microrganismos presentes nas amostras (CHRISTOFF et al., 2017; LEI et al., 2017; OKABE, 2007) (Figura 18).

Para amplificar os genes 16S, foram feitas reações de PCR (reações em cadeia de polimerase) em triplicata usando *Platinum Taq* (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante (CHRISTOFF et al., 2017): 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma extensão final de 72 °C por 2 minutos para o primeiro PCR. No segundo, as condições foram: 95 °C por 5 minutos, 10 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 66 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma extensão final de 72 °C por 2 minutos. A reação final de PCR foi limpa usando AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) e as amostras foram reunidas nas bibliotecas de sequenciamento para quantificação.

Todas as leituras 16S rRNA foram analisadas usando fragmentos da região V3-V4 do DNA extraído. Tal região foi selecionada porque é de alta cobertura taxonômica em bactérias e arqueas (CHRISTOFF et al., 2017) e por ser a mais variável, possibilitando a análise das variações da sequência e sua correlação com os diferentes gêneros e espécies. Foram utilizados os *primers* 341F 5' CCTACGGGRSGCAGCAG-3' (WANG; QIAN, 2009) e 806R 5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (CAPORASO et al., 2011), por possuírem alta cobertura

taxonômica em bactérias e arqueas (TAKAHASHI et al., 2014). Finalmente, os produtos purificados foram sequenciados e conduzidos à análise de sequenciamento microbiano.

**Figura 18.** Esquema de como foram realizadas as análises de sequenciamento *high-throughput* a partir dos ensaios com microcosmos.

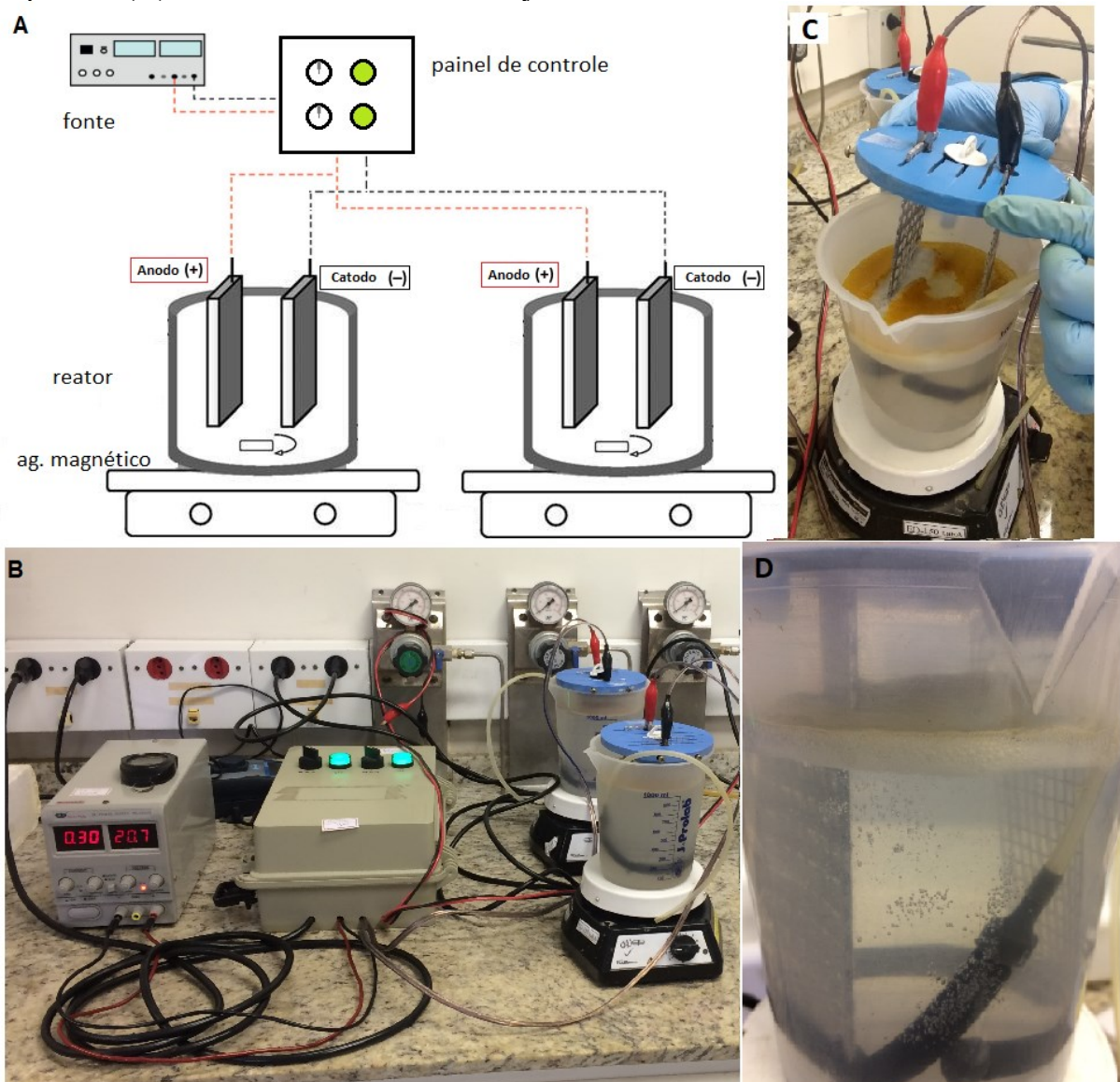


As leituras dos *primers* V3-V4 foram realizadas em *paired-end*, sendo feitas 20 mil leituras por amostra. As quimeras e outras leituras errôneas foram eliminadas usando *pipeline* de filtro da Neoprosperta, cuja metodologia é baseada na probabilidade do erro *Q-score*. As leituras obtidas foram submetidas à etapa de tratamento de dados com recursos computacionais, processados pelo *software* de bioinformática Epiome® (CHRISTOFF et al., 2017). As sequências foram agrupadas em Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU's), utilizando critério de similaridade de 97% (0,03 de distância filogenética) (LEFTICARIU et al., 2015; MA et al., 2015) e então foram sujeitas à classificação taxonômica, comparando-as com a base de dados 16S rRNA SILVA (PRUESSE et al., 2007; QUAST et al., 2013). Apenas as sequências representativas, abrangendo 99% de identidade no alinhamento, foram consideradas.

### 3.6. Eletrocoagulação na remoção de sulfato

O aparato eletroquímico para os ensaios de eletrocoagulação (EC) foi construído em escala de bancada, conforme adaptação da metodologia proposta por Mamelkina et al. (2017), cujo sistema consistiu em replicatas de reatores de EC operados em paralelo, para experimentos em duplicata e triplicata. Cada reator de EC tratava-se de bquer de plástico de 1L de capacidade, e dentro deles imersos eletrodos planos de Al (anodo) e aço inoxidável (catodo), sendo espaçados 5 cm entre eles (Figura 19A e C). As dimensões do eletrodo (anodo) foram de  $5,65 \times 13,9$  cm, constituindo uma área útil de  $28,76$  cm<sup>2</sup>.

**Figura 19.** (A) Ilustração e (B) Fotografia dos ensaios de EC em escala de bancada; (C) Perfil superior e (D) Perfil lateral de reator de EC juntamente a seus eletrodos imersos.



Fonte: a autora.

Foi utilizado um agitador magnético em velocidade baixa para homogeneização do meio, pois por conta das reações de redução e oxidação que ocorrem nos eletrodos, causa-se um gradiente de concentrações das espécies químicas. A passagem de corrente elétrica advinda de uma fonte de alimentação (PS-A305D) para os reatores foi regulada por intermédio de um painel de controle, fornecendo modos de exposição contínuo ou intermitente (um tempo ligado e um tempo desligado), que incidiram nos reatores com as mesmas intensidades de corrente (Figura 19B e D).

Ensaio com AIDAM (1 L por béquer) foram conduzidos em triplicata sob três diferentes intensidades de corrente (0,101, 0,144 e 0,187 A), produzindo densidades de corrente de 35, 50 e 65  $A \cdot m^{-2}$ , respectivamente. O local de realização dos experimentos foi climatizado, e a temperatura foi monitorada com termômetro de parede e mantida a  $23 \pm 1$  °C, sendo o tempo total de cada ensaio de 5 h, sob lenta agitação constante. Para cada ensaio, de hora em hora amostras foram coletadas, filtradas à vácuo (membrana de 0,45  $\mu m$  de porosidade), e então medidos o pH e concentração de sulfato do meio. Foram extraídas as médias das triplicatas e seu respectivo desvio-padrão. Variou-se também o modo de exposição (contínuo ou intermitente) com as diferentes densidades de corrente.

Após coletados estes dados ao longo do tempo, foram feitos estudos cinéticos (para determinar a ordem da cinética desta reação de remoção de sulfato), estudos estatísticos (para verificar se as remoções em cada densidade de corrente diferem estatisticamente) e planejamento fatorial (para saber qual combinação de modo de exposição com densidade de corrente proporciona a melhor remoção de sulfato).

### 3.6.1. Ordem da cinética de decaimento

A ordem cinética de uma reação ( $n$ ) trata-se do expoente da concentração do analito de interesse (neste caso o sulfato) na taxa de consumo, sendo geralmente expressa de forma empírica e normalmente resolvida através do método tentativa-erro (HELFFERICH, 2004). Quando não se sabe o mecanismo, a solução por tentativa-erro é utilizada, para ajustar os dados às taxas de decaimento de  $n$ -ésima ordem (LEVENSPIEL, 1999). Na Tabela 7 têm-se indicados alguns modelos de ordens de cinéticas (de 0 a 4), que foram testados, a partir da taxa de consumo em relação ao tempo. Após testadas as diferentes ordens, selecionou-se a que obteve (apresentou) maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) na plotagem concentração *versus* tempo.

**Tabela 7.** Alguns modelos para cinética de consumo de sulfato.

Ordem	Taxa de consumo	Equação linearizada
0	$-\frac{dC}{dt} = k$	$C = C_0 - k \cdot t$
0,5	$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C^{0,5}$	$\sqrt{C} = \sqrt{C_0} - 0,5k \cdot t$
1 <sup>a</sup>	$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C$	$\ln C = \ln C_0 - k \cdot t$
2 <sup>a</sup>	$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C^2$	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + k \cdot t$
3 <sup>a</sup>	$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C^3$	$\frac{1}{C^2} = \frac{1}{C_0^2} + 2k \cdot t$
4 <sup>a</sup>	$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C^4$	$\frac{1}{C^3} = \frac{1}{C_0^3} + 3k \cdot t$

Fonte: (LEVENSPIEL, 1999).

$C$  = concentração de sulfato;

$C_0$  = concentração inicial de sulfato;

$k$  = constante cinética.

### 3.6.2. Estudos estatísticos

Os dados obtidos de concentração média de sulfato para os ensaios de EC com densidades de corrente 35, 50 e 65 A·m<sup>-2</sup>, para os tempos de 3, 4 e 5 horas e em modo de exposição contínuo, foram avaliados através do Método de Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste de *Tukey*, o qual garante um intervalo de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o *software* R (livre e aberto). Esta análise avaliou se as concentrações de sulfato nos determinados tempos e densidades de corrente diferiam-se estatisticamente.

### 3.6.3. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial avaliou a influência que a densidade de corrente juntamente com o modo de exposição exerce na eficiência de remoção de sulfato após 5 horas de ensaio. Desta forma, foi utilizado o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> em duplicata com ponto central em triplicata. As variáveis dependentes (% remoção ou reposta) foram obtidas através de diferentes combinações das variáveis independentes (densidade de corrente e modo de exposição), sendo testadas em níveis mínimos e máximos (-1 e +1) e o ponto central (0) é a distância simétrica entre ambas. A matriz da combinação das diferentes variáveis proporcionou sete diferentes experimentos, sendo determinado pelo *software* Statistica 8 (Statsoft), os quais estão ilustrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Variáveis utilizadas no planejamento fatorial e a matriz da combinação das variáveis independentes.

<b>Variável independente</b>		<b>(-1)</b>	<b>0</b>	<b>(+1)</b>
Densidade de corrente ( $A \cdot m^{-2}$ )		35	50	65
Modo de exposição (min. ligado/min. desligado)		5/0 (Contínuo)	5/5 (Intermitente)	5/10 (Intermitente)
Modo de exposição	Dens. corrente ( $A \cdot m^{-2}$ )	35	50	65
	Contínuo	5/0	x	x
Intermitente	5/5		x (triplicata)	
	5/10	x		x

### 3.7. Avaliação da toxicidade dos efluentes tratados

Os procedimentos dos ensaios toxicológicos foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC. As plantas aquáticas *Landoltia punctata* foram coletadas do ambiente natural e adaptadas às condições laboratoriais, segundo o protocolo de normas (ISO/DIS 20079, 2010; OECD, 2002). O procedimento de inoculação da planta no meio de cultura, foi realizado conforme descrito por Lalau et al. (2015): as plantas foram cuidadosamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), deixando em repouso por 4 minutos, que permitiu remover possíveis microrganismos aderidos, como microalgas e fungos. Em seguida, as plantas foram lavadas duas vezes com água ultrapura. Posteriormente, as amostras de *L. punctata* foram inseridas em frascos com volume de 100 mL e 3 cm de profundidade, sendo estas amostras cultivadas um mês antes do início dos ensaios toxicológicos.

O meio de cultivo foi preparado e adaptado às normas-padrão (ISO/DIS 20079, 2010; OECD, 2002), em pH entre 6,5 e 7,0, à  $25 \pm 2$  °C, com ciclo diário de luz de 16 h e 8 h no escuro, cuja composição foi a seguinte:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $15 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $NaNO_3$  ( $8,5 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ( $7,2 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $Na_2CO_3$  ( $4,0 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $KH_2PO_3$  ( $1,34 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $H_3BO_3$  ( $1,0 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  ( $0,2 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  ( $0,01 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $0,05 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ( $0,005 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  ( $0,01 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $Na_2EDTA$  ( $0,28 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  ( $0,168 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ) (LALAU, 2014).

Foram testados os seguintes efeitos tóxicos: da AIDAM bruta, AIDAM com pH corrigido, AIDAM após bioestimulação de BRS (microcosmos) e AIDAM após eletrocoagulação. Para cada uma destas análises, foram realizadas diluições das amostras em porcentagens, chamados de fatores de concentração (FC) de 0, 25, 50, 75 e 100%, sendo 0 apenas o meio de cultura

(também considerado o controle) e 100% a amostra bruta, com um total de seis replicatas por diluição, extraindo-se a média destas.

Os ensaios iniciaram-se com 10 folhas ( $F_0$ ) de lemnas para cada diluição, com duração total de 7 dias ( $t_1 - t_0$ ). Ao final do teste, foi medido o número de folhas ( $F_1$ ) de lemnas, sendo a taxa de crescimento ( $r$ , adimensional) calculada de acordo com a Eq. 22, e a taxa de inibição ( $I$ , %) do crescimento específico, segundo a Eq. 23:

$$r = \frac{\ln(F_1) - \ln(F_0)}{t_1 - t_0} \quad \text{Eq. 22}$$

$$I = \frac{r_c - r_t}{r_c} \times 100 \quad \text{Eq. 23}$$

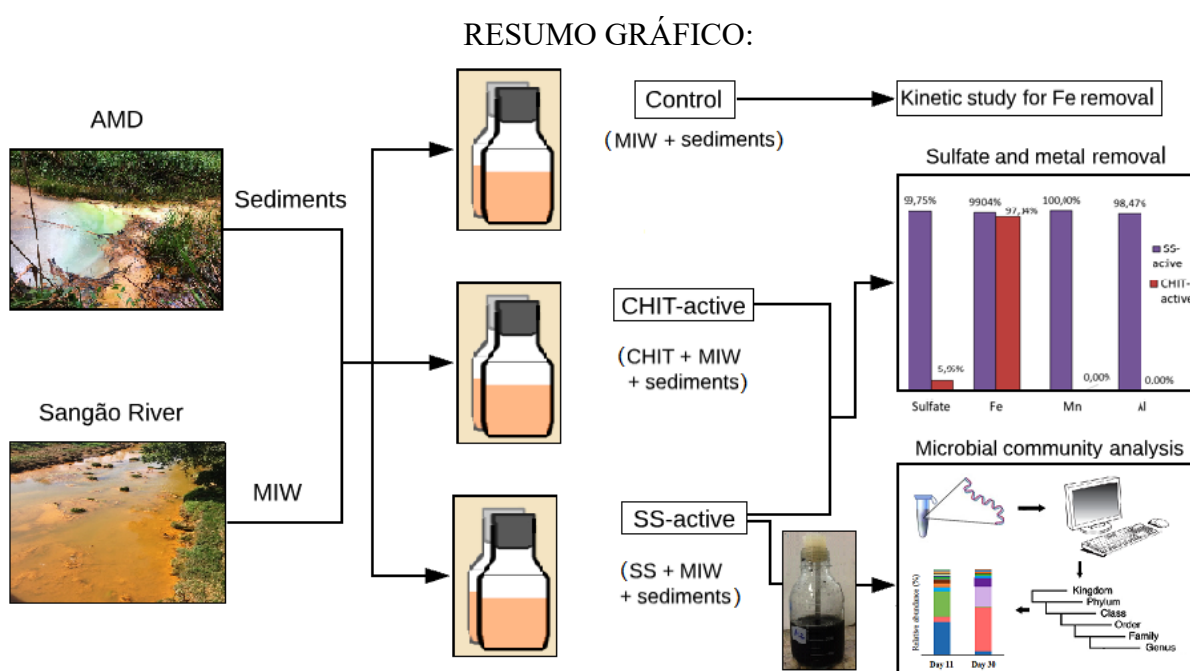
Onde  $r_c$  é a média da taxa específica de crescimento do controle (i.e. valores obtidos com  $FC = 0$  de cada ensaio) e  $r_t$  a média da taxa específica de crescimento dos fatores de concentração. Foram plotados no gráfico os valores de  $r$  e  $I$  e seus respectivos FC's, e através dos dados de inibição, foram extraídas as equações de reta (através de regressões lineares ou não-lineares), e partir de cada uma destas, as respectivas concentrações para atingir a  $CE_{50}$  (concentração de efeito para inibição do crescimento de 50% das folhas).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida e apresentada em forma de quatro artigos científicos (esquemáticos anteriormente pela Figura 14), os quais foram publicados e/ou submetidos à periódicos científicos.

### 4.1. Artigo 1<sup>5</sup> - Chitin as a substrate for the biostimulation of sulfate-reducing bacteria in the treatment of mine-impacted water (MIW)



<sup>5</sup> Este artigo deu origem à seguinte publicação:

Journal of Hazardous Materials 375 (2019) 330–338



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)



Chitin as a substrate for the biostimulation of sulfate-reducing bacteria in the treatment of mine-impacted water (MIW)



Caroline Rodrigues<sup>a,\*</sup>, Dámaris Núñez-Gómez<sup>a</sup>, D.D. Silveira<sup>a</sup>, Flávio R. Lapolli<sup>a</sup>, María A. Lobo-Recio<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Department of Energy and Sustainability, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88900-000, Araranguá, SC, Brazil

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.086>

CiteScore 2019: 13,1.

Fator de impacto 2019: 9,038.

## ABSTRACT

This study aims to know the basis of sulfate-reducing bacteria (SRB) and chitin source relationship for the development of a biotreatment system for mine-impacted water (MIW). The MIW consists of river water impacted by coal acid mine drainage (AMD), an extremely acid effluent, rich in sulfate and dissolved metal ions, with a high pollutant potential. Chitin was used as metal ion sorbent and biostimulant of SRB, whose anaerobic dissimilatory metabolism reduces sulfate to sulfide. Microcosms were built in an oxygen-free atmosphere using chitin from two different sources: commercial chitin and shrimp shell waste, which contains calcium carbonate, an acidity removal agent, in addition to chitin. The results indicate that the shrimp shell performs best in removing sulfate (99.75%), iron (99.04%), aluminum (98.47%), and manganese (100%) ions. The iron ion sorption kinetics of the sediments were also studied; pseudo-second order behavior was observed. High-throughput sequencing analysis revealed the present bacterial community and its abundance in the microcosms after 11 and 30 treatment days: SRB were detected but were not the majority. Thus, this research aims to contribute to the sustainable treatment MIW through the employment of an abundant and low-cost biomaterial.

**Keywords:** Mine-impacted water (MIW); Chitin; Metal removal; Sulfate-reducing bacteria (SRB); High-throughput sequencing.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo conhecer as bases da relação entre as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e a fonte de quitina para o desenvolvimento de um sistema de tratamento biológico para águas impactadas por drenagem ácida de mineração (AIDAM – águas impactadas com DAM). AIDAM consiste em água de rio impactada por drenagem ácida de mineração (DAM) de carvão, um efluente extremamente ácido, rico em sulfato e íons metálicos dissolvidos, com elevado potencial poluidor. Quitina foi usada como adsorvente de íons metálicos e também como bioestimulante de BRS, cujo metabolismo dissimulatório anaeróbio reduz sulfato a sulfeto. Foram construídos microcosmos em atmosfera anóxica utilizando duas fontes de quitina: quitina comercial (QUIT) e resíduo de casca de camarão (CC), que contém carbonato de cálcio, um agente removedor de acidez, além da quitina. Os resultados indicam que casca de camarão atua melhor na remoção dos íons sulfato (99,75%), ferro (99,04%), alumínio (98,47%) e manganês (100%). A cinética de adsorção de ferro nos sedimentos também foi estudada, sendo observado uma cinética de comportamento de pseudo-segunda ordem.

Análises de sequenciamento *high-throughput* revelaram a comunidade bacteriana presente, bem como a sua abundância nos microcosmos após 11 e 30 dias de tratamento: BRS foram detectados, mas não constituíram a maioria das bactérias. Desta forma, esta pesquisa visa contribuir para o tratamento sustentável de AIDAM através do emprego de um biomaterial abundante e de baixo custo.

**Palavras-chave:** Água impactada com DAM (AIDAM); quitina; remoção metálica; bactérias redutoras de sulfato (BRS); sequenciamento *high-throughput*.

Transcrição adaptada do Artigo:

#### 4.1.1. Introduction

Acid Mine Drainage (AMD) from abandoned/inactive mines is a major environmental issue in countries with large-scale mining activities (MAMELKINA et al., 2017; PAPIRIO et al., 2013). Therefore, the carboniferous basin in the south of the Santa Catarina (SC) State, Brazil, has been highly impacted by AMD (OSÓRIO et al., 2014). This pollution has occurred over the last 30 years and fluvial water and sediments have been altered. Most rivers in this region are considered to be dead because of the high level of toxicity (LATTUADA et al., 2009; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016).

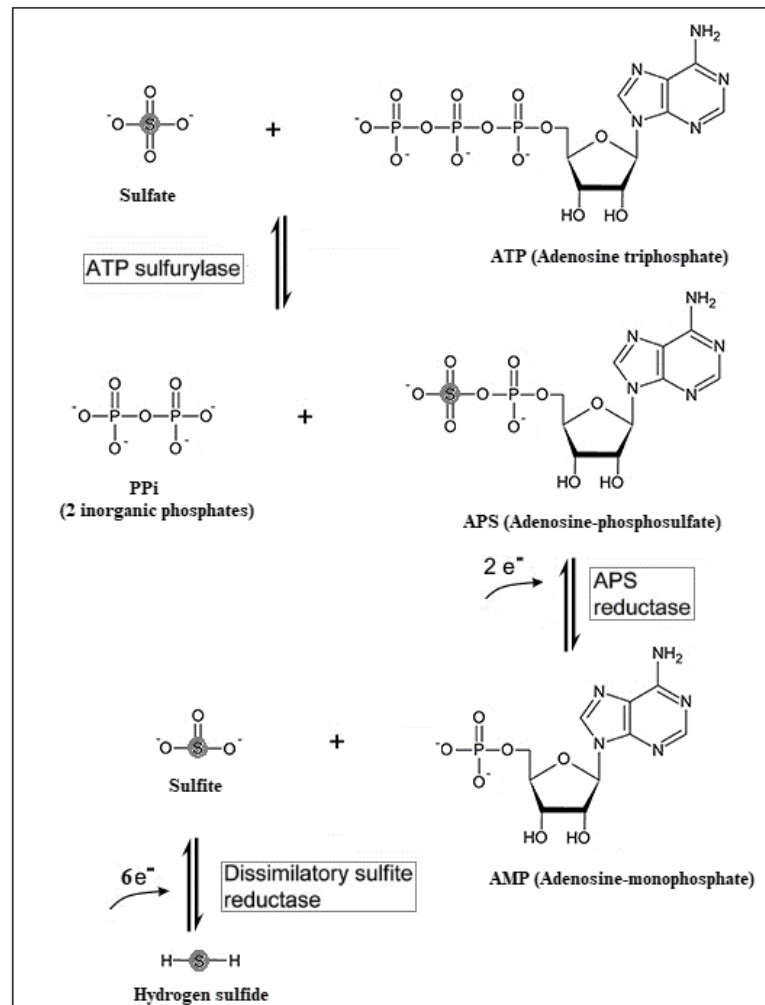
AMD forms via several chemical and biological processes in the presence of air and water, involving the oxidation of sulfides of geological origin (e.g., pyrite). An acid effluent is generated, which is characterized by a pH between 2 and 4 and high concentrations of sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) and dissolved metallic ions (e.g., Fe, Al, Mn, Zn, Cu, and Pb) depending on the geological strata of the mining area (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017; ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012, 2014; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a; ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). The AMD formation is a cycle of autocatalytic reactions, which is difficult to control, ceases only when pyrite is exhausted (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017), and continuously contaminates surface and groundwater (MAMELKINA et al., 2017), known as mine-impacted water (MIW). Once MIW is generated, it is difficult to control the process and water treatment is expensive (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017), can persist for centuries and reach extensive distances of watercourses (LATTUADA et al., 2009).

An alternative substrate for MIW bioremediation method was tested, which is based on the ability of microorganisms to generate alkalinity and immobilize metals ions

(ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012). Sulfate-reducing bacteria (SRB) are a group of prokaryotes (from bacteria and archaea domains) that oxidize organic compounds under anaerobic conditions using sulfate as a final electron acceptor in the energy metabolism, perform dissimilatory sulfate reduction, and thus convert sulfate to hydrogen sulfide and release bicarbonate (Eq. 5), whose generic and simple organic compound  $\text{CH}_2\text{O}$ , available to SRB, is the electron donor and energetic source of the reaction.

Biological sulfate reduction can be performed by assimilatory and dissimilatory metabolisms. In the first, sulfate is incorporated to cellular growth, protein synthesis, etc. In the dissimilatory, sulfate is an electron acceptor, along with organic compounds (or  $\text{H}_2$ ) as electron donors, being reduced to hydrogen sulfide and excreted in the medium (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014). This reduction process requires 8 electrons and is catalyzed by several enzymes (ATP sulfurylase, APS reductase and dissimilatory sulfite reductase), as illustrated in Figure 20.

**Figure 20.** Biochemical pathway of dissimilatory sulfate reduction



Sulfate is activated through ATP (adenosine-triphosphate) and enzyme ATP sulfurylase, that catalyzes the sulfate binding in ATP, leading to the formation of APS (adenosine-phosphosulfate). This activation makes the standard reduction potential from sulfate to sulfite ( $E^{0'} = -0.52$  V) be raised to near 0 V, enabling the reduction. The sulfate group in APS is reduced to sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), through enzyme APS reductase and releasing AMP (adenosine-monophosphate). Once sulfite is formed, the enzyme dissimilatory sulfite-reductase leads to the formation of sulfide (GOLDHABER, 2003; MADIGAN et al., 2016).

Hydrogen sulfide may react with dissolved metals, preferably bivalents ( $\text{M}^{2+}$ ), that are typically present in MIW and precipitate them in the form of sulfides (Eq. 6), which is an important bioprocess for the removal of metals from AMD and MIW (COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017; FLORENTINO et al., 2016a; PAPIRIO et al., 2013).

These SRB are naturally present in anoxic sediments and places contaminated with AMD such as marine sediments and lakes (MADIGAN et al., 2016; NANCUCHEO et al., 2016). The metabolism of SRB and environmental conditions in which they prosper are versatile (MUYZER; STAMS, 2008). Due to the potential for the combined removal of acidity, metals, and sulfate, biological sulfate-reduction appears to be a highly promising MIW treatment and metal recovery method (KIRAN; PAKSHIRAJAN; DAS, 2017; ZHANG; WANG; HAN, 2016).

In addition, it has been reported that sediments can retain over 90% of metals and metalloid water pollutants, which is important for metal cycling in ecosystems (REIS et al., 2016). The particle size and sediment composition are related to the binding capacity of contaminants and the ability to retain metal ions via adsorption, chelation, and ion exchange mechanisms (MIZUTANI et al., 2017).

Generally MIW contains very low concentrations of dissolved organic carbon and therefore an additional organic carbon source must be added as electron donor to adequately develop SRB (COSTA; RODRIGUEZ; SANCINETTI, 2017; FLORENTINO et al., 2015; PAPIRIO et al., 2013). Studies (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a) concluded that the chitin chain may be used as an adequate substrate for the SRB culture because it has a suitable C/N ratio (6.86 on mass basis) and creates reducing conditions during its degradation, which promotes anaerobic processes. Previous studies (DAUBERT; BRENNAN, 2007) already showed that chitinous materials can be effectively used for AMD bioremediation.

Chitin is a biopolymer that is widely distributed in nature. Its main sources are the exoskeletons of many crustaceans and insects. Chemically, it is a high-weight molecular polymer comprising units of N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucose linked by  $\beta$ -glycosidic

bonds (1 → 4), forming a linear chain (LIU et al., 2013; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a). Chitin is also a metal-ion adsorbent; it can be used to remove metals from aqueous solution (LOBO-RECIO et al., 2013; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a). It has been successfully used in the MIW treatment (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a) because of its acetamide and hydroxyl groups, which behave as Lewis bases, serve as coordination sites, and form stable complexes (BARIKANI et al., 2014).

Shrimp shell (SS) is one of the sources of chitin. It is an abundant and low-cost residue, which is available in large quantities due to the processing of the fishing industry in the SC State (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a). It has the following composition: 17%–20% chitin, 33%–40% proteins, and 32%–38% mineral salts (mainly calcium carbonate) (RØDDE; EINBU; VÅRUM, 2008). The latter guarantees the increase of the alkalinity in the medium, which is an advantage over other sources of chitin.

Thus, in this work, chitin was chosen as electron donor source for dissimilatory sulfate reduction. For comparative purposes, two different sources of chitin were tested: SS and commercial chitin (CHIT). Preliminary studies demonstrated that SS is a better AMD treatment agent than CHIT (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016) because of its CaCO<sub>3</sub> content.

This study aims to establish the basis for the development of a treatment system for coal MIW bioremediation based on the use of different sources of chitin as SRB biostimulant. The bacterial community and its abundance were also studied. Additionally, iron adsorption was observed in the sediment that was used as inoculum and the kinetics are described.

#### **4.1.2. Materials and methods**

##### ***4.1.2.1. Collection and characterization of mine-impacted water (MIW)***

The MIW was obtained from the Sangão River in carboniferous basin of the southern SC state, Brazil. The samples were collected in non-sterile polypropylene bottles with no headspace (APHA, 2017), filtered using a 0.45 µm membrane under vacuum, and characterized before and after the treatments. The parameters pH, Fe, Mn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sup>2-</sup>, CH<sub>4</sub>, and dissolved oxygen (DO) were analyzed as described previously (Tabela 6).

##### ***4.1.2.2. Chitin source***

The SSs were acquired from fish markets, washed with tap water, dried for 72 h (for 48 hours at 100 °C and 24 hours at 50 °C), pulverized in a regular blender and sifted (to give greater

homogeneity and adequate contact surface), and kept in glass desiccator prior to analysis, to avoid absorption of atmosphere moisture, as described by Núñez-Gómez et al. (2016, 2017a, 2018). The CHIT consisted of chemically treated flake chitin for commercial purpose with 70% purity based on the manufacturer's information (*Polymar Ciência e Nutrição S/A*). Because the CHIT was already chemically treated, no additional steps were required; it was just pulverized in the blender and sifted.

#### ***4.1.2.3. MIW treatment: experimental setup for microcosms***

To evaluate the potential of SRB for MIW bioremediation, experiments were carried out in batch microcosms under N<sub>2</sub> atmosphere to ensure anoxia ( $DO \leq 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The purpose was to biostimulate the development of SRB and thus remove the sulfate and dissolved metallic ions as insoluble sulfides (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a).

The microcosms were prepared in 500 mL total capacity glass bottles, sealed with a silicone stopper and kept protected of light in a special room. Three sets of 20 bottles/microcosms were prepared (total of 60 microcosms). Two sets of active microcosms were prepared. Each flask contained 0.23 g of dry sediment (8.15 g of wet sediment), 260 mL of MIW and 10 g·L<sup>-1</sup> of source of chitin, CHIT or SS. The sets were labelled “CHIT-active” and “SS-active” respectively. The dry sediment weight was determined by drying the wet sediment in a stove at 105 °C during 24 hours, to eliminate its humidity (this weight was used for kinetics calculations). The third set of bottles was analogously prepared but without the chitin source and was labeled “control group.” All bottles were purged with N<sub>2</sub>, sealed, incubated in the dark at 20 °C, shaken manually once a day, and opened (sacrificed) after predetermined times (1, 2, 7, 9, 11, 16, 20, 24, 30 and 41 days). The temperature was constant during the tests and it was controlled with a wall thermometer, in a closed room with air conditioner, programmed for 20 °C continuously. The contents were filtered inside a fume hood in a N<sub>2</sub> atmosphere (to avoid oxidation of the compounds) and the filtrates were analyzed. Every experiment was performed in duplicate to minimize the experimental error and overcome any potential discrepancies of the biological system.

#### ***4.1.2.4. Adsorption kinetics of the sediments***

Benthic sediments of an abandoned mine located in Urussanga, SC, were used as microbial inoculum source because this place is a promising source of SRB (FLORENTINO et al., 2015).

During the experimental process, parallel to the active essays, the control group flasks (MIW + sediments) were monitored, and a significant reduction of ion Fe was observed. The conditions were the same as described in item 2.3 (only without chitin source), since the purpose was to check if there is any other occurrence (biological or chemical) in the absence of source of carbon. This way, a kinetic study about the adsorption of iron by the sediment was carried out to determine the kinetic parameters and removal mechanism: the experimental data were analyzed using four kinetic models: pseudo-first order, pseudo-second order, intraparticle diffusion, and Elovich.

#### ***4.1.2.5. High-throughput sequencing***

For the evaluation of the bacterial community involved in the sulfate reduction, two samples were taken throughout the operation of the SS-active essay, on days 11 and 30 (beginning and end of the log phase, the higher metabolism period), respectively (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a). The collected samples were stored at -20 °C prior to the analyses. High-throughput sequencing was used as molecular method to provide qualitative and quantitative results (relative abundance) for the bacterial community present in the samples. To determine the phylogenetic diversity of the bacterial communities of different treatments, the genus data were used.

All 16S rRNA data were analyzed using gene sequencing of the region V3–V4 on the extracted DNA (CHRISTOFF et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2014). Universal primers, such as 341F 5' CCTACGGGRSGCAGCAG-3' (WANG; QIAN, 2009) and 806R 5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (CAPORASO et al., 2011), were used because both have a great taxonomy coverage with respect to bacteria and archaea (TAKAHASHI et al., 2014). Finally, the libraries were sequenced using the MiSeq platform (MiSeq, Illumina Inc., USA) by Neoprosperta Microbiome Technologies, Inc. (Florianópolis, Brazil).

Chimeras were eliminated using the proprietary Neoprosperta filtering pipeline, which is based on the probability of Q-score errors. Operational Taxonomic Units (OTU's) with 97% similarity (0.03 phylogenetic distance) were selected and then subjected to taxonomic classification by comparing them with the 16S rRNA SILVA database (QUAST et al., 2013). Only representative sequences with hits of 99% identity in an alignment covering over 99% were considered. Subsequently, the data for relative abundance construction were processed using specialized bioinformatics software (Epiome<sup>®</sup>) and loaded onto a specific platform for the analysis and interpretation of the results (CHRISTOFF et al., 2017).



### 4.1.3. Results and discussion

#### 4.1.3.1. MIW characterization and microcosm tests

The characterization of the parameters of interest of the MIW is showed in Table 9 together with Brazilian and international guidelines to compare the MIW with the maximum allowable values based on legislations. None of the parameters analyzed agrees with the norms, indicating the poor quality of this river water, which is not adequate for irrigation and non-potable reuse and is off standards for effluent release.

**Table 9.** MIW analytical data

Parameter	Unit	Collection 1 <sup>1</sup>	Collection 2 <sup>2</sup>	CONAMA 357 <sup>3</sup>	CONAMA 430 <sup>4</sup>	FAO <sup>5</sup>
pH	-	2.61	3.14	6–9	5–9	-
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg·L <sup>-1</sup>	400	420	250	-	-
Fe	mg·L <sup>-1</sup>	32.4	35.8	5	15	5
Mn	mg·L <sup>-1</sup>	2.8	2.6	0.5	1.0	0.2
Al	mg·L <sup>-1</sup>	25.24	19.52	0.2	-	5

<sup>1</sup> Used for SS-active essay.

<sup>2</sup> Used for CHIT-active essay.

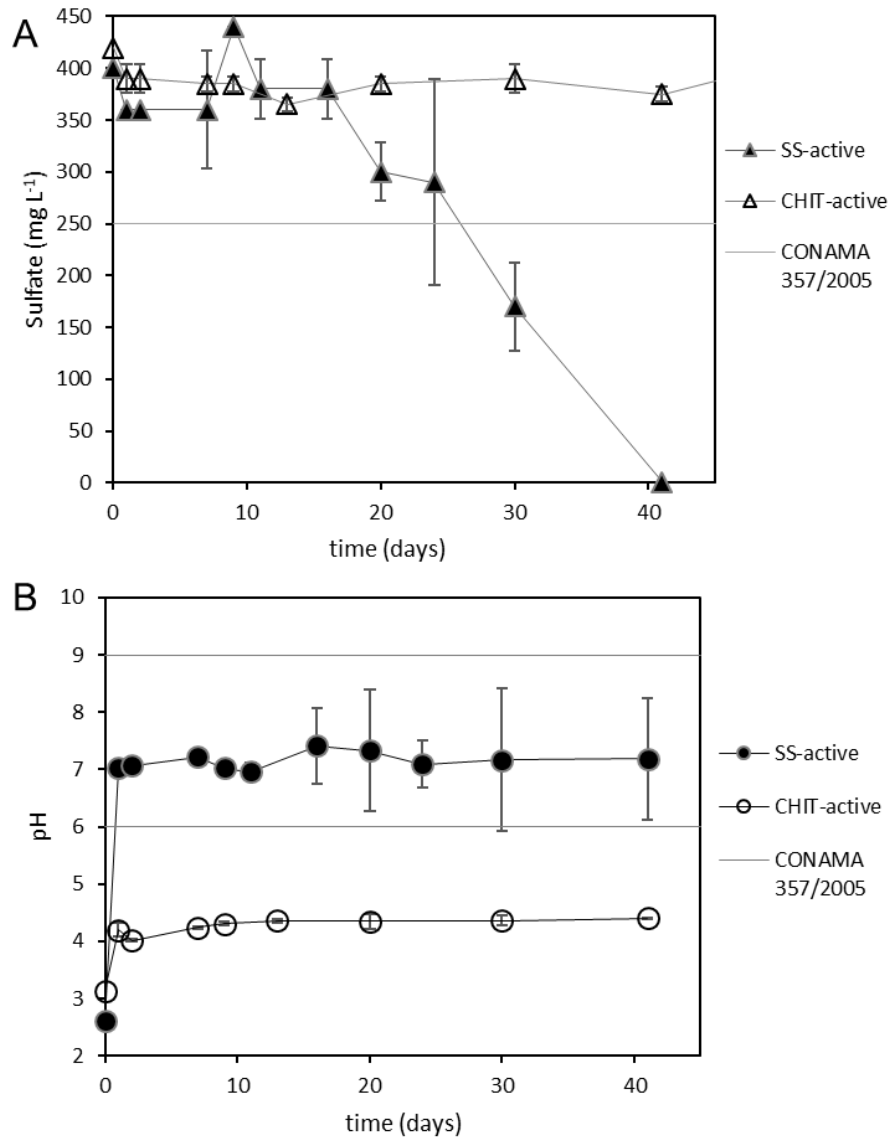
<sup>3</sup> Maximum allowable values for Class III water, adequate for non-potable reuse (BRASIL, 2005).

<sup>4</sup> Brazilian conditions and standards of effluent releases (BRASIL, 2011).

<sup>5</sup> Maximum recommended level in irrigation waters recommended by the United Nations Food and Agriculture Organization (1985).

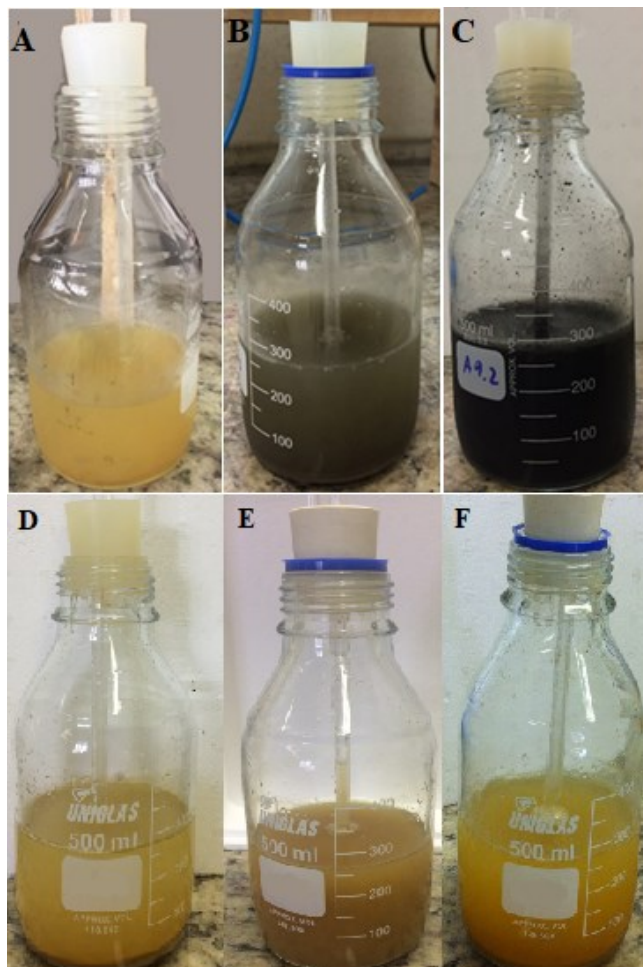
Figure 21 shows the sulfate and pH variations for CHIT- and SS-active essays over time and organizes them according to the maximum allowable value (MAV) for secondary non-potable water reuse recommended by the Brazilian environmental legislation (CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005)). In the SS-active essay, sulfate removal and hydrogen sulfide formation ( $70 \pm 34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) become apparent after 7-9 days of experiment. The characteristic smell and dark appearance of hydrogen sulfide (Figure 22A, B and C) due to the formation of black precipitates, possibly metal sulfides, confirm the beginning of the sulfate-reducing activity (MADIGAN et al., 2016; ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a). Thus, an acclimation (lag) time of approximately 9 days can be inferred. After 30 days of treatment, the sulfate concentration was lower than the MAV for non-potable reuse water. The sulfate was almost completely removed after 41 days. The initial pH (2.61) strongly increased due to the increase of the alkalinity caused by CaCO<sub>3</sub>. It reached a plateau near neutrality after one day (Figure 21B) at an average value of  $7.15 \pm 0.50$ .

**Figure 21.** (A) Sulfate concentration and (B) pH variations over time of the SS-active and CHIT-actives sets of microcosms. The data points represent duplicate average values and the error bars represent the standard deviation.



In contrast, neither the sulfate nor pH considerably changed in the CHIT-active essay (Figure 21): the pH remained stagnant at a mean value of  $4.29 \pm 0.12$ , the sulfate maintained a mean of  $388.10 \pm 14.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the visuals remained unchanged throughout the experiment (Figure 22D, E and F). The sulfate removal reached only 10.71% after 41 days of experiment. The low pH of the CHIT-active essay may be related to the poor sulfate removal, possibly derived from inadequate physiological conditions during the development and establishment of SRB.

**Figure 22.** Microcosm of the SS-active essay on (A) day 0, (B) day 7, and (C) day 30 and CHIT-active essay on (D) day 0, (E) day 7, and (F) day 30. This illustrates the evidences of black sulfides formation in the SS-active essay but not the same for the CHIT-active assay, in the same period.

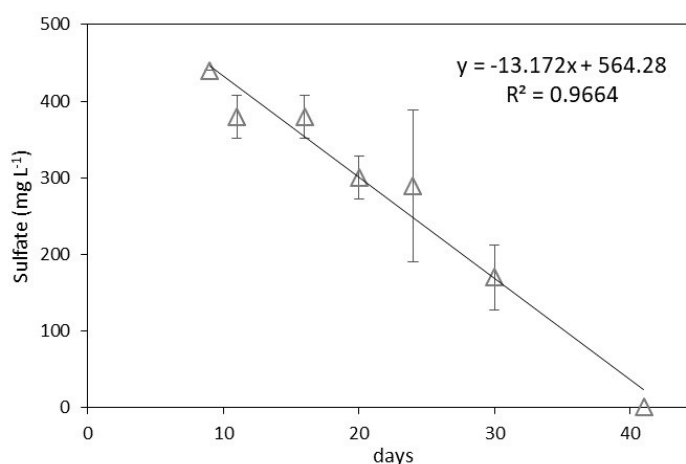


In this sense and based on previous studies (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013, 2015; ZHANG; WANG, 2016), the vast majority of known species of SRB are neutrophilic, have a better growth at pH 6–8, and are highly sensitive to acidity (ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2014). Although acidophilic SRB were reported in the literature in recent years (FLORENTINO et al., 2015, 2016a; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013, 2014) and sulfate reduction was successfully carried out down to a pH of 2.5 (ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2012) on CHIT-active essays, the bacterial development is inadequate for reaching a successful sulfate-reducing activity. Koschorreck (2008) stated that there is no clear explanation for the absence of sulfate reduction under certain low-pH conditions because it is a widespread phenomenon. Different reports (ÑANCUCHEO et al., 2016; PAPIRIO et al., 2013) on the isolation of acidotolerant SRB show that (i) organisms with a low metabolic energy yield, such as SRB, might be especially susceptible to a low pH and to the fact that metabolic products of anaerobic bacteria, such as

hydrogen sulfide and organic acids, are potentially toxic at an acidic pH because neutral molecules (unionized) permeate easily to the cell membrane; (ii) low pH environments often contain elevated concentrations of dissolved metals, which might be toxic to bacteria (deactivating enzymes and denaturing proteins); (iii) there are cases in which sulfate reduction is stimulated by simple organic substrates but not by complex substrates, suggesting that other fermenting bacteria are inhibited by the low pH.

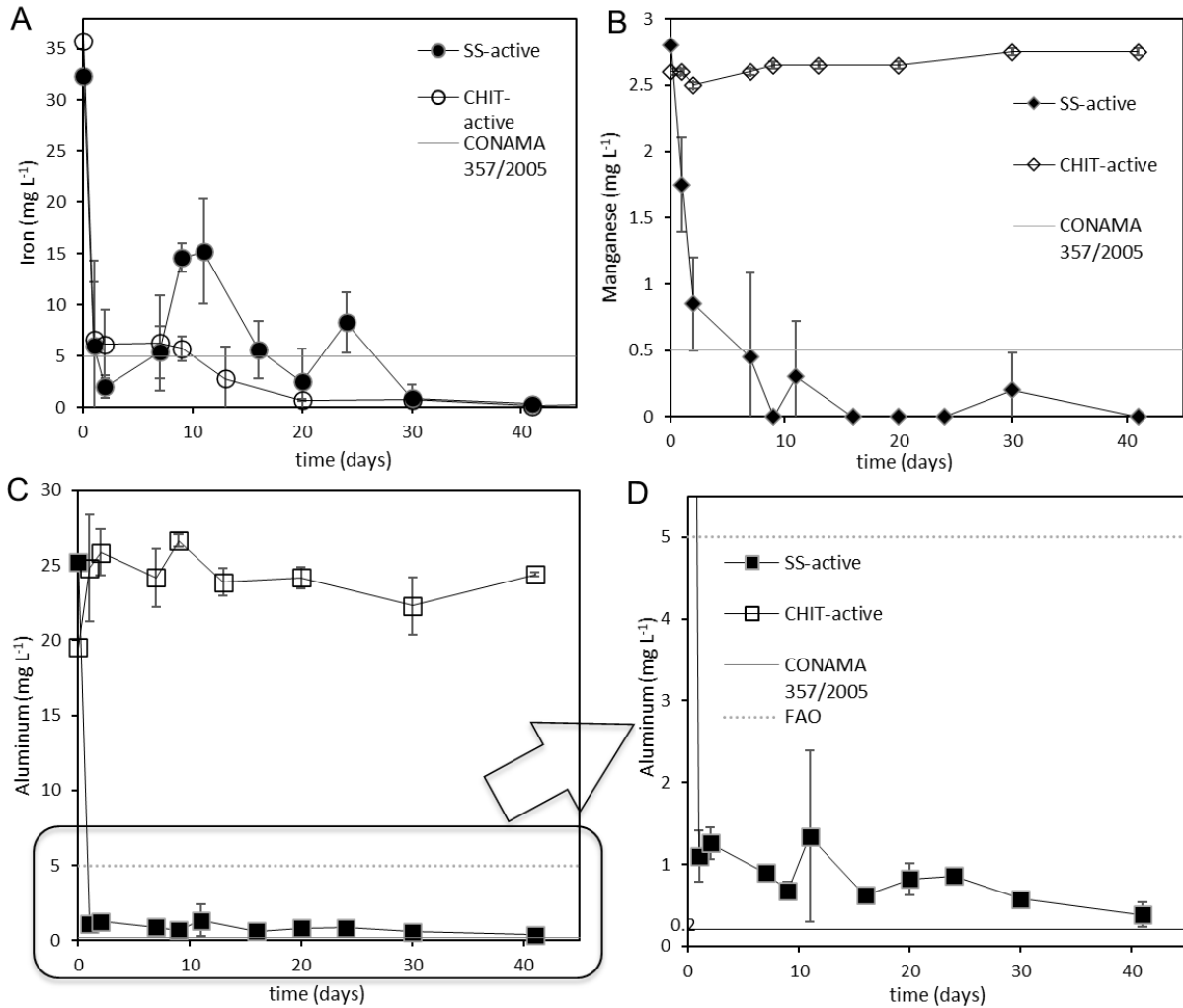
Based on data points from days 9 to 41 for the SS-active assay, the average rate of sulfate reduction (slope of the fitting curve) was calculated to be  $-13.172 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$  (Figure 23). This rate is in agreement with the reported (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a), ranging from  $-11.9$  to  $-16.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . If the sulfate decay is independent of the concentration, the kinetics are considered to be of zero order.

**Figure 23.** Variation of sulfate concentration over time during log phase (higher metabolism) and its decay rate.

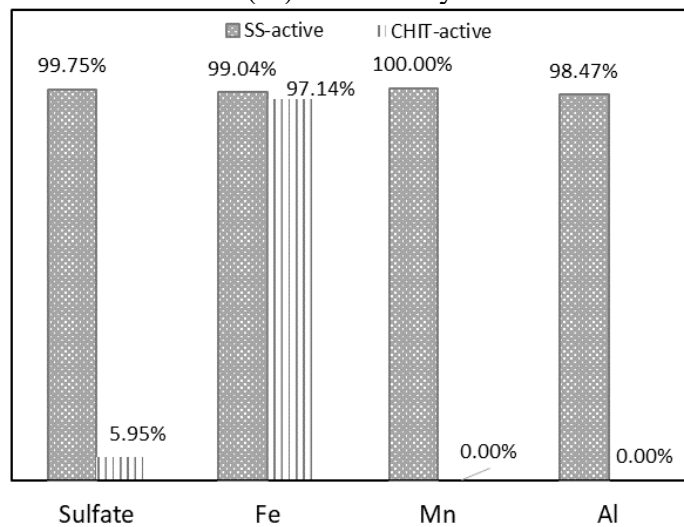


In addition to sulfate,  $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  ions were successfully removed from the SS-active assay (Figure 24 and Figure 25). The Fe and Mn ion concentrations decreased to the MAV after 30 and 7 treatment days, respectively (Figure 24A and B), reaching a 99.94% and 100% removal at the end of the experiment (41 days; Figure 25). The Al ion removal has been fast and very efficient (98.47%) since the first day of treatment, although the concentration is slightly higher than the Brazilian MAV ( $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Figure 24C and D) but adequate for irrigation based on the FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (Table 9). Aluminum is toxic for many life forms, even at relatively low concentrations, and its removal from acidic waste waters, such as MIW, is highly desirable (FALAGÁN et al., 2017).

**Figure 24.** Variations of (A) Iron, (B) Manganese, and (C and D) Aluminum ion concentration over time. (D) chart is an emphasis of Aluminum concentration. The data points represent duplicate average measurements and the error bars represent the standard deviation.



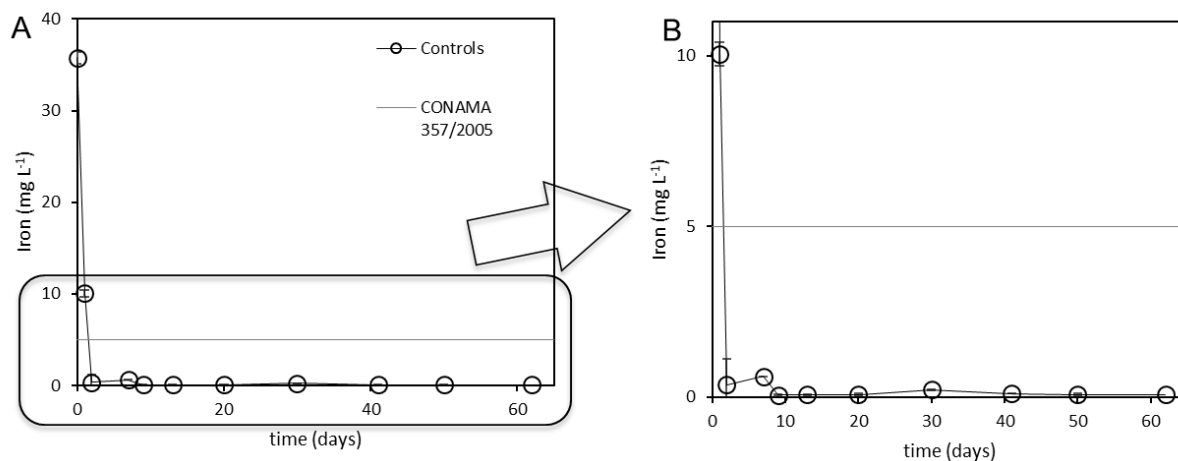
**Figure 25.** Sulfate and metal removal (%) after 41 days



In spite of the known metal adsorption capacity of chitin, the pH value close to neutrality of the SS-active assay (average of  $7.15 \pm 0.50$ , Figure 21B) and black color of the obtained precipitates (Figure 22C) suggest that metallic ion removal via precipitation of metallic hydroxides, carbonates, and mainly sulfides (MARTINS et al., 2011) is the principal mechanism. Methane was not detected during the analysis of gases in the flasks that were opened on days 20 and 41 of the experiment, suggesting the absence of methanogenic bacteria in the microbial community.

In the CHIT-active assay, Mn and Al ions were not removed (Figure 24B and C). Based on literature, the Mn ion is not easily removed at a  $\text{pH} < 6$  (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017) and the predominant form of Al in this pH range ( $4.29 \pm 0.12$ ) is the cation  $\text{Al}^{3+}$  (APHA, 2017), which is soluble. In contrast, 99.61% of Fe was removed and its concentration agrees with the MAV (Figure 24A) after 12 days of treatment. However, an even higher Fe ion removal was observed in the control tests (water and sediments,  $\text{pH} = 3.82 \pm 0.25$ ; Figure 26). After only 2 days, a 99% removal was obtained and the Fe concentration met environmental regulations. This indicates an adsorptive process of Fe ion in the sediment because a sulfate-reducing activity was not determined in the control tests.

**Figure 26.** (A) Iron concentrations in the control tests over time and (B) chart is an emphasis of the concentration.



The iron ion adsorption on the sediment was investigated using adsorption kinetics, that is, the pseudo-first order, pseudo-second order, intraparticle diffusion, and Elovich models. The linearized equation and physical–chemical meaning for each model are provided in Table 10.

**Table 10.** Kinetic parameters for Fe ion sorption on the sediment.

Model	Linearized equation	R <sup>2</sup>	Parameter	Value	Unit
Pseudo-first order	$\ln(q_e - q_t)$	0.0290	$k_1$	0.015	time <sup>-1</sup>
	$= -k_1 \cdot t + \ln q_e$		$q_e$	0.743	m·g <sup>-1</sup>
Pseudo-second order	$\frac{t}{q_t} = \frac{t}{q_e} + \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2}$	0.9999	$k_2$	1.918	g·mg <sup>-1</sup> time <sup>-1</sup>
			$q_e$	36.101	m·g <sup>-1</sup>
			$h_2$	2.5×10 <sup>3</sup>	mg·g <sup>-1</sup> time <sup>-1</sup>
Intraparticle diffusion	$q_t = k_{in} \cdot \sqrt{t} + C$	0.5994	$k_{in}$	0.3893	mg·g <sup>-1</sup> time <sup>-0.5</sup>
			$C$	34.318	-
Elovich	$q_t = \frac{1}{\beta} \ln t + \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta)$	0.8218	$\alpha$	1.71×10 <sup>22</sup>	mg·g <sup>-1</sup> time <sup>-1</sup>
			$\beta$	1.509	g·mg <sup>-1</sup>

$q_t$ : amount of adsorbate in the adsorbent at time t;

$q_e$ : amount of adsorbate in the adsorbent under equilibrium;

$k_1$ : rate constant for pseudo-first order sorption;

$k_2$ : rate constant for pseudo-second order sorption;

$h_2$ : initial sorption rate ( $k_2 \cdot q_e^2$ );

$k_{in}$ : rate constant for intraparticle diffusion;

$C$ : constant representing the resistance to mass transfer in the boundary layer;

$\alpha$ : initial sorption rate;

$\beta$ : Elovich constant.

The pseudo-second order model provides the best fit of experimental data ( $R^2 = 0.9999$ ). Consequently, it was considered that chemical adsorption is the rate-controlling step for uptake kinetics, which involves valence strength or electron exchange between sorbent (sediment) and sorbate ( $\text{Fe}^{2+}$ ) because the sorption rate is proportional to the number of active sites (LOBO-RECIO et al., 2013; WEI et al., 2017). Studies report that humic substances from the sediments (containing phenolic and carboxylic groups) may attract electrostatically cations until total saturation of its active sites (COHEN, 2006). Other authors also mention the presence of clay colloids (SHEORAN; SHEORAN, 2006). The other models did not reach reliable fits or parameters. The high Fe removal in the CHIT-active assay was therefore attributed to the adsorption on the sediment and not to the process involving chitin and/or SRB.

This study shows that CHIT alone, under the studied experimental conditions, is not an adequate treatment agent neither as metal adsorbent nor as SRB biostimulant substrate. The pH below 5 of the experiment might have inhibited the SRB development and thus the sulfate removal. On the other hand, previous laboratory studies (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016) showed that CHIT can remove metal ions from the same MIW in an acidic medium and air, where the removal strongly depends on the agitation. In the present experiment, the flasks were shaken once per day. The SRB acclimation and reducing environment prevented the  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation, suggesting that  $\text{Fe}^{3+}$  is better adsorbed by CHIT or precipitated as hydroxide than  $\text{Fe}^{2+}$ . In comparison, the presence of  $\text{CaCO}_3$  in SS buffered the pH value, allowing SRB development.

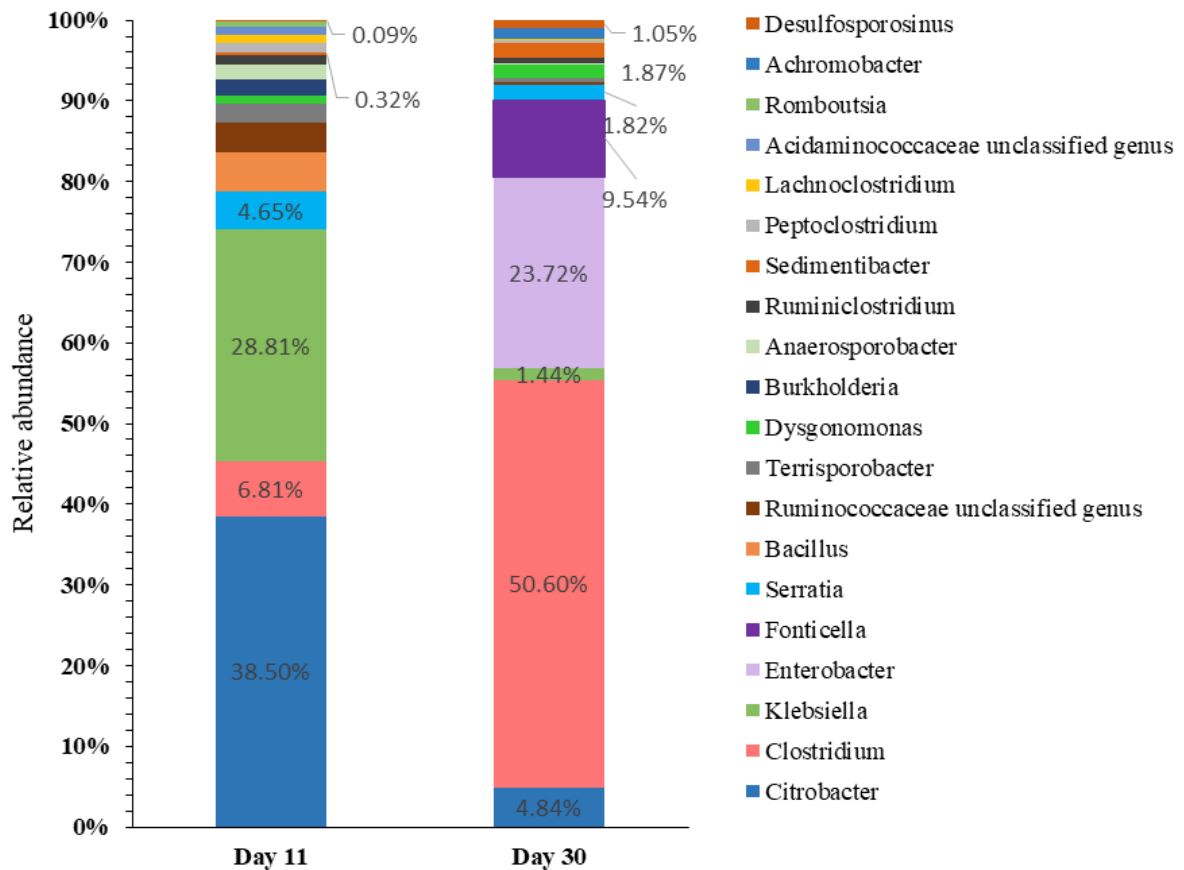
This led to sulfate removal and strongly suggested that the metals are removed via precipitation as sulfides.

#### 4.1.3.2. Microbial community analysis

Molecular analyses were used to reveal the bacterial community present in the SS-active essay because the evidence of sulfate-reducing activity was verified by the results mentioned above (sulfate removal and sulfide accumulation). The microbial communities of the SS-active essay were then analyzed by Illumina high-throughput sequencing. The media coverage contracted for the SS-active essay was 20,000 reads/sample, with an average paired-end fragment after quality analysis of 448 bp, on days 11 (log phase start) and 30 (log phase end).

Based on the genera found during the days of operation, the top 20 most abundant bacteria are shown in Figure 27 (more information and numbers on relative abundance can be seen at APÊNDICE A). The most abundant genus on day 11 was *Citrobacter*, belonging to Proteobacteria, followed by *Klebsiella*, *Clostridium*, and *Serratia*.

**Figure 27.** Relative abundances at the genus level based on bacterial 16S rRNA gene classification of specimens with the highest number of sequences detected.





On day 30, the most abundant genus was *Clostridium*, followed by *Enterobacter*, *Fonticella*, and *Citrobacter*. The other genera had low relative abundance values. Thus, a relative abundance of only 0.09% on day 11 and 1.05% on day 30 was found for *Desulfosporosinus*, a known SRB. In relation to the most abundant genera found on day 11, *Citrobacter*, a facultative anaerobe Enterobacteriaceae family of bacteria that grows readily on ordinary media (FREDERIKSEN, 2015), has been reported to be able to reduce sulfate and produce H<sub>2</sub>S (ZHANG; WANG, 2016). Considering it does not belong to the traditional group of SRB, its sulfate-reduction ability has not been studied extensively (QIU et al., 2009; ZARASVAND; RAI, 2016). Sulfide production is widespread among Enterobacteriaceae; however, *Citrobacter* is the only organism that can reduce sulfate (ZARASVAND; RAI, 2016). *Citrobacter* sp. were isolated from a mining area in China and were discovered in cooperation with SBR on steel surfaces, forming a biofilm and producing H<sub>2</sub> (QIU et al., 2009). Another species (*Citrobacter freundii*) with chitin-degrading activity and a chitinase gene was isolated from gastrointestinal microbiota of fish (XU et al., 2016). Chitinase is an enzyme that is able to break down the glycosidic bonds of chitin, which is the source of carbon used in this experiment. Zarasvand and Rai (2016) stated that the isolation of *C. freundii* with sulfate-reducing capabilities shows that the diversity of SRB still has potential to be expanded. They considered strains of *Citrobacter* to be sulfate-reducing bacteria because of the sufficient amount of sulfides produced. The dissimilatory sulfite reductase (dsr) gene was detected in strain of *Citrobacter* sp. (ZARASVAND; RAI, 2016; ZHANG et al., 2015).

The most abundant genus on day 30 was *Clostridium*, which had greatly increased since day 11. These bacteria, belonging to Filo Firmicutes, are syntrophic anaerobic fermentative and can produce H<sub>2</sub>, acetate, ethanol, and lactate; some are potential pathogens (RAINEY; HOLLEN; SMALL, 2015). *Clostridium* can use hexose during fermentation (MADIGAN et al., 2016), the monomer of chitin, and is a chitinase producer (*Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium* isolated from the rumen of cows, rapidly degrades chitin and shrimp carapace) (CLARKE; TRACEY, 1956; COBOS; YOKOYAMA, 1995; ZHU; ZHOU; FENG, 2007). Based on literature, *Clostridium* occurs in the bacterial community related to AMD bioremediation (MARTINS et al., 2011) and in enrichments of acidic sediment of MIW (FLORENTINO et al., 2015). Despite being a fermentative genus, it is also considered to be a SRB or able to carry out sulfate reduction (BAO et al., 2012, 2017; RODRIGUEZ et al., 2016; SALLAM; STEINBÜCHEL, 2009). Most SRB belong to 23 genera within Deltaproteobacteria, followed by the gram-positive SRB within Clostridia (MUYZER; STAMS, 2008). Pokorna and Zabranska (2015) highlighted that there is no competition between SRB and rapidly growing

fermentative bacteria. Based on similar experiments, it was reported that *Clostridium* species may provide electron donors that are utilized by *Desulfosporosinus* (KUMAR et al., 2014).

Traditional SRB found in this study was *Desulfosporosinus*. Together with *Sedimentibacter*, they belong to the phylum Firmicutes and clostridia class, respectively (HIPPE; STACKEBRANDT, 2015; LECHNER, 2015) and were found in very minute amounts on day 11 and in slightly larger amounts on day 30. Both were detected in a sulfidogenic fixed-bed bioreactor; genus *Desulfosporosinus* dominated (BATTAGLIA-BRUNET et al., 2012).

*Desulfosporosinus*, a spore-forming curved rod, strictly anaerobic bacterium (HIPPE; STACKEBRANDT, 2015) and moderately acidophilic SRB, was isolated from MIW sediment with low pH and high dissolved metal ion concentrations (ALAZARD et al., 2010; FLORENTINO et al., 2015; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013, 2015; WEI et al., 2014) and from a MIW sediment with a pH range of 3.0–3.9, coexisting with *Clostridium* (BAO et al., 2017). Its low relative abundance may be linked to the neutral pH of the system. Although SRB represent only a small portion of the bacterial population of AMD, it is in agreement with the literature (less than 0.5% of SRB) (BOMBERG; ARNOLD; KINNUNEN, 2015). *Sedimentibacter* sp., whose name originated from sediments (LECHNER, 2015), was detected in sediments of a highly acidic river (Tinto, Spain; in addition to *Desulfosporosinus* and *Clostridium*) (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2012b) and used to treat AMD with high metal concentrations (ZHANG; WANG; HAN, 2016).

Other detected genera were *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia*. They are facultative anaerobes, gram-negative  $\gamma$ -Proteobacteria belonging to the family Enterobacteriaceae (enteric bacteria). They are also fermenters and have been associated with sewage from diverse industrial effluents (RODRIGUES et al., 2009), potential pathogens (MADIGAN et al., 2016; WEI; YU; ZHANG, 2015), and chitinase producers (CLARKE; TRACEY, 1956; WATANABE et al., 1997; ZHANG et al., 2017a; ZHU; ZHOU; FENG, 2007). These genera can remove heavy metals from a variety of sources, for example, at petroleum-contaminated sites (SARKAR et al., 2017) used for biodesulfurization (MARTÍNEZ et al., 2017). *Klebsiella* and *Clostridium* use hexose for fermentation (MADIGAN et al., 2016) and are very abundant on day 11, although a decrease was observed on day 30. *Klebsiella* reduction may indeed have a positive effect on the treatment due to its pathogenic potential.

Based on the high-throughput 16S rRNA high-throughput sequencing analyses of this study, the *Clostridium* genus shows a greater abundance at the end of log phase. Novel high-throughput technologies might increase the success of identifying different novel SRB; although we have a huge amount of information about SRB, we only “scratched the surface”

(MUYZER; STAMS, 2008). Nowadays, it is possible to detect microorganisms that may have not been identified before, which might indicate that a newly detected type of bacteria has always been a SRB with high activity potential. The results of this study also confirm the relationship between SRB and fermentative bacteria (or chitinase producers), suggesting a synergistic interaction between them. Some researchers (DEV; ROY; BHATTACHARYA, 2016; POKORNA; ZABRANSKA, 2015; ZHANG; WANG; HAN, 2016) pointed out that SRB are unable to break down complex organic substances. As a result, the observed diverse bacterial community structure and functional role of the corresponding partners could be the reason for the effectiveness of this bioremediation process (MARTINS et al., 2011).

Methanogenic species were not detected, which agrees with the absence of methane in the analyses. Although methanogenic bacteria must coexist with SRB under anaerobic conditions based on literature, sulfate-reduction is kinetically and thermodynamically more favorable than methanogenesis in the presence of adequate sulfate concentrations and for simple substrates (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014; SUN et al., 2014). Moreover, sulfides are well-known inhibitors of methanogenesis (CAMILOTI et al., 2014) but the experiment time was too short for this group of methanogenic bacteria to develop. Methanogenic bacteria could negatively influence SRB because they compete for the same electron donor.

#### **4.1.4. Conclusions**

- Shrimp shell, a low-cost residue, proves to be adequate chitin source for MIW treatment with respect to the removal of sulfate,  $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  ions: SS is an adequate SRB biostimulation substrate and electron donor under the studied conditions, achieves a very high sulfate removal via sulfide formation, and allows the removal of metal ions via precipitation of metallic sulfides. The carbonates in the SS cause a pH increase to neutrality, which is adequate for microbiological development. In addition, SS is an abundant and low-cost waste material, which is available in large quantities due to the processing of the fishing industry in the SC State. The MIW treatment methodology adds value to a residue (SS) whose uncontrolled disposal usually generates environmental problems, providing to the process sustainability.

- In the conditions tested, contrarily to the established in the literature for chitin, the CHIT essay was inadequate for the complete development and establishment of SRB and, consequently, to achieve adequate MIW treatment, demonstrating the importance of the pH for the SRB development and removal of sulfate and metal ions.

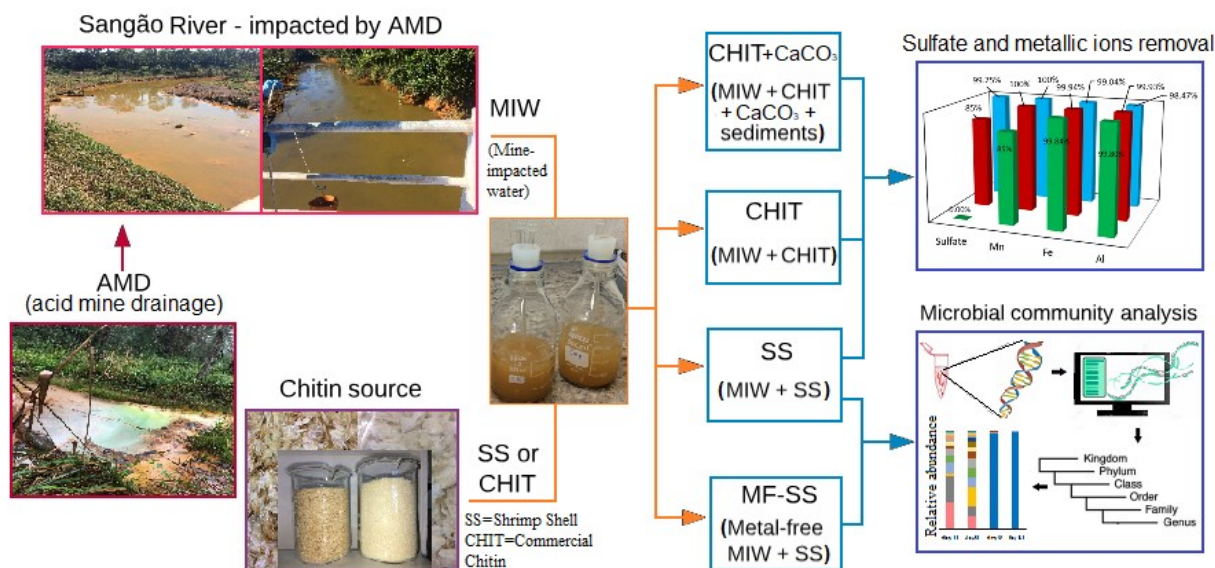
- The  $\text{Fe}^{2+}$  ion is adsorbed by the sediment; the process follows pseudo-second order kinetics.

- Although SRB was detected (*Desulfosporosinus*), it was not the most abundant bacteria. *Citrobacter* and fermentative *Clostridium* were most abundant in the beginning and at the end of the log phase, respectively. Both species are endorsed in the literature: *Citrobacter* reduces sulfates and there is evidence of *Clostridium* being a SRB. Thus, both of the bacteria seem to be key players in the anaerobic degradation of sulfate. There might be a possible synergic relation between SRB and fermentative bacteria. Furthermore, the detected bacteria, which produce chitinases (*Citrobacter*, *Clostridium*, *Serratia*, *Klebsiella*, and *Enterobacter*), form the majority, indicating the cooperation in degrading chitin and thus synergistic interactions between SRB and fermentative (or chitin degrader) bacteria. Therefore, revealing diverse microbial communities will provide new insights in the relationship between the genera found in this work.

In order to verify the occurrence of sulfate-reducing activity, other strategies varying conditions, such as no sediment addition, previous removal of metals in solution and check other factors that diverge from the established for chitin (not) being suitable substrate for SRB are described in next article.

## 4.2. Artigo 2<sup>6</sup> - Biostimulation of sulfate-reducing bacteria and metallic ions removal from coal mine-impacted water (MIW) using shrimp shell as treatment agent

### RESUMO GRÁFICO:



### ABSTRACT

This paper comprises several assays aiming to identify the basis for the bioremediation of mine-impacted water (MIW). To do so, the conditions for build anoxic microcosms for treating this effluent were varied, containing MIW, and a source of chitin, to biostimulate sulfate-reducing bacteria (SRB). The chitin sources were: commercial chitin (CHIT) and shrimp shell (SS) waste, which in addition to chitin, contains CaCO<sub>3</sub>, and proteins in its composition.

<sup>6</sup> Este artigo deu origem à seguinte publicação:

Journal of Hazardous Materials 398 (2020) 122893



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)



Biostimulation of sulfate-reducing bacteria and metallic ions removal from coal mine-impacted water (MIW) using shrimp shell as treatment agent



Caroline Rodrigues<sup>a,\*</sup>, Dámaris Núñez-Gómez<sup>a</sup>, Hioná V. Dal Magro Follmann<sup>a</sup>,  
D. D. Silveira<sup>a</sup>, Maria Eliza Nagel-Hassemmer<sup>a</sup>, Flávio R. Lapolli<sup>a</sup>, María Ángeles Lobo-Recio<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Department of Energy and Sustainability, UFSC, 88906-072, Araranguá, SC, Brazil

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122893>

The CHIT assays were not successful in sulfate-reduction, even when the pH was increased with CaCO<sub>3</sub>. However, in all SS assays the SRB development was successful (85% sulfate removal for assay 3), including the metal-free (MF-SS) assay (75% for assay 5). High-throughput sequencing analysis revealed the structure of bacterial community in the SS assay: the most abundant genera were *Clostridium* and *Klebsiella*, both fermentative and chitinase producers; a few SRB from the genera *Desulfovibrio* and *Desulfosporosinus* were also detected. In the MF-SS assay, *Desulfovibrio* genus was detected but *Comamonas* was dominant. It could be deduced that SS is a suitable substrate for SRB development, but CHIT is not. The sulfate-reduction process was provided by the cooperation between the consortia of fermentative/chitinase-producer bacteria together with SRB, which leads to efficient MIW treatment, removing sulfate and metallic ions.

**Keywords:** Coal mining contamination; Bioremediation; Chitinous materials; Sulfate removal; Bacterial community structure.

## RESUMO

Este trabalho é a continuação e o fechamento de um estudo que objetivou identificar as bases para biorremediação de AIDAM (água impactada com drenagem ácida de mineração), um efluente extremamente ácido, rico em sulfato e íons metálicos dissolvidos, de alto potencial poluidor. Para fazermos isto, foram variadas diversas condições na construção de microcosmos anóxicos para tratamento deste tipo de efluente, contendo basicamente: a AIDAM e uma fonte carbônica de quitina, usada para bioestimular o desenvolvimento de BRS (bactérias redutoras de sulfato). As fontes de quitina foram: quitina comercial (QUIT) e resíduos de casca de camarão (CC), que além da quitina, contêm CaCO<sub>3</sub>, proteínas e outros componentes em sua composição. Os ensaios com QUIT não obtiveram êxito nas remoções de sulfato e íons metálicos, mesmo quando o pH foi elevado com adição de CaCO<sub>3</sub> visando obter um meio mais adequado para o desenvolvimento de BRS. Entretanto, nos ensaios com CC obteve-se sucesso no desenvolvimento de BRS (85% de remoção de sulfato para o ensaio 3), inclusive no ensaio livre de metais (MF-*metal-free*, ensaio 5, com 75% de remoção de sulfato), que consistiu em AIDAM que passou por um processo prévio de remoção de íons metálicos. Foram feitas análises de sequenciamento *high-throughput*, que revelaram a estrutura da comunidade bacteriana e sua respectiva abundância relativa em termos de gênero nos microcosmos: *Clostridium* e *Klebsiella*, ambas fermentadoras e produtoras de quitinase foram as mais abundantes, e algumas BRS do gênero *Desulfovibrio* e *Desulfosporosinus* foram detectadas nos

microcosmos com SS. No ensaio livre de metais, *Desulfovibrio* foi detectada e *Comamonas* predominou. Em consequência, pode ser deduzido que QUIT não é um substrato adequado para o desenvolvimento de BRS, mesmo em pH neutro. Em contraste, os outros componentes da CC (além da quitina) devem contribuir para o desenvolvimento bacteriano, propiciando uma cooperação no consórcio microbiano entre bactérias fermentadoras/produtoras de quitinase e as BRS, que levou a um eficiente tratamento da AIDAM, removendo sulfato e íons metálicos.

**Palavras-chave:** Contaminação por mineração de carvão; biorremediação; materiais quitinosos; remoção de sulfato; estrutura da comunidade bacteriana.

Transcrição adaptada do Artigo:

#### 4.2.1. Introduction

Coal extraction and processing are some of the main economic activities in southern Santa Catarina (SC) State, Brazil (MACAN et al., 2012). As a consequence, this region known as the Carboniferous Basin of SC, has suffered environmental degradation due to the acid mine drainage (AMD) release, an acid effluent rich in dissolved metallic ions and sulfate. This release contaminates surface and groundwater (FRIPP; ZIEMKIEWICZ; CHARKAVORKI, 2000), producing what is known as mine-impacted water (MIW), causing one of the most severe environmental issues in the global mining industry (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015; MOREIRA et al., 2017), that can persist for centuries (SKOUSEN et al., 2017). Studies (BUZZI et al., 2013) indicate that SC State has an environmental liability of approximately 200 million ton of coal wastes which results in thousands cubic meters of AMD that, in turn, generate an exceptional amount of MIW. The circulation of MIW inhibits the growth of vegetation and causes the disappearance of well-established vegetal cover (NAME; SHERIDAN, 2014). The MIW can exert several direct and indirect negative effects on water courses, and some of them are compiled in Table 11.

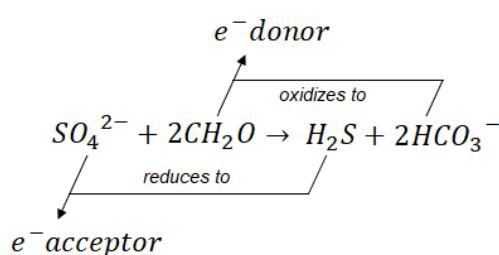
**Table 11.** MIW main effects.

Chemical	Physical	Environmental
Increased acidity	Increased turbidity	Ecotoxicity
Destruction of buffer systems ( $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{HCO}_3^-$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , etc.)	Reduction of light penetration	Death of sensitive species
Heavy metals leaching	Increased sedimentation	Habitat modification
Increased sulfate	Increased osmotic pressure	Changes in the food chain
	Adsorption of heavy metals in sediments	Bioaccumulation and biomagnification

Source: (BECERRA et al., 2009; SANTOS; JOHNSON, 2017).

Anaerobic bioremediation using sulfate-reducing bacteria (SRB) has been considered a promising process for treating this type of effluent (AL-ABED et al., 2017; PINTO; AL-ABED; MCKERNAN, 2018; ZHANG; WANG, 2014). The SRB are anaerobic microorganisms capable of dissimilatory sulfate reduction, increasing the pH and alkalinity, as well as immobilizing metallic ions, in the presence of a biodegradable organic carbon source (RODRIGUES et al., 2019) (Figure 28). This reduction process is coupled to energy conservation, as calculated by the Gibbs free energy (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2014).

**Figure 28.** Sulfate reduction is a redox reaction that with the energy source coming from the organic compound oxidation, reduces sulfate to hydrogen sulfide.



$CH_2O$  generically represents an organic compound, that is, the available substrate to heterotrophic SRB. The chitin, as well as proteins, are huge organic molecules, being linked by glycosidic and peptide bonds, respectively, and SRB cannot use them directly as substrate. To accomplish this, molecules need to be broken into shorter chain compounds, to become readily available to SRB (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a), highlighting thus the dependence of SRB on other microorganisms, like fermentative bacteria (MUYZER; STAMS, 2008).

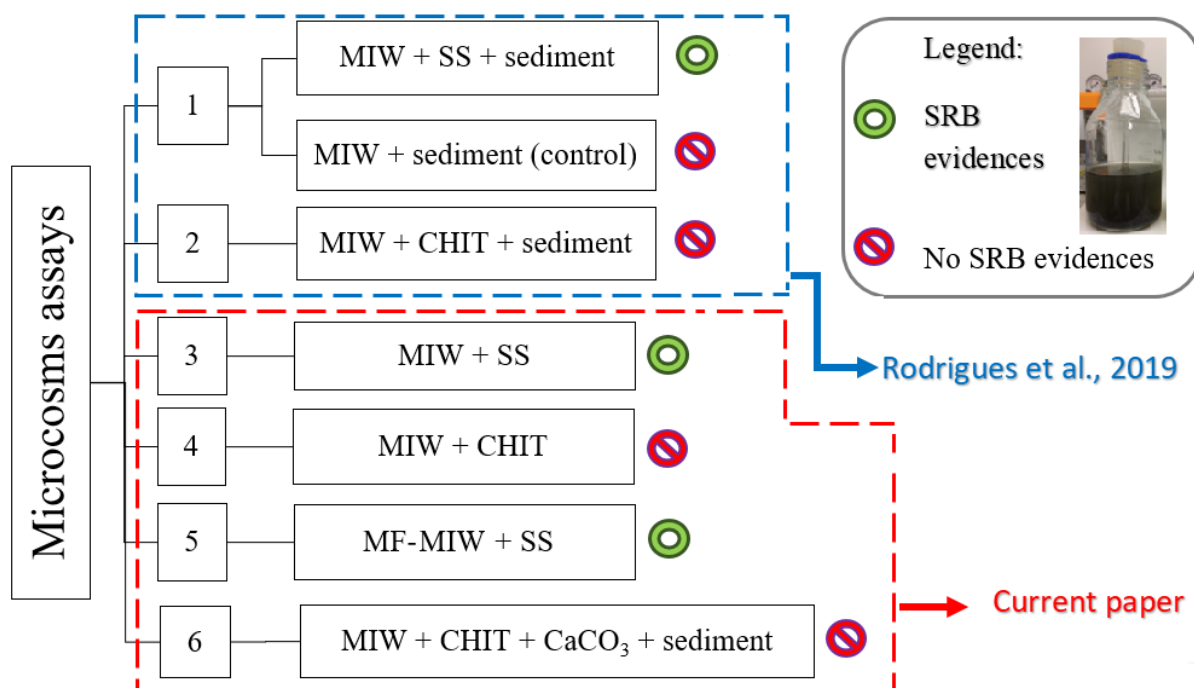
This synergistic interaction between microbial consortia could be the reason for the effectiveness of this bioremediation process (MARTINS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2019). It is also discussed the possibility of some fermentative bacteria (like *Clostridium*) being also considered SRB (or at least having a strict connection with the sulfate reducing process) (BAO et al., 2012, 2017; RODRIGUEZ et al., 2016; SALLAM; STEINBÜCHEL, 2009; ZHAO et al., 2016).

Several studies (DAUBERT; BRENNAN, 2007; ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a, 2010, 2011) used satisfactorily chitinous material as substrate, as our research used the shrimp shell (SS). This residue is abundant in our region, available in large quantities from the fishery industry, whose production in 2018 was 311.8 ton in the SC State (EPAGRI; CEPA, 2019). According to works (PINTO; AL-ABED; MCKERNAN, 2018; RØDDE; EINBU; VÅRUM, 2008), the SS composition is approximately: 17%–20% chitin, 33%–40% proteins, 32%–38% mineral salts (mainly calcium carbonate –  $CaCO_3$ ), 7% moisture, and 3% ash.



Studies (DAUBERT; BRENNAN, 2007; ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a, 2009b) report that the chitin fermentation creates reducing conditions that can sustain anaerobic and reductive processes (because of its C:N ratio 6.9:1). Recent investigation (AL-ABED et al., 2017) points out that besides the chitin, the protein can also serve as an electron donor in the sulfate reducing process. Hence, it remains unclear about the ideal substrate for sulfate reduction. Our previous study (RODRIGUES et al., 2019) (dotted in blue in Figure 29), successfully used SS as substrate for SRB development in microcosm flasks for treating MIW. A parallel assay was carried out using CHIT as substrate (pH = 4.29), and SRB development was not evidenced. Control flasks were also tested (without addition of SS and consequently no pH elevated) and again did not present evidence of sulfate-reducing activity. The hypothesis that the low pH was the responsible for the non-development of such bacteria was raised, thereby grounded in the literature (GREMBI; SICK; BRENNAN, 2016; LIU; GONG; LIU, 2014; ĆANCUCHEO; JOHNSON, 2014; SHARMA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2016).

**Figure 29.** Integrated scheme of the different assays performed. MIW: mine-impacted water; SS:shrimp shell; CHIT: commercial chitin; MF-MIW: metal-free MIW by shrimp shell sorption removal.



Several questions were raised: how does the (i) sediments (SRB inoculum), (ii) pH and (iii) presence/absence of metallic ions influence the SRB development? Is the chitin an adequate substrate for SRB, or the chitinous composition of shrimp shell (chitin + proteins + minerals +

pigments)?

To establish the solution, the present study performed several sorts of assays, in order to evaluate which factors are influencing the SRB development. Several conditions were varied: the source of chitin (shrimp shell or commercial chitin – SS or CHIT); the addition or absence of sediments (inoculum); the removal or presence of metallic ions in solution; neutralization or not of the pH, as schematized in Figure 29. In assays 3 and 5, the initially low MIW pH was elevated due the calcium carbonate presence coming from the SS. In assay 4, the pH was not elevated, and consequently no evidence of sulfate reduction was observed. Therefore, assay 6 consisted of CHIT together with CaCO<sub>3</sub>, since CHIT alone was not successful in the sulfate-reduction. Thus, this paper aimed to close these hypotheses regarding this SRB biostimulation on MIW treatment.

Once sulfate reduction was physically and chemically established (assays 3 and 5), samples were collected and the structure of the bacterial community was analyzed. The objective of the analysis was to identify the bacteria present in the system and their relationship with the sulfate reduction and MIW treatment process.

#### **4.2.2. Materials and methods**

No benthic sediments were used in the assays 3, 4, and 5, in contrast with the previous study (RODRIGUES et al., 2019), in order to determine if the river has enough inoculum. MIW and metal-free MIW were used as waters to be treated with the intent to compare the treatment efficiency and bacterial community structure. In assay 6, sediments together with CHIT and calcium carbonate were added, revealing the key factor for biostimulating SRB in microcosms.

##### ***4.2.2.1. Sampling and characterization of MIW***

The MIW was obtained from the Sangão River, in the Carboniferous Basin of SC State (28°45'38.7"S 49°25'58.1"W). The samples were collected in non-sterile polypropylene bottles with no headspace and kept at 4 °C. They were filtered through a 0.45 µm membrane and characterized on the same day that they were collected for the following parameters of interest: pH, Fe, Al<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sup>2-</sup>, chemical oxygen demand (COD), non-purgeable organic carbon (NPOC), and dissolved oxygen (DO). Analytical techniques and equipment were described previously (Tabela 6), adapted from *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

The benthic sediments were collected in an abandoned coal mine (28°29'19.7"S

49°22'58.1"W), whose environment is a promising source of SRB (FLORENTINO et al., 2015). The aliquots were transported in sterile falcon tubes and kept at 4 °C (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a).

#### **4.2.2.2. SS and CHIT processing**

The SS's were acquired from fish markets and physically processed as described elsewhere (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a) to create the SS treatment agent. The CHIT consisted of chemically treated chitin flakes with 70% purity (*Polymar Ciência e Nutrição S/A*), pulverized in the blender and sifted. Unique for the assay 6, 0.6 g of CaCO<sub>3</sub> (neutralizing agent) was added to each 2.0 g of CHIT, with the aim of reaching a similar composition to SS.

#### **4.2.2.3. Microcosms flasks setup**

To evaluate the potential of SRB for MIW bioremediation, experiments building up microcosms were performed, as proposed in the methodology of Robinson-Lora and Brennan (2009a). This biostimulation was prepared in glass flasks (500 mL of capacity), together with MIW purged with N<sub>2</sub> (until DO ≤ 0.5 mg·L<sup>-1</sup>), and a carbon source.

Four sets of microcosms (70 microcosms total) were prepared, where three sets (20 microcosms each) contained 10 g·L<sup>-1</sup> of chitin (2.6 g per flask of SS, CHIT, or CHIT+CaCO<sub>3</sub>) and 260 mL of MIW, named assays 3, 4, and 6. The fourth set of microcosms (10 microcosms) was analogously prepared, but a metal-free (MF) MIW was used, named assay 5 (Figure 29). To obtain this last set, a contact assay of MIW with SS in air atmosphere for metallic ions adsorption was performed, following the best conditions (48 h contact time, 188 rpm agitation, and 8.975 g·L<sup>-1</sup> SS dosage) determined in previous Núñez-Gómez studies (2014; 2017a). After filtration, 260 mL of the MF-MIW obtained were introduced in each of the 10 flasks, N<sub>2</sub> purged and 2.6 g of SS per flask were added.

All the microcosm flasks were again purged with N<sub>2</sub>, sealed with a silicone stopper, and kept in a dark room at 20 °C (controlled with a wall thermometer). They were shaken manually once a day, to ensure homogeneity and their contents were analyzed at predetermined times (1, 2, 7, 9, 11, 17, 21, 28, 31, and 42 days), based on the kinetic development of SRB (ROBINSON-LORA; BRENNAN, 2009a). In assay 5, as the metallic ions were not monitored, fewer analyses were done (on days 7, 9, 20, 29, and 41). Before being analyzed, the microcosm contents were filtered through a 0.45 µm membrane inside a fume hood with an N<sub>2</sub> atmosphere. Every experiment was performed in duplicate to minimize experimental error and overcome any

potential discrepancies of the biological system. The parameters of interest (soluble Fe, Al, Mn,  $\text{SO}_4^{2-}$ , and  $\text{S}^{2-}$ ) were analyzed with spectrophotometric lecture (Tabela 6).

The methane was not measured, and several reasons made us believe that methanogenic bacteria were not present: (i) methane was not detected in our previous work (RODRIGUES et al., 2019); (ii) SRB are kinetic and thermodynamically in advantage over the methanogenic (LIU et al., 2014; SUN et al., 2014); and (iii) SRB outcompete methanogens (BIANCO et al., 2020) can be mentioned.

#### ***4.2.2.4. Statistical analysis***

Sulfate removal data for assays 3 and 5 (i.e. those who presented biological sulfate reduction) were evaluated through a completely randomized design (CRD). This is a statistical treatment indicated for homogenous experiments (where environmental effects are easily controlled), that admits any difference among each them to be considered as experimental error (FAO, 1999). In this case, the CRD was made up of one dependent variable (% sulfate removal), and one factor (microcosm assay). An analysis of variance (ANOVA) was generated from sulfate removal data from microcosm assays 3 and 5, at the end of the period (42 and 41 days, respectively). The statistical analysis was done with the R software (v3.6.3, 2020), and  $p$ -value less than 0.05 was considered to indicate statistical difference, at a 95% confidence level.

#### ***4.2.2.5. Microbial community analysis***

To evaluate the bacterial community involved in the sulfate-reduction, four samples were extracted during the operation of two assays: from the SS assay (3) during days 11 and 31, and from the MF-SS assay (5), during days 9 and 41 (start and end of log phase, respectively). The collected samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the moment of the analysis.

Bacterial identification was performed via high-throughput sequencing of the V3/V4 regions of the 16S rRNA gene. Qualitative and quantitative results (a form of relative abundance) were obtained for the bacterial community in the samples. The preparation of the libraries followed the proprietary protocol (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil) described below. The primers used were 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QIAN, 2009) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO et al., 2011). The libraries were sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) with the V2 Kit and 300 paired-end nucleotides; 20,000 reads were performed. The PCR (polymerase chain reaction) reactions were carried out in triplicate using Platinum Taq (Invitrogen, USA)

according to the manufacturer's instructions (CHRISTOFF et al., 2017).

After sequencing, bioinformatics filtering pipeline developed by the company was used to analyze the sequences and generate results that were subjected to taxonomic classification comparing them with 16S rRNA 119 SILVA database (QUAST et al., 2013). Only the representative sequences with hits of 99% of identity in an alignment covering over 99% were considered. The data for relative abundance construction were processed using specialized bioinformatics software (Epiome®) and loaded onto a specific platform for analysis and interpretation of results (CHRISTOFF et al., 2017).

### 4.2.3. Results and discussion

#### 4.2.3.1. MIW characterization and treatment

The initial characterization of MIW parameters of interest is shown in Table 12. The maximum allowable value (MAV) was based on the Brazilian environmental legislation for non-potable water use (Class III), from CONAMA Resolution 357/2005 (BRASIL, 2005). Complementarily, CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011), which provides conditions and standards for effluent discharge, was also considered as a supplementary reference. All metallic ions and sulfate showed significant higher concentration than the MAV (except for sulfate in collection 3), showing the impact over the treatment.

**Table 12.** MIW analytical data for the initial condition assay.

Parameter	Collection 1 <sup>a</sup>	Collection 2 <sup>b</sup>		Collection 3 <sup>c</sup>	CONAMA 357 (MAV) <sup>d</sup>	CONAMA 430 <sup>e</sup>
		Before Pre-treatment	After			
pH	3.11	3.02	7.90	3.37	6-9	5-9
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	400	540	540	220	250	-
Fe <sub>t</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	49.2	54.8	0.14	18.4	5	15
Mn <sup>2+</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	2.0	3.2	0.1	2.0	0.5	1.0
Al <sup>3+</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	22.8	24.6	0.034	14.32	0.2	-

<sup>a</sup> Used for SS and CHIT assays (3 and 4).

<sup>b</sup> Used for MF-SS assay (5), before and after pre-treatment (metallic ion removal).

<sup>c</sup> Used for CHIT + CaCO<sub>3</sub> assay (6).

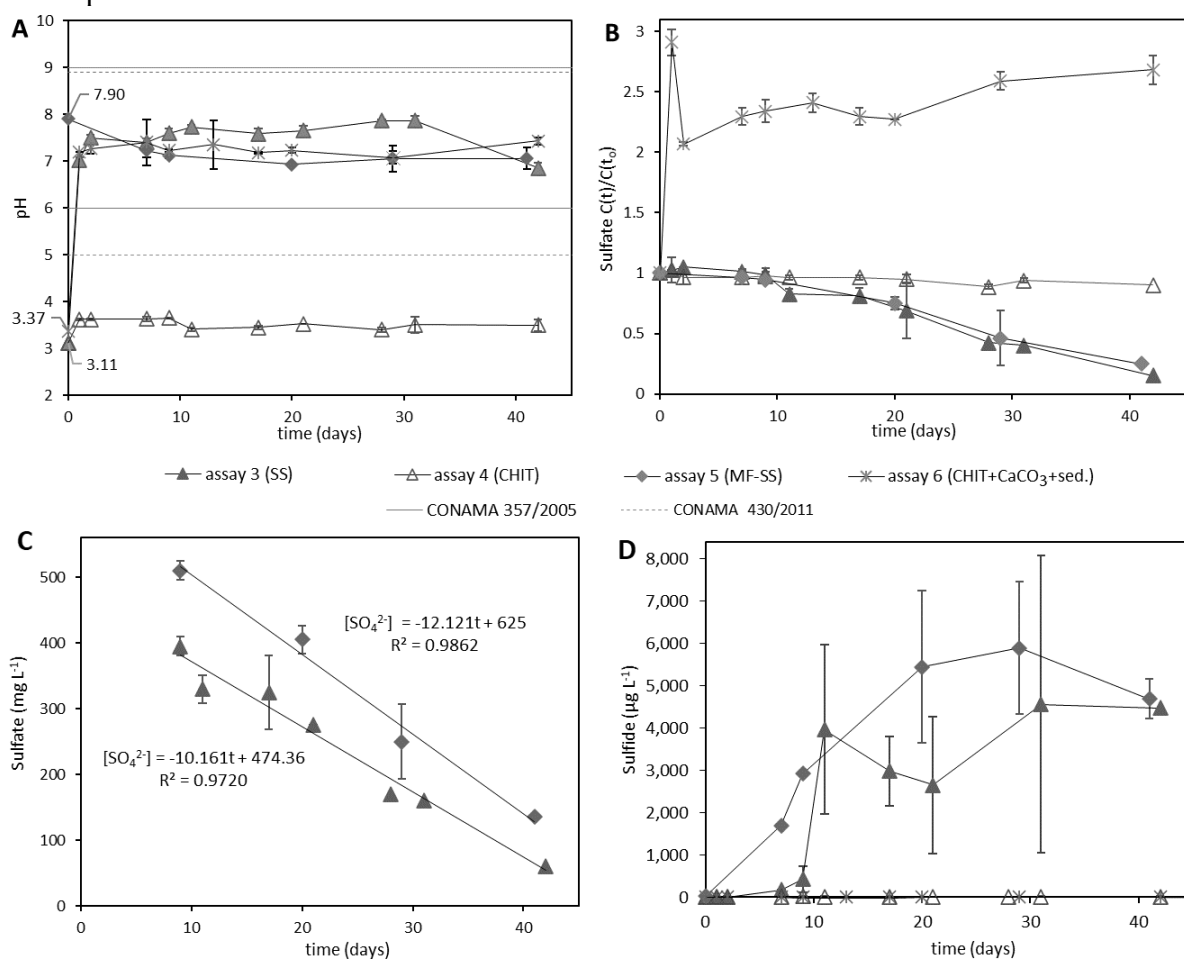
<sup>d</sup> Maximum allowable values for Class III water, adequate for non-potable reuse (BRASIL, 2005).

<sup>e</sup> Brazilian conditions and standards of effluent releases (BRASIL, 2011).

The results for non-purgeable organic carbon and COD were 0 and 36 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. However, COD might have been overestimated because MIW contains high

metallic ions concentrations (such as  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ ), and they can interfere with the results (can be oxidized in the dichromate digestion). Therefore, only organic carbon was considered (0), and this was expected, since a dead river usually presents no life forms and organic matter. As such, assuming that MIW contains very low/no organic matter, a source of carbon (chitin) was added.

**Figure 30.** (A) pH variation over time in the microcosms for SS, CHIT, and MF-SS assays. (B) Variation of sulfate concentration over time for SS, CHIT, MF-SS and CHIT- $\text{CaCO}_3$ -sediments assays. (C) Sulfate decay rate for SS and MF-SS from (approximately) the start to the end of the log phase. (D) Sulfide in solution measured over time for SS, CHIT, CHIT- $\text{CaCO}_3$ , and MF-SS assays. The data points of all graphics represent duplicate average values, and the error bars represent the standard deviation.



pH variations over time for the four microcosm sets are shown in Figure 30A. For assay 3 (MIW + SS), the initial pH (3.11) increased, reaching neutrality after one day, and the average pH of the entire period was  $7.51 \pm 0.33$ , in accordance with MAV. This increase of alkalinity was caused by the  $\text{CaCO}_3$  in the SS. The same happened to assay 6 (MIW + CHIT +  $\text{CaCO}_3$  + sediment): pH raised from 3.37 to 7.19 in the same period, with an average of  $7.28 \pm 0.12$ , both

because of the  $\text{CaCO}_3$  added. Assay 3 presented the same behavior of assay 1 (RODRIGUES et al., 2019): after only one day a plateau was reached and then average pH was between 7.15 and 7.51. Nevertheless, in assay 4 (MIW + CHIT), pH did not suffer considerable changes, due to the absence of carbonate, being stagnant at an average of  $3.53 \pm 0.11$ . For assay 5 (MF-MIW + SS), initial pH was 7.90 because of the previous SS contact assay for the removal of metallic ions, and the pH remained at an average of  $7.21 \pm 0.34$ .

In assay 4, sulfate removal was minimal, reaching only 10% after 42 days, remaining at an average of  $382.73 \pm 15.71 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  throughout the experiment (Figure 30B). However, in assay 3, sulfate removal was reasonable: 85% average during the same period. From day 28 on, the sulfate concentration was already in accordance with MAV (BRASIL, 2005). In assay 5, sulfate removal was also detected, and so SRB development was deduced. Based on assay 3, data from days 9 to 42, the average rate of sulfate reduction (slope of the fitting curve) was calculated as  $10.161 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (Figure 30C). For assay 5, sulfate removal reached 75% over similar period, and the removal rate was  $12.121 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . These rates were similar to the ones provided by Robinson-Lora and Brennan (2009a). Due to the proximity of sulfate removal provided by assays 3 and 5 (85% and 75%, respectively), CRD was performed to check statistical difference between them, and the ANOVA demonstrated they differ statistically ( $p = 2 \times 10^{-16}$ ).  $F_{\text{Calculated}}$  was higher than  $F_{\text{Tabulated}}$ , indicating that this statistical analysis is valid, at the 95% confidence interval (Table 13).

**Table 13.** Analysis of variance for sulfate removal for assays 3 and 5.

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b><math>F_{\text{calculated}}</math></b>	<b><math>F_{\text{tabulated}}^{\text{a}}</math></b>	<b><math>p</math></b>
Treatment	1	100	100	$1.264 \times 10^{31}$	18.51	$2 \times 10^{-16}$
Residuals	2	0	0			

<sup>a</sup> Tabulated values for a 95% confidence level (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978a);

DF: degrees of freedom;

SS: sum of squares;

MS: mean square;

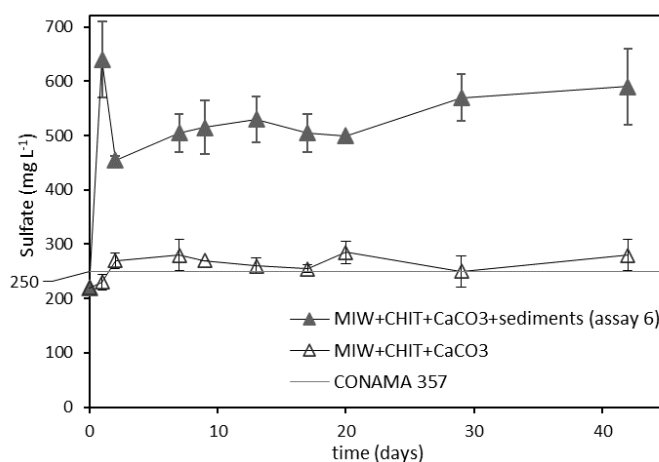
$F$ : factor F,

$p$ : probability.

Sulfate from assay 6, initially  $220 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , had an increase in the following day to  $640 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , probably because of the sediment content, that is from an abandoned mine, with high sulfate concentration. This concentration oscillated from 455 to  $590 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  over time, therefore, no significant sulfate removal was detected. Furthermore, no dissolved hydrogen sulfide was detected in the microcosms from this assay, and combining the fact that the flasks remained unchanged throughout the experiment (no black color formation no pungent smell), this assay

presented no evidences of sulfate-reduction, as well as no MAV accordance for the sulfate standard. These results demonstrate that CHIT is not enough as carbon source for the development of the SRB, even with carbonate added to attain an adequate pH for these bacteria. In parallel to assay 6, a similar assay without sediment (CHIT+MIW+CaCO<sub>3</sub>) was also carried out, and very similar results were observed: no biological sulfate removal (Figure 31).

**Figure 31.** Variation of sulfate concentration over time for assay 6 and a similar assay without sediment (CHIT+MIW+CaCO<sub>3</sub>): both experiments did not present sulfate removal. The data points represent duplicate average values, and the error bars represent the standard deviation.



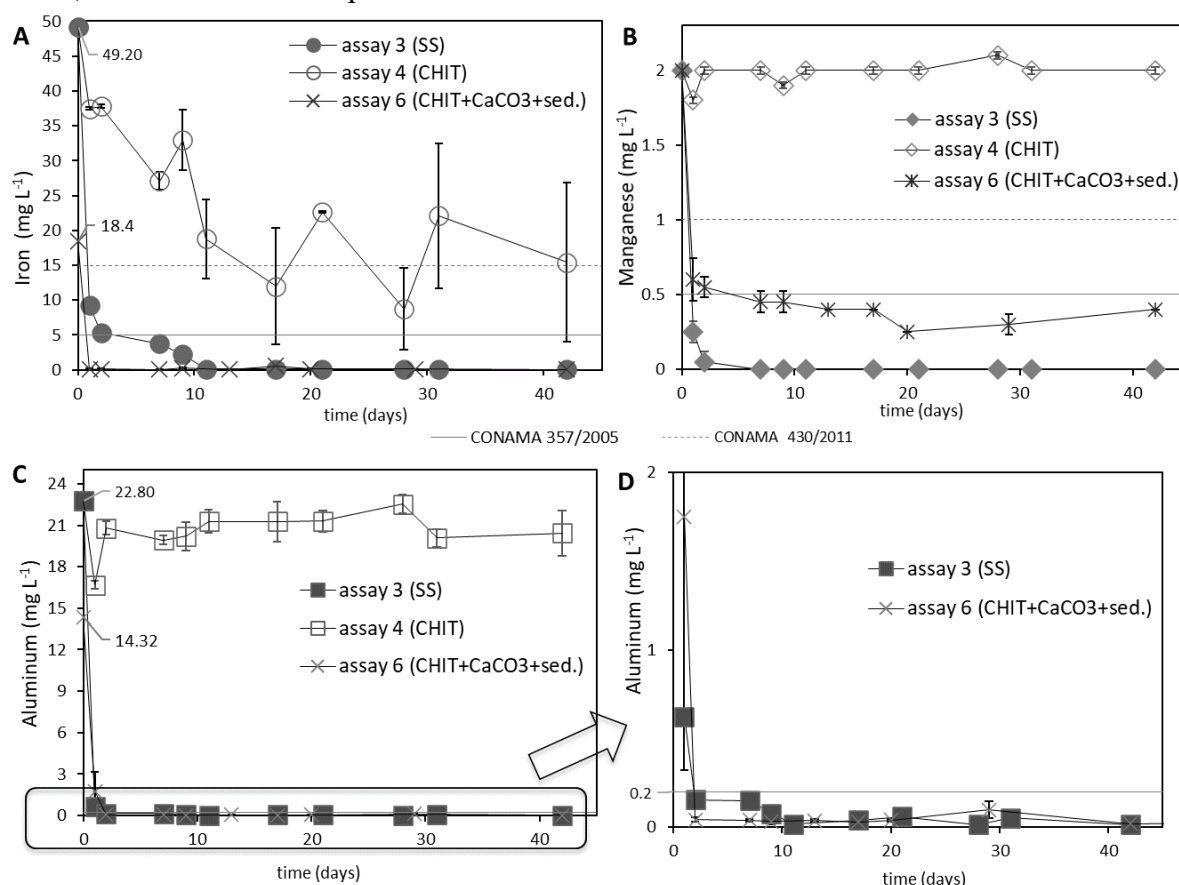
In contrast, according to the assay 3, the high sulfate removal must be directly related with the presence of SRB. Thus, other components of SS, in addition to chitin, are necessary for the biological sulfate removal, i.e., CaCO<sub>3</sub> (which rises the pH to values adequate for the SRB development), protein and/or other carbon sources, or both. The presence of chitinase enzyme producer bacteria in the reactional medium is necessary to allow chitin to be a carbon source for the SRB. This will be discussed below, in the study of the developed bacterial community in the experiments.

In assay 3, as sulfate was consumed, sulfide was generated. It increased after 7 days ( $171 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and became apparent after 9 days ( $430 \pm 308 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), reaching values of  $4,565 \pm 3,514 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (day 31, Figure 30D). Thus, the acclimation time (lag phase) is assumed to be approximately 9 days. In addition to the dissolved sulfide measured, the characteristic smell and the formation of black precipitates were evidenced. The high standard deviation in some days, especially the day 31, may be explained by the fact that part of dissolved sulfide may have volatilized (as gaseous H<sub>2</sub>S) part may have precipitated as metallic sulfides, and there might be intrinsic discrepancies in a biological system. For assay 5 (Figure 30D), this generation emerged faster when compared with the assay 3: a concentration of  $1,695 \pm 49 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  was detected in



day 7, and  $5,900 \pm 1,556 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in day 29. These results can be explained by the absence of metals, which did not precipitate in the form of metal sulfides, so a higher amount of the sulfide remained in the solution. In assays 4 and 6 (also Figure 30D), sulfide generation was negligible, demonstrating the absence of sulfate-reducing activity.

**Figure 32.** (A) Iron, (B) Manganese, and (C and D) Aluminum ion variations versus total days of microcosm with SS and CHIT. The data points of all graphics represent duplicate average values, and the error bars represent the standard deviation.

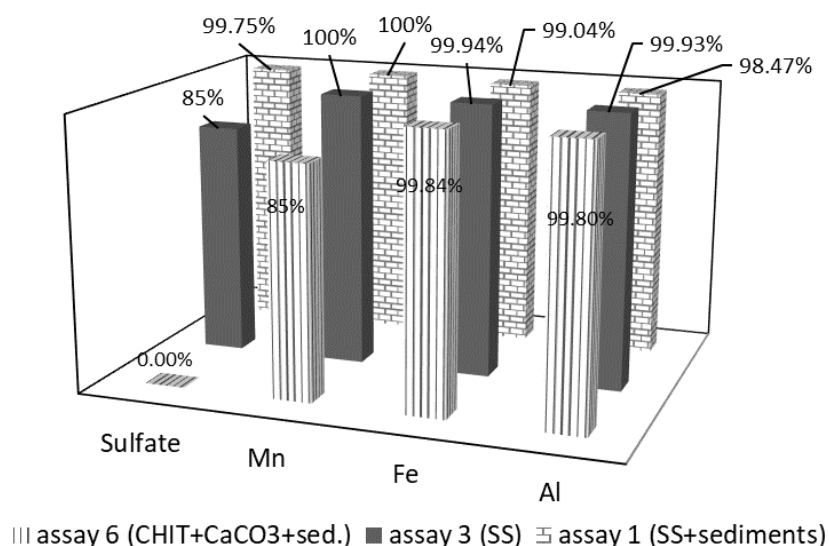


In assay 3, in addition to sulfate, the removal of metallic ions was also efficient:  $\text{Mn}^{2+}$  ion was in accordance with MAV after only one day,  $\text{Al}^{3+}$  ion after two days, and  $\text{Fe}^{2+}$  ion after seven days (Figure 32). At the end of the experiment, these metallic ions reached 100%, 99.94%, and 99.93% removal, respectively (Figure 33). In assay 4, no relevant ion removal was detected, except for Fe, which reached 68.60% removal, a value in accordance with Resolution CONAMA 430/2011 for effluent discharge. For the Fe ion, due to the reducing atmosphere in the microcosms,  $\text{Fe}^{2+}$  must be the dominant specie. Since  $\text{Fe}^{2+}$  hydroxide does not precipitate in  $\text{pH} < 8.5$  (FRIPP; ZIEMKIEWICZ; CHARKAVORKI, 2000; SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007), it can be inferred that: i)  $\text{Fe}^{2+}$  may have precipitated as sulfide (exclusively in the assay 3); ii)

an adsorptive process on chitin occurred (BARIKANI et al., 2014); and/or iii)  $\text{Fe}^{2+}$  might have been used by bacteria (OLADIPO et al., 2018) (growth and metabolism, also exclusively in the assay 3). So, the adsorbent capacity of chitin for  $\text{Fe}^{2+}$ , even at acidic pH, can be confirmed through assay 4.

$\text{Mn}^{2+}$  ion is not precipitated as hydroxide in  $\text{pH} < 6$  (KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017). Thus, in the assay 4 the non-removal was probably due to the low pH ( $3.53 \pm 0.11$ ). Analogously, the pH was the responsible for the remaining of Al in solution: Al ions are soluble until pH 6; at very low pH ( $< 1$ )  $\text{Al}^{3+}$  is dominant; and at pH 1.5–6, soluble sulfate ionic complexes (e.g.,  $\text{AlSO}_4^+$  and  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$ ) prevail (FALAGÁN et al., 2017; SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007). In the assay 3, considering the pH value ( $7.51 \pm 0.33$ ) and evidences of sulfide, as well as chitin presence, it can be concluded that the main mechanisms of metallic ion removal were precipitation (via formation of hydroxides, carbonates, and mainly sulfides) (MARTINS et al., 2011), and adsorption on chitin (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2017a, 2018, 2019). For the assay 6, can be inferred that the metallic ions were removed by precipitation as hydroxides, carbonates and/or bicarbonates precipitation, as well as via adsorption on chitin. It can be cited that in pH near 8, if  $\text{Fe}^{2+}$  concentration is considerable higher than  $\text{Mn}^{2+}$ , the co-precipitation may occur (KAUR et al., 2018).

**Figure 33.** Removal efficiencies obtained at the end of the current assay: comparison with assay 1 (RODRIGUES et al., 2019).



The evaluations between the removal efficiencies obtained of metallic ions, as well as sulfate, of previous study (RODRIGUES et al., 2019) and the present paper is shown in Figure 33. Comparing sulfate and metallic ions removal efficiencies between assays, it is corroborated

the success of MIW treatment with SS. Even without inoculum addition in the microcosms, the sulfate reduction made the treatment of MIW possible: metallic sulfide precipitation occurred and, in addition, adsorption of metallic ions on the chitin contained in SS must be considered. Also, biosorption mechanism in SRB biofilm (due its cell wall surface binding properties), and sorption mechanism onto the precipitates formed (with surfaces charged negatively) (VILLAGÓMEZ et al., 2012) can be mentioned.

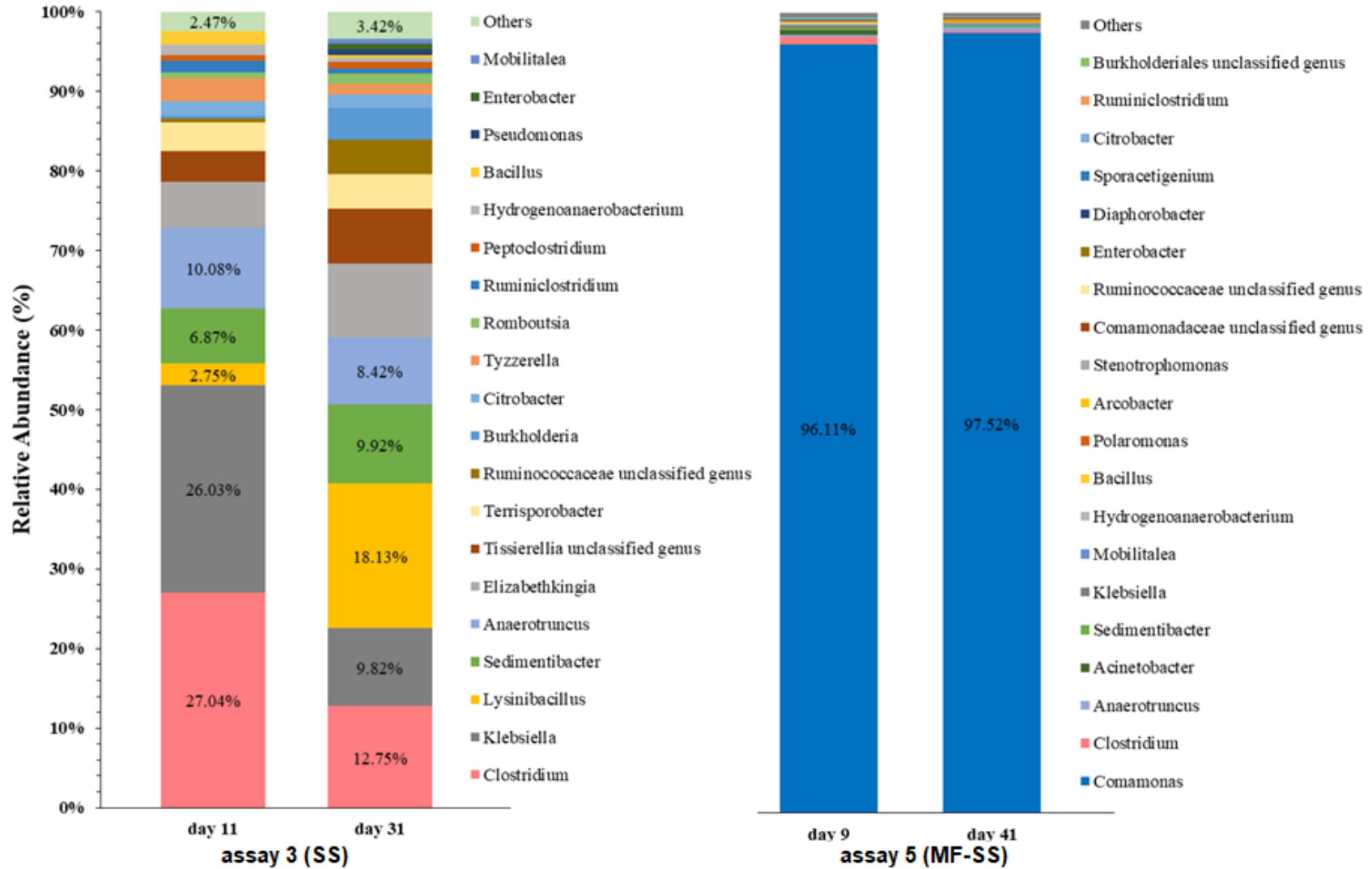
The unsuccessful assays 2 (RODRIGUES et al., 2019) and 4 demonstrated that commercial chitin is not an appropriate carbon source for the SRB biostimulation at low pH. Although the impact of the low pH in biological treatment was proposed in order to explain this fact (GREMBI; SICK; BRENNAN, 2016; LIU; GONG; LIU, 2014; ÑANCUCHEO; JOHNSON, 2014; RODRIGUES et al., 2019; SHARMA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2016), this theory fell down with the result of assay 6: commercial chitin does not promote SRB development at neutral pH either, and thus the necessity of the other components in SS for bioremediation of MIW is evidenced.

#### **4.2.3.2. Bacterial community structure**

Since evidence of the sulfate-reducing activity was verified (sulfate removal and sulfide accumulation) through the physicochemical analysis, the 16S rRNA MiSeq sequencing analyses were performed in the beginning and end of the log phase. Two different tests were conducted for assays 3 and 5 (SS and MF-SS, respectively), with the purpose of verifying their dominant microbial communities.

In the SS-assay, based on data from the 16S rRNA gene, 16 bacterial genera exhibited more than 1% relative abundance (more information and numbers on relative abundance can be seen at APÊNDICE B and APÊNDICE C). These abundant genera did not belong to the traditional SRB group. For the MF-SS assay only one genus was dominant. The results for the two samples from assay 3 (days 11 and 31) (Figure 34) demonstrated a bacterial diversity with predominance of the genera *Clostridium*, *Klebsiella*, and *Lysinibacillus*. As expected, these three genera are chitinase producers (KUMAR et al., 2018; MALLAKUNTLA et al., 2017; ZHU; ZHOU; FENG, 2007).

**Figure 34.** Top 20 relative abundances at the genus level based on bacterial 16S rRNA gene classification of specimens with the highest number of sequences detected from SS (3) and MF-SS (5) assays. The days represent the beginning and end of the higher metabolism of each assay. For the MF-SS assay, except for *Comamonas*, the other genera presented less than 1% of relative abundance.



More specifically, *Clostridium* showed greater relative abundance with 27.04% at the beginning of the log phase. It decreased to 12.75% at the end of the log phase. *Clostridium* are syntrophic, anaerobic, and fermentative bacteria. Some articles have reported the presence of this genus linked to AMD biotreatment system (HONG; PRUDEN; REARDON, 2007; MARTINS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2019; VASQUEZ et al., 2018) and to the production of H<sub>2</sub>S (LEFTICARIU et al., 2015). Some authors (BAO et al., 2012, 2017; RODRIGUEZ et al., 2016; SALLAM; STEINBÜCHEL, 2009; ZHAO et al., 2016) even consider this genus to be an SRB or able to perform sulfate-reduction. This genus belongs to the new group of bacteria outside the group of traditional SRB. One species previously classified as SRB (*Desulfotomaculum guttoideum*), was reclassified as a *Clostridium* species (STACKEBRANDT et al., 1997). Aoyagi et al. (2017) defined this genus as essential for the MIW treatment, since it ferments organic substrate into small molecules that become available for SRB. Similarly, the relative abundance of the *Klebsiella* genus decreased through the log phase from 26.03% to 9.82%. *Klebsiella* is a fermentative nitrogen fixing bacteria, typically found in soils (GRIMONT; GRIMONT, 2015). This genus has been identified by several authors as organisms present in areas contaminated by metals (e.g., mine tailings) and used in bioremediation processes, since these microorganisms have a great potential for adaptation and resistance in inhospitable environments (MITRA et al., 2018; NAVARRO-NOYA et al., 2012; OLADIPO et al., 2018). In our research, *Klebsiella* has been identified in the SS microcosms with (RODRIGUES et al., 2019) and without inoculum (this paper), but its abundance resulted < 1% in the MF-SS assay because of the absence of metallic ions. *Klebsiella* is also able to perform thermophilic biodesulfurization of petroleum derivatives (dibenzothiophene) (BHATIA; SHARMA, 2012; MARTÍNEZ et al., 2017).

A small amount of *Lysinibacillus* was detected at day 11 (2.75%) from assay 3, increasing to a significantly higher value at day 31 (18.13%). Literature also reported it in acidic sediments of the Tinto River (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2011, 2012b), which has similar environmental characteristics of the Sangão River. And its presence was related to remove Mn from MIW (BARBOZA et al., 2015; TANG et al., 2016).

Between others, as known SRB, were detected *Desulfovibrio* (0.28% at day 31) and *Desulfosporosinus* (0.03% at day 31), both acid-tolerant, anaerobic, Fe- and sulfate reducer (BAO et al., 2018). Among SRB found in for AMD biotreatment, *Desulfosporosinus* is said to be the most abundant and metabolically versatile in terms of substrate use for sulfate-reduction (SATO et al., 2019). Despite the low relative abundance, studies (MIRJAFARI; BALDWIN,

2016; SATO et al., 2019) reiterate that low abundances of SRB can sustain high rates of sulfate reduction, and that this process is more correlated with the supply of readily available carbon sources provided by organic matter degraders. Fermenters (e.g., *Clostridium*, *Klebsiella*, and *Anaerotruncus*) probably broke down complex organic substances, as SRB are unable to do so (ZHANG; WANG; HAN, 2016). Moreover, low similar abundances of SRB were detected in other studies (PESTER et al., 2010; RODRIGUES et al., 2019). Therefore, it was evident that through the high-throughput 16S rRNA sequencing for the SS assay, the chitinase producers and fermenters were the majority in the beginning and end of log phase. Martins et al. (2011) sustain that the diversity observed in the bacterial community structure can be the reason for the effectiveness of the bioremediation process.

In assay 5 (also Figure 34), *Comamonas* genus was predominant (96.11% at day 9, and 97.52% at day 41). According to Ma et al. (2009), this genus can adapt well ecologically and physiologically to complex and diverse environments (physiochemical adverse conditions). The highly effective adaptation might have been responsible for its high dominance, since in this assay the metallic ions were previously removed; this is probably a key factor for the non-predominance of other bacteria. Although considered aerobic, *Comamonas* are able to grow anaerobically (WILLEMS; GILLIS, 2015). In addition, it has been reported that species belonging to the *Comamonas* genus, such as the known sulfur-metabolizing bacteria *C. testosteroni*, can grow under an anoxic environment, with sulfate (XIA et al., 2015) and reduce nitrate (WU et al., 2015). *C. thiooxidans* is able to produce H<sub>2</sub>S (NARAYAN; PANDEY; DAS, 2010).

Studies detected *Comamonas* genus in microbial community from landfill and concluded to play an important role in the metabolism of H<sub>2</sub>S in its cover soil (XIA et al., 2015). This genus was also detected in the sludge from coal-mine wastewater treatment plants (MA et al., 2015), in a closed mine in Finland (BOMBERG; ARNOLD; KINNUNEN, 2015), in a gas coal mine in China, in coal bed reservoirs in India (WEI et al., 2014), in passive AMD treatment bioreactors (VASQUEZ et al., 2018). The genus has also been isolated from the sulfur spring sediment (NARAYAN; PANDEY; DAS, 2010), and associated with severely polluted environments (PIOTROWSKA-SEGET; CYCÓN; KOZDRÓJ, 2005). Tang et al., (2016) demonstrated high manganese removal efficiency by this genus, as well as by *Lysinibacillus*. For the MF-SS assay, except for *Comamonas*, the other genera presented less than 1% of relative abundance. The only SRB detected was *Desulfovibrio* (0.05% at day 41). Its abundance was compatible with previous literature (BOMBERG; ARNOLD; KINNUNEN, 2015;

PESTER et al., 2010; SATO et al., 2019).

This work aimed to biostimulate SRB in microcosms, with and without metallic ions, and identify the bacterial community structure. Both communities resulted very different, probably due to the lack of micronutrients in assay 5. As expected, SRB was observed but did not represent the majority, also endorsed by our previous work (RODRIGUES et al., 2019). Syntrophy between fermenter and/or chitinase producers and traditional SRB may be suggested. It is also important to consider that these last were historically reported based on a limited method (culture technique). Therefore, new insights are being considered, leading to include some bacteria as SRB (or having a strict connection with the sulfate reduction process), as reported in several recent studies using molecular microbiological methods, which was also reaffirmed by our work.

#### 4.2.4. Conclusions

Although the chitinous material SS is a suitable substrate for the SRB development, the chitin alone showed not be, even when the pH was neutralized. Thus, it is deduced that inside the studied conditions, the cluster of SS composition (chitin + proteins + minerals) concatenates as efficient substrate for SRB development, and not only the pH neutralization.

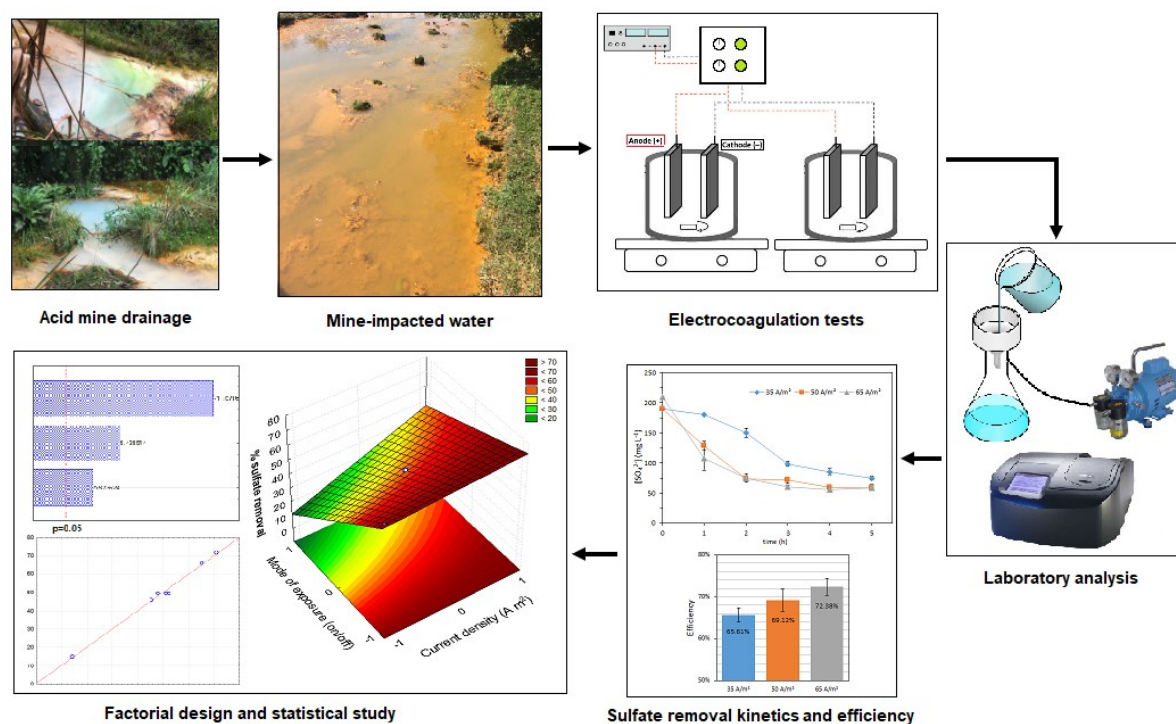
Addition of inoculum (benthic sediments) for the development of the microcosms SRB is not necessary: the contact of MIW with SS is enough to reach the desired treatment (assay 3) related to sulfate removal. This was also possible even with very low content of metallic ions (assay 5).

In assay 3, fermentative bacteria (*Clostridium*, *Klebsiella*, and *Anaerotruncus*) were highly detected, as well as chitinase producers (*Clostridium*, *Klebsiella*, and *Lysinibacillus*). Although traditionally known SRB were detected (*Desulfovibrio* and *Desulfosporosinus*), they remained at very low relative abundance ( $\leq 0.28\%$  at day 31). *Clostridium* genus is suggested as being a SRB (or related to carry out sulfate reduction). In the assay 5, bacterial development and sulfate reducing activity were evident. *Comamonas* genus was highly dominant, probably due its capacity of good adaptability to adverse conditions. The SRB *Desulfovibrio* was also detected.

Futures studies using other carbon sources, such as protein, in order to verify the occurrence of sulfate-reducing activity, will be carried out.

### 4.3. Artigo 3<sup>7</sup> - Sulfate removal from mine-impacted water by electrocoagulation: statistical study, factorial design, and kinetics

#### RESUMO GRÁFICO:



<sup>7</sup> Este artigo deu origem à seguinte publicação (*in press*):

Environmental Science and Pollution Research  
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-09758-1>

RESEARCH ARTICLE

## Sulfate removal from mine-impacted water by electrocoagulation: statistical study, factorial design, and kinetics



Caroline Rodrigues<sup>1</sup> · Hioná V. Dal Magro Follmann<sup>1</sup> · Dámaris Núñez-Gómez<sup>1</sup> · Maria Eliza Nagel-Hassemer<sup>1</sup> · Flávio R. Lapolli<sup>1</sup> · María Ángeles Lobo-Recio<sup>1,2</sup>

Received: 25 March 2020 / Accepted: 15 June 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Springer

<https://doi.org/10.1007/s11356-020-09758-1>

CiteScore 2019: 4,9.

Fator de Impacto 2019: 3,056.



## ABSTRACT

This work aimed to remove sulfate and acidity from mine-impacted water (MIW) via electrocoagulation (EC), a technique which stands as an advanced alternative to chemical coagulation in pollutant removal from wastewaters. The multiple electrochemical reactions occurring in the aluminum anode and the stainless-steel cathode surfaces can form unstable flakes of metal hydroxysulfate complexes, causing coagulation, flocculation, and floatation; or, adsorption of sulfate on sorbents originated from the electrochemical process can occur, depending on pH value. Batch experiments in the continuous mode of exposition using different current densities (35, 50, and 65 A·m<sup>-2</sup>) were tested, and a statistical difference between their sulfate removals was detected. Furthermore, the intermittent mode of exposure was also tested by performing a 2<sup>2</sup>-factorial design to verify the combination with different current densities, concluding that better efficiencies of sulfate removal were obtained in the continuous mode of exposition, even with lower current densities. After 5 hours of electrocoagulation, sulfate could be removed from MIW with a mean efficiency of 70.95% (in continuous mode of exposition and 65 A·m<sup>-2</sup> current density), and this sulfate removal follows probable third-order decay kinetics in accordance with the quick drop in sulfate concentration until 3 h of exposure time, remaining virtually constant at longer times.

**Keywords:** Acid mine drainage (AMD); mine-impacted water (MIW); electrocoagulation; sulfate removal; decay kinetics; factorial design.

## RESUMO

O presente trabalho objetivou remover sulfato e acidez de águas impactadas por drenagem ácida de mineração (AIDAM) através de eletrocoagulação (EC), uma técnica que se apresenta como uma excelente alternativa à coagulação química na remoção de poluentes em efluentes. As múltiplas reações eletroquímicas que ocorrem no ânodo de alumínio e no cátodo de aço inox, formam flocos instáveis de complexos hidroxissulfatados de metais, causando coagulação, floculação e flotação; ou bem, adsorção de sulfato nos adsorventes originados no processo eletroquímico, podendo ocorrer a depender do pH. Experimentos em batelada em modo contínuos de exposição utilizando diferentes densidades de corrente (35, 50 e 65 A·m<sup>-2</sup>) foram testados, e uma diferença estatística entre as remoções de sulfato foi detectada. Além disso, o modo de exposição intermitente também foi testado através de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, para verificar a combinação com diferentes densidades de corrente, concluindo que melhores

eficiências de remoção de sulfato foram obtidas no modo de exposição contínuo, mesmo com densidades de corrente mais baixas. Após 5 horas de ensaio de eletrocoagulação, o sulfato pôde ser removido da AIDAM com eficiência média de 70,95% (em modo contínuo de exposição e densidade de corrente de  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ ), e esta remoção de sulfato segue uma provável cinética de terceira ordem de decaimento, de acordo com a rápida queda na concentração de sulfato até 3 h de tempo de exposição, permanecendo virtualmente constante em períodos mais longos.

**Palavras-chave:** Drenagem ácida de mineração (DAM); águas impactadas por DAM (AIDAM); eletrocoagulação; remoção de sulfato; cinética de decaimento; planejamento fatorial.

Transcrição adaptada do Artigo:

#### **4.3.1. Introduction**

Mining industry is an essential contributor to the world's economy, as it is in Brazil. The process of extraction and beneficiation in coal mining is one of the main economic activities in the Carboniferous Basin of southern Santa Catarina State, Brazil (MACAN et al., 2012). During periods of intense drought, in which the hydroelectric power plants cannot work, coal (among other thermoelectric sources) prevents the risk of electrical blackout in Brazil (BRASIL, 2007). As a part of the Brazilian energy matrix, with over 130 years of mining activity (SILVA et al., 2013), the social and environmental impacts of the mines are substantial; almost one thousand abandoned mines exist throughout the Carboniferous Basin (BRASIL, 2018). The active mines are not currently a significant environmental concern because, in theory, the mining companies properly treat their effluents. However, the abandoned and inactive mines produce acid mine drainage (AMD), a heavy-metal and rich sulfuric acid effluent, which is a global environmental concern (DEMERS et al., 2015; KEFENI; MSAGATI; MAMBA, 2017; MOODLEY et al., 2018; PEIRAVI et al., 2017). AMD is produced when sulfidic minerals, like pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), are exposed to oxygen and water to form sulfuric acid. Therefore, its highly toxic and corrosive characteristics are due to its acidic pH values (between 2 and 4), with high concentrations of sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) and dissolved metallic ions (e.g., Fe, Al, Mn, Zn, Cu, and Pb).

The AMD formation constitutes the primary source of pollution of fresh surface waters worldwide (MESA et al., 2017), known as mine-impacted water (MIW). AMD as well as MIW remediation is a complex process that typically involves acid neutralization and sulfate and dissolved metallic ion removal (AL-ABED et al., 2017). Several physico-chemical technologies

have been applied to treat this type of effluent, such as reverse osmosis (MASINDI; OSMAN; ABU-MAHFOUZ, 2017); sorption technologies (adsorption and ion exchange) (GUIMARÃES; LEÃO, 2014; SILVA; LIMA; LEÃO, 2012); and chemical precipitation as gypsum, barium sulfate, ettringite, jarosite, or ferrite (KEFENI et al., 2015; MASINDI; OSMAN; ABU-MAHFOUZ, 2017; TAIT et al., 2009; TOLONEN et al., 2016). These technologies can be efficient, and moreover, some have the possibility of metal recovery. However, some disadvantages can be mentioned, like the production of large brine volumes and fouling formation on the membrane due to the gypsum formation (leading to the need of a membrane downstream pre-treatment); lowered efficiency of limestone as an adsorbent and precipitant agent in acid conditions; large volume of sludge and its subsequent treatment, considering that sludges containing barium are of greater concern than those containing sulfate (BARBOSA et al., 2014; MASINDI; OSMAN; ABU-MAHFOUZ, 2017; SILVA; LIMA; LEÃO, 2012).

Previous studies in our research group (RODRIGUES et al., 2019, 2020b) have evaluated the biological treatment of MIW biostimulating sulfate-reducing bacteria (SRB), obtaining excellent removals of sulfate (85% and 99.75%) and metallic ions (Fe ( $\geq 99.04\%$ ), Al ( $\geq 98.47\%$ ), and Mn (100%)), and neutralizing pH, however, the sulfide formation increases the toxicity. Additionally, the physical-chemical treatment of MIW and AMD with shrimp shells as a sorption agent has been studied extensively (NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a, 2017b, 2018, 2019), and substantial metallic ions (Fe, Al, and Mn) removal and pH neutralization were obtained, although the sulfate anion remained as a challenge in the treatment of these effluents. Due its high solubility and stability in aqueous solutions, sulfate is not easily removed from water (MAMELKINA et al., 2017). The adverse effects include (i) increased dissolved solids of the receiving waterbody, affecting its usefulness downstream for drinking, irrigation, or industry (MOOSA; NEMATY; HARRISON, 2005); (ii) can cause problems of odor and corrosion to concrete buildings (MAMELKINA et al., 2017); (iii) the ingestion of water containing above  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  can cause diarrhea (NAJIB et al., 2017).

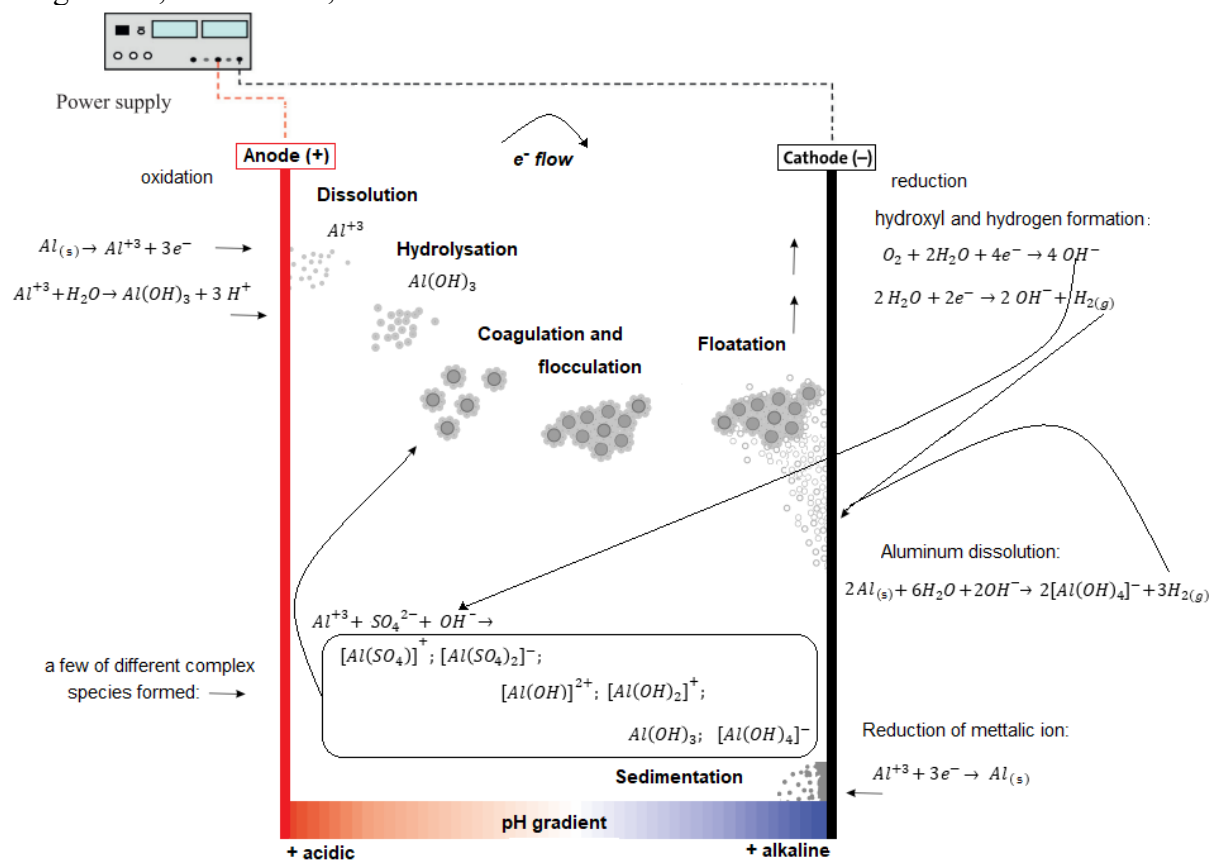
Therefore, a new technology for sulfate removal was tested: electrocoagulation (EC). Several recent studies (MAMELKINA et al., 2017, 2019; NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017; NARIYAN; WOLKERSDORFER; SILLANPÄÄ, 2018) have addressed this type of treatment in MIW. The EC treating MIW stands as a promising technology, providing better efficiencies for sulfate removal at low pH (characteristic of MIW) than at higher pH values, because in acidic conditions, the numerous cationic species can

interact electrostatically with the anions (MAMELKINA et al., 2017), forming precipitates, while at neutral and alkaline pH, the mechanism is different: the primary coagulant species are amorphous metal hydroxide precipitates, that according to the surface charge can adsorb ions in its surface (MAMELKINA et al., 2017). Additionally, these precipitates can be positively or negatively charged (because of the adsorption of hydroxometallic ions on the surface), with a large number of possibilities for the fixation of sulfate ions (MAMELKINA et al., 2017). The sulfate ions are attracted to the charged precipitates and form metallic hydroxysulfates with high adsorption properties. These hydroxysulfates form larger structures and sweep through the water (coagulation) (SINGH; RAMESH, 2014). Furthermore, the process can generate a more neutral pH (range of 6–7) and compact sludge, when compared with conventional coagulation (NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017). In the EC process, considered to be efficient and environment-friendly method (WU et al., 2019), various anodes can be used, but Al and Fe are superior metals for producing multivalent ions, favoring the processes. Not coincidentally, these are the most common anodes used as electrodes in EC (AN et al., 2017; NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017), generally, the Al electrode in acidic medium ( $\text{pH} < 6$ ) is used, and in neutral and alkaline medium, the Fe electrode is more suitable (BENER et al., 2019).

In the EC technology (summarized in Figure 35), oxidation and reduction occur simultaneously. On the anode surface (framed in red), the oxidation reaction occurs, causing the dissolution and hydrolysis of the  $\text{Al}^0$ , releasing  $\text{Al}^{3+}$  into the medium, which binds with the hydroxide ions ( $\text{OH}^-$ ) produced from the cathode surface reduction (framed in black), as well as with the sulfates in solution, thus giving rise to aluminum sulfate complexes that form colloidal particles (VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2020).

Colloids are stable in water due to the net interactions between electrostatic repulsions and attractive van der Waals interactions between the particles (SHAMAEI et al., 2018; VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2020). In the coagulation process, these colloidal particles are destabilized because the repulsive energy between them is reduced by the presence of a coagulant, being more easily agglomerated. Flocculation occurs when these agglomerated particles attach to each other with the formation of a weak bond (van der Waals forces) with force inversely proportional to the distance from particle surface, as described by the DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek) Theory (ADAIR; SUVACI; SINDEL, 2001; SHAMAEI et al., 2018).

**Figure 35.** EC scheme: the numerous unstable species formed start to aggregate, initiating the coagulation, flocculation, and floatation.



Source: adapted from (NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017; SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007; VEPSÄLÄINEN, 2012).

Once formed, these flocs will be floated (adhered to bubbles) by the hydrogen produced at the cathode (VEPSÄLÄINEN et al., 2011; VEPSÄLÄINEN; PULLIAINEN; SILLANPÄÄ, 2012). Furthermore, the removal also may occur as sedimentation (for higher density particles). At  $pH \geq 5.5$ , formation of insoluble aluminum hydroxides occurs (SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007), and sulfate removal can also be effected via an adsorption process (FOLLMANN et al., 2020; NIPPATLA; PHILIP, 2019). The rate of electrochemical reactions is proportional to the current density (SHAMAEI et al., 2018), and at alkaline pH it can be lower than the value calculated by Faraday's law, indicating that other reactions at the anode may be occurring (VEPSÄLÄINEN, 2012).

When handling a series of experiments, statistical methods can be used in order to establish its dependence on the variables involved in the process. Therefore, the factorial design stands as a technique that allows the combination of all variables at all levels, obtaining the simultaneous effect of each variable over the response. The  $2^k$  factorial design is the simplest type of factorial design, that involves two or more independent variables (named factors (k)) in

two levels (+1 and -1), being very useful during the initial stages of the study when there are many variables to investigate, providing the lowest number of runs in a complete factorial design (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

In this sense, this work aimed to evaluate the EC processes for the MIW sulfate removal, under different current densities (35, 50, and 65 A·m<sup>-2</sup>). As EC involves electric energy, different modes of exposure (continuous and intermittent) were tested. The relation between the independent variables (exposure mode and current density) was evaluated by means of a 2<sup>2</sup>-factorial design. Moreover, a kinetics study for the assay with the highest removal of sulfate was performed.

### **4.3.2. Material and methods**

#### ***4.3.2.1. MIW collection and analytical methods***

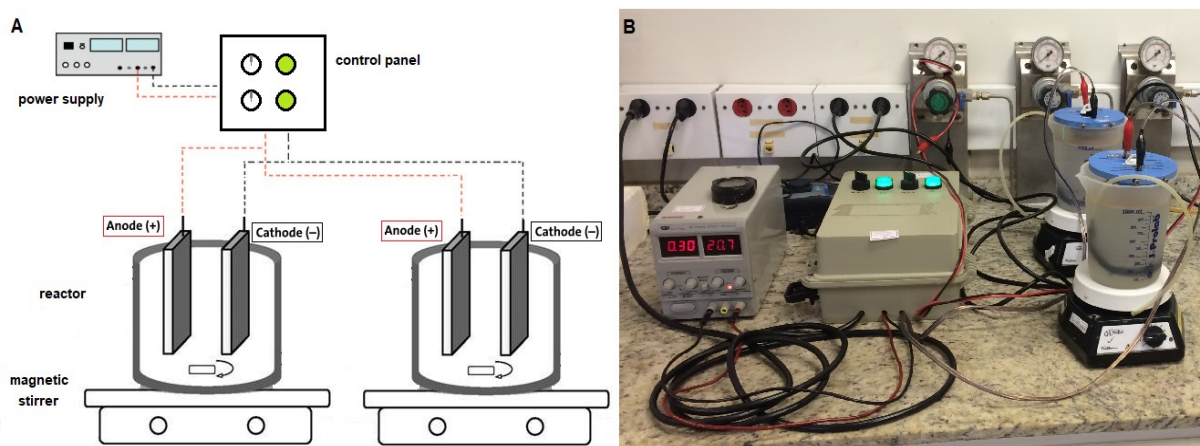
MIW from the Sangão River (inside the Carboniferous basin of southern Santa Catarina State, Brazil) was used for the treatment tests. The samples were collected, filtered under vacuum through a 0.45 µm pore membrane, as described in the references (APHA, 2017; NÚÑEZ-GÓMEZ et al., 2016, 2017a; RODRIGUES et al., 2019, 2020b) and characterized. The sulfate concentration was determined before and after the EC tests, by photolorimetry on a HACH 5000 Spectrophotometer using colorimetric kits Sulfaver HACH, compatible with the *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* procedure (APHA, 2017). Likewise, for the metallic ions (Fe, Al, and Mn) initial characterization, the HACH colorimetric kits were also used (ferrover, aluminon, and periodate oxidation, respectively). These metals were selected since they are the most commonly found in AMD from abandoned coal mines (SEO et al., 2017). The total organic carbon was measured as non-purgeable organic carbon (NPOC) in the high-temperature combustion method (APHA, 2017) (Shimadzu TOC-LCSH) and the pH was monitored with a Thermo Fisher Scientific pHmeter.

#### ***4.3.2.2. Experimental set-up for electrocoagulation***

An electrochemical system was mounted for bench-scale testing, adapted from Mamelkina et al. (2017). The system consisted of replicates of the EC reactors in parallel to execute experiments in duplicate and triplicate. Each EC reactor consisted of a 1-L plastic beaker, in which flat plate electrodes of Al (anode) and stainless steel (cathode) were immersed, spaced 5 cm from each other. The electrodes had the dimensions of 5.65×13.9 cm, with a useful

area of 28.76 cm<sup>2</sup> (anode). A magnetic stirrer was used to homogenize the samples because a chemical species concentration gradient naturally occurs. The passage of electric current from the power supply (PS-A305D) to the reactors was regulated by a control panel, providing continuous or intermittent current exposure that went into the reactors with the same electric current intensity (Figure 36).

**Figure 36.** (A) An illustration and (B) A photograph of the EC tests, operated in laboratory scale.



Three experiments were carried out in triplicate with three different current intensities under the continuous mode of exposure: 0.101, 0.144, and 0.187 A, yielding current densities of 35, 50, and 65 A·m<sup>-2</sup>, respectively. For all experiments, 1 L of MIW per beaker was used, the temperature was controlled at 23 ± 1 °C, and the total time of electric current passage was 5 hours under agitation. Samples were taken hourly, filtered under vacuum (0.45 μm pore membrane filter), and the pH and sulfate concentration were then measured. The data obtained was then used for statistical study and to determine the appropriate kinetics.

#### 4.3.2.2.1. Statistical study

Sulfate removal data for current densities 35, 50, and 65 A·m<sup>-2</sup> and EC times of 3, 4 and 5 h were evaluated by the analysis of variance method (ANOVA), and the difference between the means was evaluated using the Tukey test, at a 95% confidence level ( $p \leq 0.05$ ). These analyses were performed using the R software (v3.6.3, 2020).

#### 4.3.2.2.2. Kinetics studies

The order ( $n$ ) of a reaction is defined as the exponent of the species concentration in the

rate equation, and generally is expressed in empirical quantities, deduced from observed behavior (HELFFERICH, 2004). The rate equation is expressed in Eq. (24) and is valid for irreversible reactions in a homogenous reactor (FOGLER, 1999). When the mechanism is not known, a trial-and-error solution is often attempted to fit the data with empirical rate equations of  $n^{\text{th}}$  order obtained from the integral method (LEVENSPIEL, 1999). In the integral method of analysis, the rate equation after appropriate integration and mathematical manipulation, generates Eq. (25), where  $C$  is the sulfate concentration at time  $t$ ,  $C_0$  is the initial concentration,  $n$  is the kinetics order, and  $k_n$  is the  $n^{\text{th}}$ -order reaction constant.

$$-\frac{dC}{dt} = k_n C^n \quad \text{Eq. 24}$$

$$\frac{1}{C^{n-1}} = \frac{1}{C_0^{n-1}} + (n-1)k_n t, \quad \text{for } n \neq 1 \quad \text{Eq. 25}$$

If a reasonably linearity is obtained, then the rate equation is said to satisfactorily fit the data. Generally, it is suggested that integral analysis is attempted first (due its higher accuracy), and, if not successful, the differential method is then tried. Although the latter requires larger amounts of data, the differential method is a useful tool in uncertain situations (LEVENSPIEL, 1999). The differential method of analysis deals directly with the differential rate equation to be tested (Eq. 26), evaluating all terms in the derivative equation and examining the quality of the experiment equation fit.

$$\log\left(-\frac{dC}{dt}\right) = \log k_n + n \log C \quad \text{Eq. 26}$$

#### 4.3.2.2.3. Factorial design

The influence of the different current densities with different exposure modes on the sulfate removal from MIW was investigated, using the  $2^2$ -factorial design in duplicate with the central point in triplicate. The factor scores (-1 and +1) indicate the minimum and maximum level for each test of the variables, and the central point (0) is the symmetrical distance between both, as shown in Table 14.

The mode of exposure and current density were the independent variables ( $k$ ), and as the dependent variable (response), the efficiency of sulfate removal (%) after 5 h treatment was selected. Therefore, the combination of all variables provided seven experiments, which were determined by the Statistica software, following the matrix in Table 14. The sulfate removal was evaluated by the analysis of variance ANOVA, Pareto diagrams, and response surface (3D and 2D) graphs, using the Statistica 8 software (Statsoft, Inc.).



**Table 14.** Factorial design results for sulfate removal efficiency by EC.

Independent variable (level)	(-1)	0	(+1)
Current density ( $A \cdot m^{-2}$ )	35	50	65
Mode of exposure (on/off) <sup>a</sup>	5/0 (continuous)	5/5	5/10

	Independent variables		Dependent variable	
	Current density	Mode of exposure	Efficiency (% removal)	Mean efficiency $\pm$ SD <sup>b</sup>
Experiment 1	35	5/0	63.68 66.84	65.26 $\pm$ 2.23
Experiment 2	65	5/0	72.38 69.52	70.95 $\pm$ 2.02
Experiment 3	35	5/10	18.33 10.00	14.17 $\pm$ 5.89
Experiment 4	65	5/10	44.71 45.88	45.29 $\pm$ 0.83
Experiment 5	50	5/5	51.11	
Experiment 6	50	5/5	52.22	50.37 $\pm$ 2.31
Experiment 7	50	5/5	47.78	

<sup>a</sup> (minutes on/minutes off) of electric current;

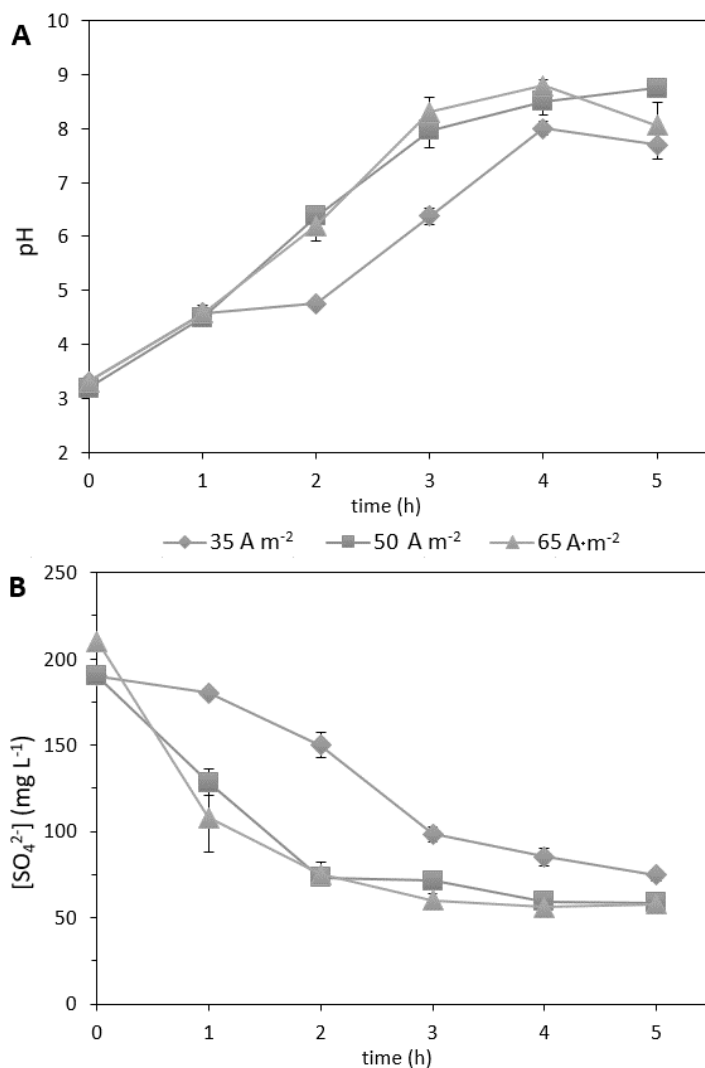
<sup>b</sup> SD: standard deviation.

### 4.3.3. Results and discussion

#### 4.3.3.1. pH rise and sulfate removal in continuous mode of exposure

Initially, the MIW pH was 3.30 and sulfate concentration was  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (for the  $65 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$  assay), and  $190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (for the  $35$  and  $50 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$  assays). This difference on the sulfate concentration values is because the assays were performed in different days, and it is known that MIW composition varies over time. The metallic ions concentrations were  $29.4$ ,  $11.24$ , and  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , for Fe, Al, and Mn, respectively, and the non-purgeable organic carbon was  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Although the sulfate concentrations in these samples did not exceed the maximum allowed value (MAV) by the Brazilian normative ( $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for freshwater) (BRASIL, 2011), sulfate removal is important due to sulfate-reducing bacteria, capable of transforming sulfate into toxic sulfide, in the Sangão River (RODRIGUES et al., 2020b), where the MAV cannot exceed  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in Class III freshwater (adequate for reuse as non-potable) (BRASIL, 2005). Figure 37A shows the pH variations over electric current flow and time: the  $50$  and  $65 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$  current densities curves presented a similarly high slope with the corresponding increase in pH until 3 hours and, after that, a smoother curve was produced. In contrast, with the  $35 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$  curve, the pH rise was less pronounced.

**Figure 37.** (A) pH and (B) Sulfate concentration decay profile for the different electric current densities tested. The data points represent triplicate average values and the error bars represent the standard deviation.

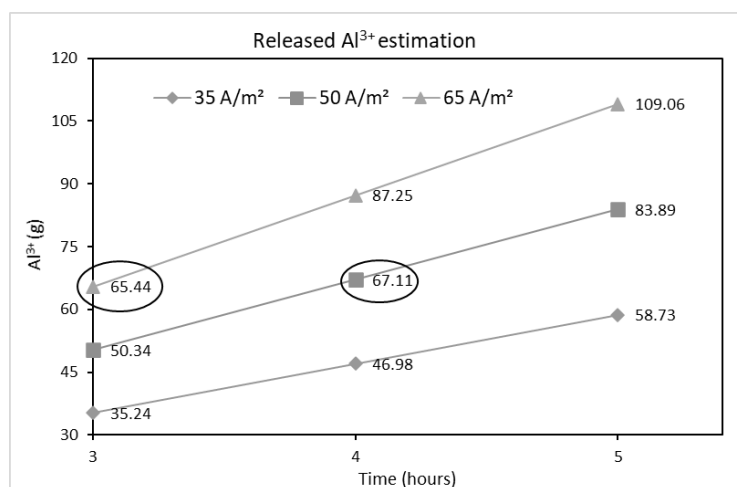


Although, for the 3 current densities tested, at the end of the 5-hour experiment, the final pH values were not under 7.70 ( $7.70 \pm 0.27$ ,  $8.75 \pm 0.14$ , and  $8.06 \pm 0.42$  for 35, 50, and 65 A·m<sup>-2</sup>, respectively). The pH rise is probably derived from the hydrolysis reactions that occur at the cathode, generating hydroxyl anions (OH<sup>-</sup>). The rate of the electrochemical reaction is directly proportional to the current density, and the test with the lowest current density (35 A·m<sup>-2</sup>) corroborates this: less hydroxyl was produced, so its pH was slightly lower, though very close to the other two currents tested. Analogously, in the sulfate decay curves (Figure 37B), at the lowest current density, less sulfate was removed (i.e., a lower rate of sulfate decay had occurred) when compared to other current densities. For the sulfate concentration, the 65 and 50 A·m<sup>-2</sup> curves followed the same pattern of decay: until 2 hours presented a higher decay and, after that, a smoother curve came out, with very similar sulfate concentrations over time. For the 65

$\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ , the sulfate concentration decay was faster after 1 hour. The  $35 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  assay presented a much smoother decay in the first 2 hours. However, at the end of 5 hours, the concentration of the three assays were similar ( $\leq 65.33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

In relation with sulfate concentration over time, ANOVA showed no significant difference between 3, 4 and 5 h for the current density of  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $p = 0.3930$ ). In contrast, for the  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  current density, the ANOVA showed difference between them ( $p = 0.0294$ ): the Tukey test showed no difference between 4 and 5 hours ( $p = 0.9840$ ) but presented difference between 3 and 5 hours ( $p = 0.0396$ ), and between 3 and 4 hours ( $p = 0.0486$ ). Consequently, viewing the lowest power consumption,  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  current density during 4h EC, or  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  with 3h EC time can be chosen as convenient treatment conditions. Furthermore, an estimation based on Faraday's law indicates that both conditions release to the medium approximately the same Al mass (67.11 g and 65.44 g for  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  during 4h and  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  during 3h, respectively) and then, a similar power consumption can be deduced (see Eq. 20 and Figure 38).

**Figure 38.** Released  $\text{Al}^{3+}$  estimation over time for different current densities tested, based on Faraday's law.

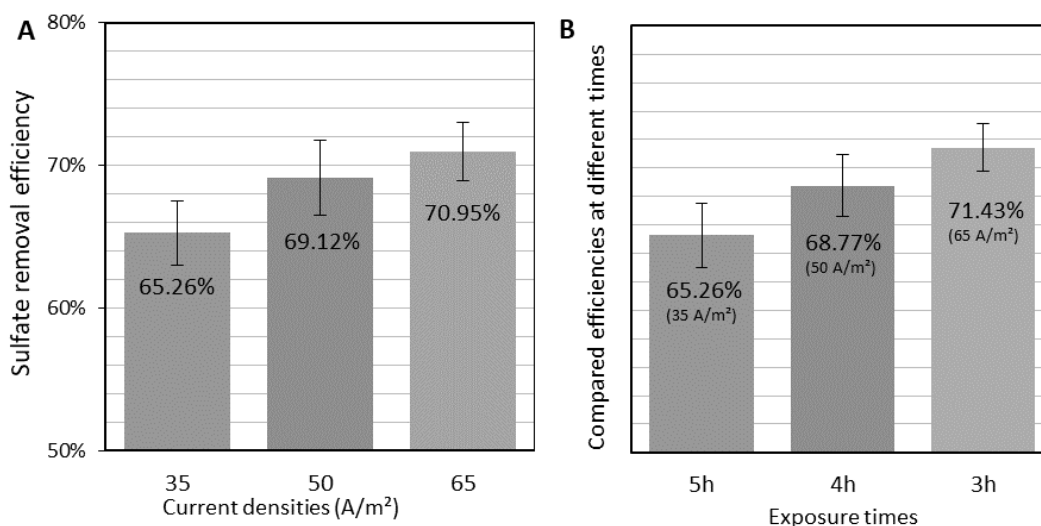


According to the speciation diagram of aluminum in AMD (SÁNCHEZ-ESPAÑA, 2007), several aluminum sulfate complexes are formed at pH 0 – 6.5,  $\text{Al}(\text{OH})_3$  precipitates at pH 5.5 – 8, and the formation of soluble aluminate occurs at pH  $\geq 6$ . Thus, sulfate removal via flocculation/coagulation until 2 h of exposure time (formation of  $\text{AlSO}_4^+$  and  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2^-$ ), and participation of adsorption on  $\text{Al}(\text{OH})_3$  between 2 and 3 h can be suggested. After 3 h of exposure time, in the 50 and  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  cases, pH is near of 8 and then aluminum from anode remains mostly dissolved as aluminate and sulfate removal does not occur (Figure 37). Consequently, it can be deduced that pH values  $> 8$  are not adequate for removing sulfate via

electrocoagulation processes.

The mean efficiency obtained for sulfate removal in each test after 5 hours (Figure 39A) indicates that values were also close in terms of removal. The mean efficiencies obtained were  $65.26 \pm 2.23$ ,  $69.12 \pm 2.65$ , and  $70.95 \pm 2.02$  (% sulfate removal) for the current densities 35, 50, and  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ , respectively. However, the ANOVA showed that there was a significant difference in the removal efficiencies ( $p = 0.0432$ ). To compare the difference between the means of each treatment, the Tukey test was performed. The  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  assay differs statistically from the  $35 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $p = 0.0387$ ), but the  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  assay does not differ statistically from either the  $35 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $p = 0.1582$ ) or the  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $p = 0.5364$ ). This comparison is also illustrated in the alignment of the error bars in Figure 39A: the bar corresponding to the assay at  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  is aligned with the others' efficiencies bars, but the  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  bar is not aligned with the  $35 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  bar. The Figure 39B shows the best sulfate removal efficiency for each current density (at different times), reiterating that the  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  with 3h time can be chosen as convenient treatment conditions, as stated before in the ANOVA analysis.

**Figure 39.** (A) Efficiencies for sulfate removal after 5 hours of continuous mode of exposure. (B) Comparison of the best sulfate removal efficiency for each current density (at different times of exposure). The bars represent the standard deviation of the mean values.



A small number of studies regarding the removal of sulfate via EC were found, in which substantially different experimental conditions were used: Hossini et al. (2015) reached approximately 85% sulfate removal from a synthetic wastewater at pH 8 with  $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sulfate using an iron anode and a current density of  $120 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  for 90 min EC time. Nariyan et al. (2017) reached a 41% removal from real AMD containing  $13,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sulfate after 2 hours EC time using  $700 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  current density. Higher EC times had not been tested. In the current research,

64.29% sulfate removal was reached after 2 h treatment (65 A·m<sup>-2</sup> assay), although it progressed to 71.43% after 3 h and oscillated to 70.95% after 5h (Figure 39A). Comparison of these results seems confirm that very high current densities do not improve the sulfate removal when aluminum anode is used, because the high pH elevation drives to the formation of soluble aluminate (KAUR et al., 2018), which does not contribute to the EC process. Tait et al. (2009) studied precipitation in the form of gypsum crystallization for sulfate contaminated wastewaters with high concentrations (up to 11,400 mg·L<sup>-1</sup>), concluding that the method is effective for considerably high concentrations but limited for low sulfate concentrations. Therefore, it can be inferred that EC is potentially an adequate method for relatively low sulfate concentrations and precipitation is effective for higher concentrations.

#### 4.3.3.2. Kinetics study over the highest sulfate removal assay

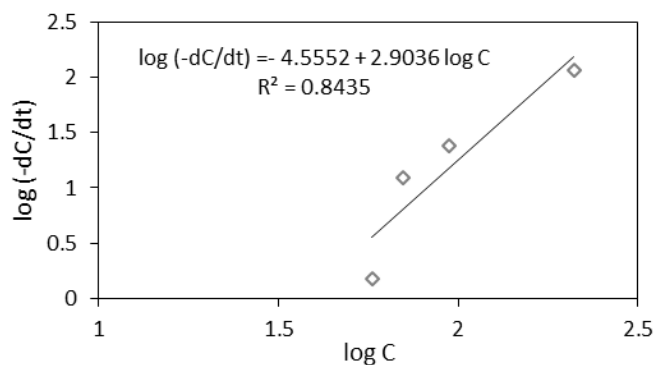
A kinetics study of the sulfate removal was performed because a decay on the sulfate concentration over time was evident. The determination of the kinetic reaction order ( $n$ ) was carried out for the 65 A·m<sup>-2</sup> continuous mode of exposure assay because this condition showed the best sulfate removal after 5 h. Several  $n$  values were considered (ranging from 0 to 4, in 0.5 increments) and  $k_n$  was calculated according to the corresponding equations (Eq. 25). In Table 15, the calculations are listed in descending order of the coefficient of determination ( $R^2$ ) from the tested kinetic equations.

**Table 15.** Sulfate decay kinetics tested obtained from the integral method for 65 A·m<sup>-2</sup>.

$R^2$	Order ( $n$ )	Linearized Eq.	Linear regression	$k_n$	$k_n$ unit
0.9857	3	$\frac{1}{C^2} = \frac{1}{C_0^2} + 2kt$	$\frac{1}{C^2} = 2 \times 10^{-5} + 8 \times 10^{-5}t$	$4 \times 10^{-5}$	L <sup>2</sup> ·mg <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup>
0.9820	3.5	$\frac{1}{C^{2.5}} = \frac{1}{C_0^{2.5}} + 2.5kt$	$\frac{1}{C^{2.5}} = 2 \times 10^{-7} + 1 \times 10^{-5}t$	$4 \times 10^{-6}$	L <sup>2.5</sup> ·mg <sup>-2.5</sup> h <sup>-1</sup>
0.9809	2.5	$\frac{1}{C^{1.5}} = \frac{1}{C_0^{1.5}} + 1.5kt$	$\frac{1}{C^{1.5}} = 4 \times 10^{-4} + 5 \times 10^{-4}t$	$3.3 \times 10^{-4}$	L <sup>1.5</sup> ·mg <sup>-1.5</sup> h <sup>-1</sup>
0.9731	4	$\frac{1}{C^3} = \frac{1}{C_0^3} + 3kt$	$\frac{1}{C^3} = 3 \times 10^{-7} + 2 \times 10^{-6}t$	$6.7 \times 10^{-7}$	L <sup>3</sup> ·mg <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
0.9643	2	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	$\frac{1}{C} = 5.7 \times 10^{-3} + 3.4 \times 10^{-3}t$	$3.4 \times 10^{-3}$	L·mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
0.9338	1.5	$\frac{1}{\sqrt{C}} = \frac{1}{\sqrt{C_0}} + 0.5kt$	$\frac{1}{\sqrt{C}} = 0.0763 + 0.0162t$	0.0324	L <sup>0.5</sup> ·mg <sup>-0.5</sup> h <sup>-1</sup>
0.8896	1	$\ln C = \ln C_0 - kt$	$\ln C = 5.1395 - 0.3231t$	0.3231	h <sup>-1</sup>
0.8354	0.5	$\sqrt{C} = \sqrt{C_0} - 0.5kt$	$\sqrt{C} = 13.087 - 1.6662t$	3.3324	mg <sup>0.5</sup> ·L <sup>-0.5</sup> h <sup>-1</sup>
0.7771	0	$C = C_0 - kt$	$C = 173 - 35.6t$	35.6	mg·L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

As Table 15 indicates, three different orders reached high and similar  $R^2$  ( $n = 3, 3.5$  and  $2.5$ , providing  $R^2 = 0.9857, 0.9820$ , and  $0.9809$ , respectively). Therefore, as a complementarily test and as tiebreaker criteria, the differential method was tested (Eq. 26), and Figure 40 shows the corresponding plot.

**Figure 40.** Graphical determination of the sulfate decay reaction order by the differential method: the curve slope is the order ( $n$ ), and the intercept is the logarithm of  $k_n$ .



Through linear regression, the angular coefficient gives  $n$  that approaches 3 (2.9036). Therefore, it indicates that the kinetic is of third order. The  $k_3$  value obtained from the differential method was  $2.8 \times 10^{-5} \text{ L}^2 \cdot \text{mg}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , relatively close to the  $k_3$  value from the integral method ( $4 \times 10^{-5} \text{ L}^2 \cdot \text{mg}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , Table 15).

A sulfate decay kinetics of third order implies in a high and a low decay rate at high and low sulfate concentrations, respectively. This is in agreement with the behavior observed in the figure 3b, in which the sulfate concentration drops quickly until 3 h of exposure time remaining virtually constant between 3 and 5 h. The kinetic studies of sulfate decay is controversial and there is no general agreement between the various authors. Hossini et al. (2015) proposed first order kinetics and Nariyan et al. (2017), a second order model on the basis of the  $R^2$  value only, and other orders have not been tested.

Considering that each point of the data had been obtained from triplicate experiments, the temperature was controlled and constant ( $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), and both methods (differential and integral) converged to similar values of  $k_3$ , there is sufficient rationale to consider  $n = 3$  to be adequate. As the integral method has higher accuracy, the  $k_3$  generated by this method was considered.

#### 4.3.3.3. Factorial design

A factorial design was carried out to verify the best combination between the values of the independent variables (factors) selected: current density and mode of exposure, as well as their influence level in the treatment. The current density was selected because a statistically significant difference in the sulfate removal efficiency was found as a function of the current density value. The mode of exposure was also varied (continuous and intermittent) to find the best condition with the lowest possible power consumption.

Therefore, seven tests were performed according to the 2<sup>2</sup>-factorial design, in duplicate with center point in triplicate, with exposure time of 5 hours for each. Table 14 contains the matrix with all combinations of the independent variables tested, as well as the corresponding dependent variables (responses), and the mean and standard deviation of the tests that were performed in duplicate and triplicate

The ANOVA showed that the model presented for sulfate removal was significant ( $F_{\text{calculated}} > F_{\text{Tabulated}}$ , for all factors that substantially affected the sulfate removal) (Table 16). Complementarily, the model was validated by the distribution of residuals (Figure 41A). The predicted values by the model (red line) and the observed values (blue circles) are significantly similar, showing a strong correlation between them with an excellent adjustment (99.28%) of the mathematical model, indicating that this model is predictive for sulfate removal.

**Table 16.** Analysis of variance for the sulfate removal variables in 2<sup>2</sup>-factorial design.

Factor	SS	df	MS	$F_{\text{Calc}}$	$F_{\text{Tab}}^a$	$p$
Current density (CD)	338.744	1	338.744	71.0904	9.28	0.003501
Exposure mode (EM)	1472.641	1	1472.641	309.0553	9.28	0.000401
CD by EM	161.671	1	161.671	33.9291	9.28	0.010077
Error	14.295	3	4.765			
Total SS	1987.351	6				

<sup>a</sup> Tabulated values for a 95% confidence level (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978b).

SS: sum of squares;

df: degrees of freedom;

MS: mean square;

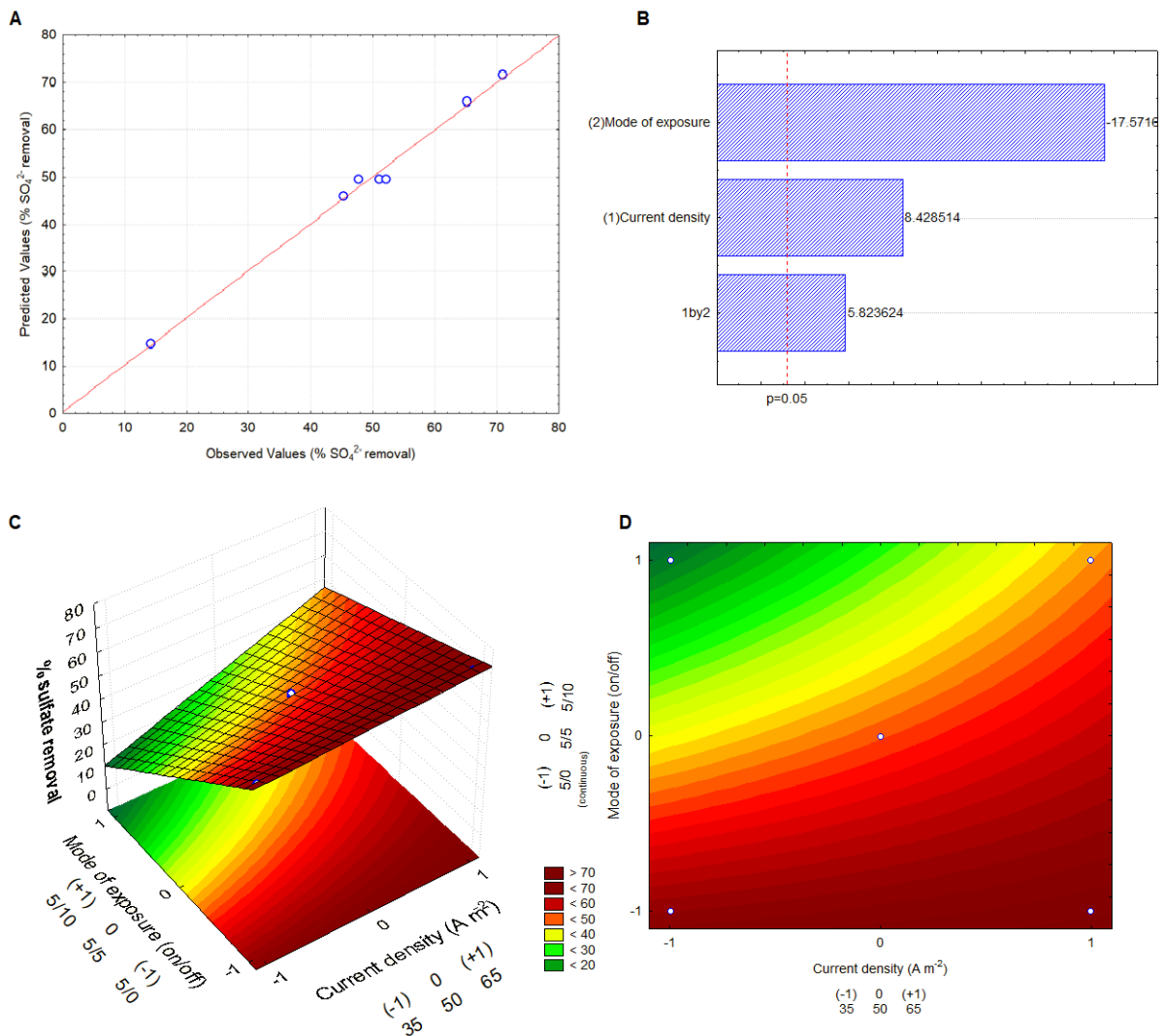
$F$ : F factor;

$p$ : probability.

When performing the factorial design, the influence of each variable over the response, as well as the interaction between them, must be identified. From the Pareto chart (Figure 41B) the effect of each variable tested can be identified, with the interaction between them for sulfate removal, at a confidence level of 95% ( $p \leq 0.05$ ). The current density variable positively influenced the sulfate removal: the higher current density applied the greater removal is

obtained. For the mode of exposure variable, the influence was negative: so the longer the current was off, the amount of sulfate removed decreased. Nevertheless, the interaction between these two variables is positive: when a higher current density (positive) with more time off (negative), is combined, the removal capacity is increased. These results confirm that lower current densities or shorter exposure times release a lower amount of  $Al^{3+}$  to the medium, i.e., a lower amount of coagulant and consequently, a lower sulfate removal is attained.

**Figure 41.** (A) Residual distribution for the sulfate removal, indicating the goodness of fit ( $R^2 = 0.9928$ ) and (B) Pareto chart over the variables and the interaction between them. (C) Contour curve and (D) Response surface for % sulfate removal.



Considering that the variance analysis showed that sulfate removal was significantly affected by both factors individually as well as the interaction between them ( $p < 0.05$ ) (Table 16), the variables' influence was analyzed on response surface plots to determine the level for



each factor that provides the highest removal efficiency for the parameter. Figure 41C shows the 3D contour curve graph, and Figure 41D the 2D response surface for sulfate removal. Analyzing the mode of exposure, the continuous (5/0) provided better sulfate removal, with efficiencies  $>70\%$  for current densities between  $50$  and  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ , in agreement with Figure 39. If the exposure is intermittent (5/5 and 5/10), lower efficiencies occur for all current densities tested, as above deduced from the Pareto chart. The best sulfate removal ( $70.95 \pm 2.02\%$ ) was obtained with continuous mode of exposure and a current density of  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ .

#### 4.3.4. Conclusions

This study has demonstrated that EC is a valuable sulfate removal alternative when compared to conventional precipitation methods, especially for relatively low sulfate concentrations. A minimum current density of  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  along with 4 hours of continuous mode of exposure, or a  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  assay along with 3 hours are convenient for an effective performance.

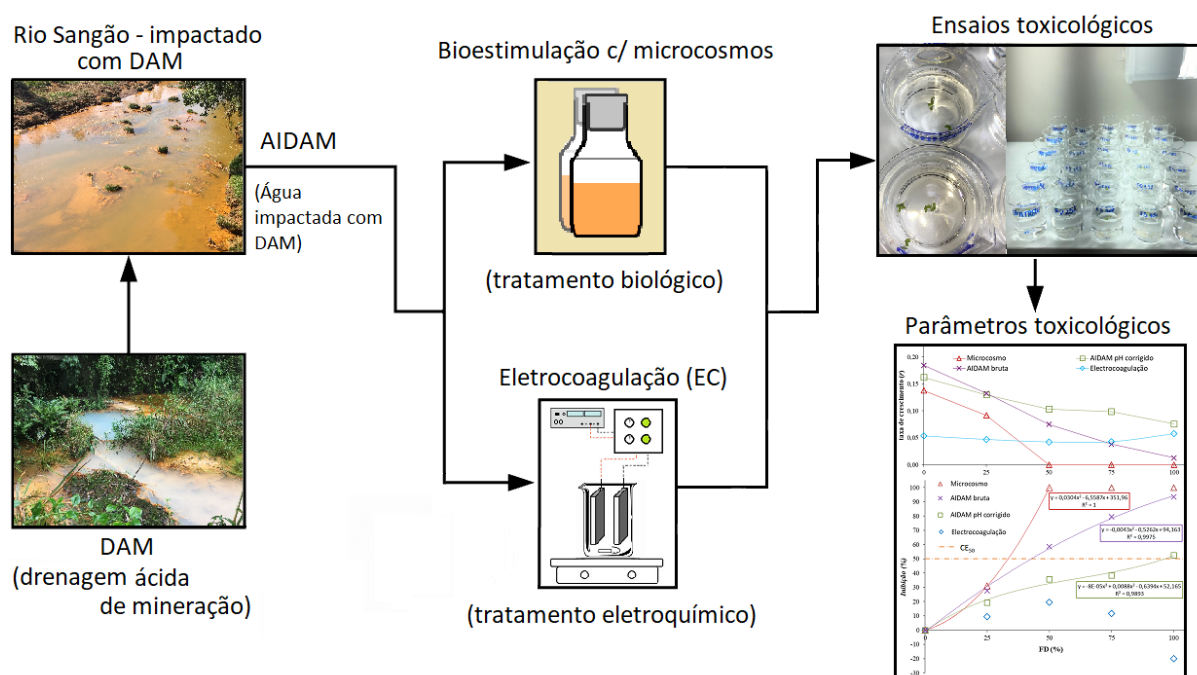
The sulfate removal from MIW by EC on the assays with continuous modes of exposure to the electric current yielded plausible efficiencies of up to  $70.95 \pm 2.02\%$  ( $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ ). With these conditions, the results were better than other studies with significantly higher current densities, although the relatively low removal percentages show the difficulty in the sulfate removal from MIW. The kinetics study showed that this sulfate removal follows a third-order decay. EC was also efficient in increasing the pH values in the MIW to values between 7.70 and 8.75. The incomplete removal of sulfate is tentatively attributed to too high pH values (pH  $> 8$ ) and/or the third order kinetic decay.

The factorial design showed that continuous mode of exposure, together with  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  current density are the best conditions for sulfate removal from MIW by EC, proving that an intermittent mode of exposure does not achieve the same effect. The mathematical model of linear regression obtained from the response-surface methodology presented an excellent adjustment to the original model.

As a continuation of this research, the effects of initial pH, initial sulfate concentration, as well as metallic ions (Fe, Al, and Mn) removal on EC will be thoroughly studied.

**4.4. Artigo 4<sup>8</sup> - Estudo de toxicologia aguda com *Landoltia punctata* como organismo-teste de água de rio impactada com drenagem ácida de mineração (AIDAM) após tratamentos paralelos via bioestimulação de BRS e eletrocoagulação**

**RESUMO GRÁFICO:**



**RESUMO**

Dois diferentes tipos de tratamentos (biológico e eletroquímico) foram propostos nesta pesquisa de doutorado para AIDAM (água impactada com drenagem ácida de mineração), atingindo eficiências de remoção razoáveis, em se tratando de sulfato,  $Fe_t$ ,  $Al^{3+}$  e  $Mn_t$ , bem como acidez. Desta forma, foram realizados ensaios de toxicologia aguda com a macrófita lemnácea *Landoltia punctata*, no intuito de verificar a segurança e garantir usabilidade do efluente resultante do tratamento. As lemnas foram expostas a diferentes diluições de AIDAM (FC - fator de concentração), e a partir destes ensaios, foi calculada a taxa de crescimento ( $r$ ), a taxa de inibição do crescimento ( $I$ ) e as suas respectivas  $CE_{50}$ 's (concentrações de efeito para inibição de crescimento de 50% da população dos organismos). O efluente resultante do tratamento biológico (microcosmos) apresentou uma toxicidade ( $CE_{50} = 33,42\%$ ) superior à apresentada pela AIDAM bruta ( $CE_{50} = 42,78\%$ ), provavelmente devido à presença de sulfeto

<sup>8</sup> Artigo a ser submetido, em fase de preparação.

de hidrogênio, que é resultante do processo de sulfato-redução, cuja remoção total não foi possível, por conta do pH do meio (7,19). Já o efluente resultante do tratamento via EC (eletrocoagulação), de forma contrária, não apresentou toxicidade aguda nos ensaios, não atingiu sequer  $CE_{50}$ , e inclusive apresentou taxa de crescimento superior à taxa apresentada pelo controle (onde há apenas meio de cultivo), evidenciando uma possível função nutriente, podendo desta forma, este efluente apresentar seguramente apresentar potencial para uso não-potável.

**Palavras-chave:** Drenagem ácida de mineração (DAM); águas impactadas por DAM (AIDAM); bioestimulação; eletrocoagulação; Lemna *Landoltia punctata*; teste toxicológico.

#### 4.4.1. Introdução

As atividades de mineração podem causar danos muito severos ao meio ambiente, devido à formação de DAM (Drenagem Ácida de Mineração). Como exemplo no Brasil, a Bacia Carbonífera de Santa Catarina é uma região altamente impactada, pois nela houve intensa exploração do carvão mineral nas décadas passadas e por conta disto, diversas minas, mesmo abandonadas, continuam liberando DAM (LATTUADA et al., 2009; SILVA et al., 2013).

A formação de DAM é resultante da oxidação da pirita ( $FeS_2$ ) através de diversas reações químicas e bioquímicas, que gera um efluente extremamente ácido (pH 2–3), com elevadas concentrações de sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) e íons metálicos (ex. Fe, Al, Mn, Zn, Cu, etc) (SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2013, 2014). A DAM, efluente extremamente corrosivo e tóxico contamina continuamente as águas de superfície e subterrâneas (MAMELKINA et al., 2017) Estas águas são denominadas Águas Impactadas com Drenagem Ácida de Mineração (AIDAM).

A concentração de sulfato na AIDAM pode variar de centenas a milhares de  $mg \cdot L^{-1}$  (NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017). Em estudos anteriores (RODRIGUES et al., 2019, 2020b), através da bioestimulação de BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato) em microcosmos, utilizando casca de camarão (CC) como substrato, atingiram-se razoáveis eficiências de remoção de sulfato (até 99,75%) e íons metálicos (Fe – 99,94%, Al – 99,93%, e Mn – 100%), além de neutralização do pH. Ensaio de eletrocoagulação (EC) também foram testados, obtendo eficiências de remoção de sulfato de até 70,95%, bem como a neutralização de pH (RODRIGUES et al., 2020a), corroborando o que foi encontrado na literatura a respeito de tratamento eletroquímico nos últimos anos (MAMELKINA et al., 2017, 2019; NARIYAN; SILLANPÄÄ; WOLKERSDORFER, 2017; NARIYAN;

WOLKERSDORFER; SILLANPÄÄ, 2018).

A investigação toxicológica dos efluentes pós-tratamentos aqui proposta é essencial, pois assim é possível identificar os riscos corridos por organismos-testes quando submetidos a sua exposição, dado que mudanças fisiológicas não podem ser identificadas apenas por análises físico químicas (COSTA et al., 2008). Os ensaios toxicológicos são de extrema importância, pois avaliam e quantificam os efeitos adversos e quantificam os efeitos adversos, garantindo níveis seguros de exposição (LEE et al., 2018). Através desta exposição ao agente tóxico é possível observar as mudanças metabólicas e morfológicas causadas aos organismos (LALAU et al., 2015).

As lemnas são macrófitas aquáticas que crescem flutuando em ambientes lênticos de água doce. Elas oferecem diversas vantagens como bioindicadores, entre elas: tamanho reduzido, absorção direta de contaminantes pelas folhas, crescimento rápido e requisitos simples de cultura (LALAU, 2014; PEREIRA et al., 2018; PERREAULT et al., 2010; PERREAULT; SAMADANI; DEWEZ, 2013; ZEZULKA et al., 2013). Estes testes já são amplamente usados para determinar impactos numa ampla gama de substâncias lançadas ao meio ambiente (WANG, 1990), sendo também utilizados em várias diretrizes internacionais para avaliação de risco ecotoxicológico (ISO/DIS 20079, 2010; OECD, 2002). As plantas são organismos que exercem papéis fundamentais dentro dos ecossistemas aquáticos, como participação nos ciclos biogeoquímicos através da produção de oxigênio e absorção de nutrientes, bem como fonte de alimento (STEGEMEIER et al., 2017). Desta forma, podem bioacumular poluentes e, por pertencerem ao nível basal da cadeia alimentar, podem bioamplificar os efeitos tóxicos para outros níveis tróficos (LALAU et al., 2015; MARTINS, 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda de dois diferentes tratamentos de AIDAM: biológico (através de microcosmos, bioestimulando BRS) e eletroquímico (através de ensaios de EC) utilizando as lemnáceas *Landoltia punctata*, pois ambos tratamentos propostos proporcionaram bons resultados no tratamento deste tipo de efluente quanto a seus parâmetros físico-químicos.

#### **4.4.2. Materiais e métodos**

##### **4.4.2.1. AIDAM: coleta e caracterização**

A AIDAM utilizada neste estudo foi obtida no Rio Sangão, localizado dentro da Bacia Carbonífera do sul de Santa Catarina, Brasil. As amostras foram coletadas em frascos não-estéreis de polipropileno, sem *headspace* (APHA, 2017), filtradas à vácuo em membrana de

acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, sendo caracterizadas antes e depois dos tratamentos propostos, conforme descrito anteriormente nesta tese pelo item 3.2. Caracterização da AIDAM. A Tabela 6 mostra em detalhe as metodologias usadas nestas análises ( $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Mn}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ , pH e OD [oxigênio dissolvido]).

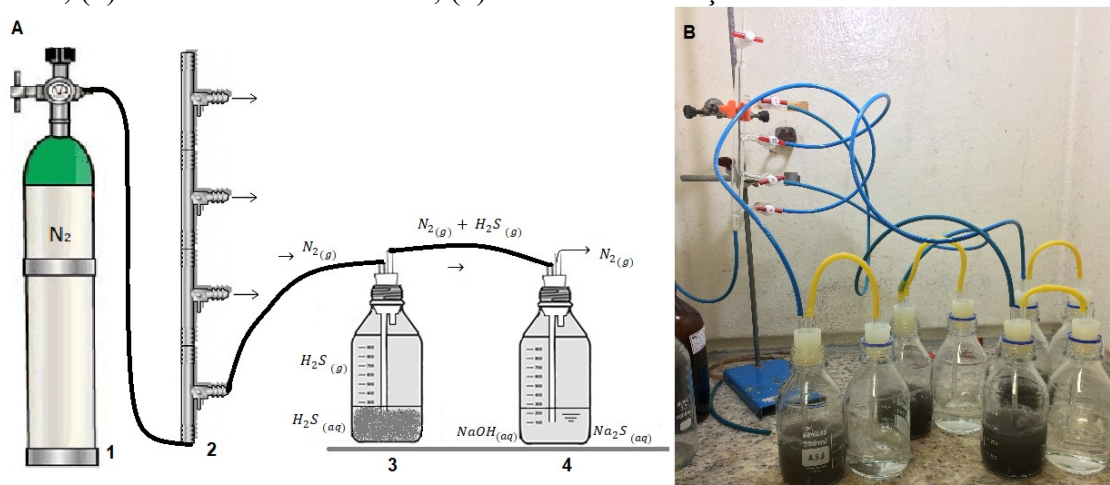
#### ***4.4.2.2. Preparação da casca de camarão (CC), montagem dos microcosmos e remoção do sulfeto de hidrogênio***

As cascas de camarão (CC) foram adquiridas de peixarias, lavadas com água corrente, secas por 72 horas (sendo 48 h à 100 °C e 24 h à 50 °C), pulverizadas em liquidificador, peneiradas (para dar mais homogeneidade e superfície de contato adequadas), e mantidas em dessecador (para evitar absorção de umidade atmosférica), conforme descrito no item 3.3.

Os experimentos com microcosmos para bioestimulação de BRS foram estabelecidos conforme descrito anteriormente no item 3.4, referente ao ensaio nº 3 (CC + AIDAM): frascos denominados microcosmos contendo 260 mL de AIDAM e 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de CC (2,6 g por frasco), foram selados com tampa de silicone e dispostos protegidos da luz, em sala climatizada em  $20 \pm 1$  °C (temperatura controlada com termômetro de parede). A AIDAM, antes de ser inserida no frasco, passou por purga com  $\text{N}_2$ , de modo a atingir anoxia ( $\text{OD} \leq 0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , monitorado com oxímetro). Totalizando 3 frascos, todos eles foram purgados com  $\text{N}_2$  antes e depois de inserir-se a AIDAM. Cada microcosmo foi agitado uma vez ao dia, o ensaio teve duração total de 41 dias, sendo que ao final deste período, o conteúdo dos frascos foi filtrado (em atmosfera de  $\text{N}_2$  e numa capela de exaustão, com membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ ) para ser analisado (procedimento este descrito no item 3.4.1).

Enquanto ocorre a sulfato-redução, simultaneamente gera um aumento na concentração de sulfeto de hidrogênio (Eq. 5). Para removê-lo, foi efetuado um ensaio de remoção com linha de  $\text{N}_2$  (Figura 42 e item 3.4.2). Como o sulfeto de hidrogênio é um gás, a mistura reacional foi purgada com  $\text{N}_2$  e em seguida o  $\text{H}_2\text{S}$  liberado entrou em contato com uma solução de hidróxido de sódio, que reage com sulfeto, formando sulfeto de sódio solúvel (Eq. 21). Cada frasco de microcosmo foi purgado durante 30 minutos. Após este processo, os microcosmos foram filtrados com filtro qualitativo, foi medida a concentração de sulfeto residual e o conteúdo submetido ao ensaio toxicológico.

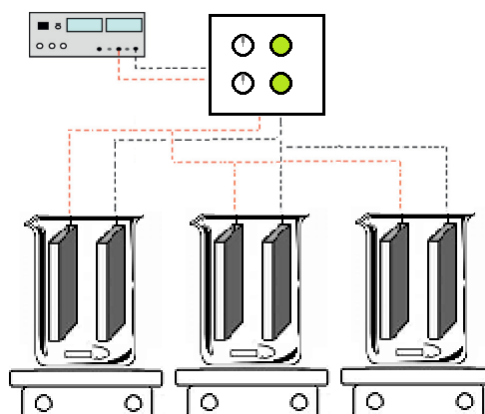
**Figura 42.** (A) Esquema e (B) fotografia para o aparato da remoção de sulfeto de hidrogênio dos microcosmos, sendo (1) cilindro de nitrogênio; (2) trompa de passagem de gás com quatro divisões; (3) frascos de microcosmos; (4) Frasco com solução de NaOH.



#### 4.4.2.3. Ensaios de eletrocoagulação (EC)

Foi montado um sistema eletroquímico em escala de bancada, sendo a metodologia adaptada de Mamelkina et al. (2017) e mostrada no artigo 3 (RODRIGUES et al., 2020a): o reator de EC consistiu em diversos béqueres de plástico de 1 L e neles, foram imersos eletrodos planos de Al (ânodo) e de aço inoxidável (cátodo), sendo espaçados 5 cm um do outro. Os eletrodos possuíam as seguintes dimensões:  $5,65 \times 13,9$  cm, com área útil de  $28,76 \text{ cm}^2$  (ânodo). Durante os ensaios, foi utilizado um agitador magnético, no intuito de homogeneizar o meio, uma vez que ocorre naturalmente um gradiente de concentração de espécies químicas. O painel de controle regulou a passagem de corrente elétrica da fonte (PS-A305D), fornecendo a densidade de corrente de  $65 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ , em modo contínuo de exposição, em direção aos reatores conforme ilustrado pela Figura 43.

**Figura 43.** Perfil da EC efetuada em escala de bancada.



Nos experimentos de EC, foi inserido 1 L de AIDAM em cada béquer, a temperatura foi controlada e mantida a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , e o tempo total de passagem de corrente elétrica foi de 5 horas, sob agitação. Após o término, o efluente tratado foi filtrado à vácuo em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade, caracterizados e submetidos aos ensaios toxicológicos.

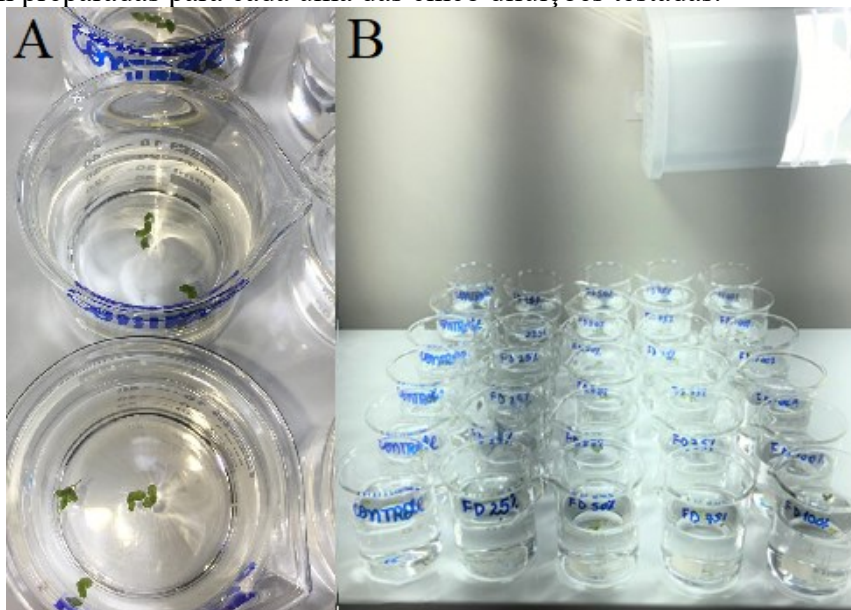
#### 4.4.2.4. Ensaios toxicológicos

As macrófitas *Landoltia punctata* foram coletadas em ambiente natural e adaptadas às condições laboratoriais, conforme preconizam as normas internacionais (ISO/DIS 20079, 2010; OECD, 2002). Para inoculação, as plantas foram cuidadosamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), deixando em repouso por 4 minutos, permitindo assim, remover possíveis microrganismos aderidos, como microalgas e fungos. Em seguida, as plantas foram lavadas duas vezes com água ultrapura, e inseridas em frascos com volume de 100 mL e 3 cm de profundidade, sendo estas amostras cultivadas um mês antes do início dos ensaios toxicológicos. O meio de cultivo foi preparado em pH entre 6,5 e 7,0, à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo diário de luz de 16 h e 8 h no escuro. O procedimento de inoculação das macrófitas no meio de cultura foi feito conforme descrito por Lalau et al. (2014; 2015), adaptado às normas internacionais (ISO/DIS 20079, 2010; OECD, 2002), cuja composição foi a seguinte:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NaNO}_3$  ( $8,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $7,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $4,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  ( $1,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $0,005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $0,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,168 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Para as análises dos efeitos tóxicos, foram feitas diferentes diluições (FC – fator de concentração) da amostra em forma de porcentagem, sendo FC 0 (apenas meio de cultura), 25%, 50%, 75% e 100% (de amostra de cada tratamento sem diluir), com um total de seis replicatas por diluição (Figura 44). O teste iniciou-se ( $t_0$ ) com um total de dez folhas ( $F_0$ ) para cada diluição testada, tendo duração de sete dias. Ao fim do teste ( $t_1$ ), foi medido o número de folhas ( $F_1$ ) e a taxa de crescimento ( $r$ ) foi calculada conforme mostrado anteriormente pela Eq. 22 e a taxa de inibição ( $I$ ) do crescimento, em termos de porcentagem, pela Eq. 23.

Para a determinação de  $\text{CE}_{50}$ , plotou-se a taxa de inibição ( $I$ ) versus FC, e através deste gráfico concentração-resposta, obtém-se a equação da curva através de regressão (linear ou não-linear).  $\text{CE}_{50}$  trata-se da concentração da amostra na qual 50% de efeito é observado, quando comparado ao controle; neste caso, o efeito trata-se da inibição de crescimento.

**Figura 44.** Ensaio com *L. punctata*: (A) dez folhas foram inseridas em cada béquer; (B) Seis réplicas foram preparadas para cada uma das cinco diluições testadas.



Fonte: a autora, em parceria com o LabTox.

### 4.4.3. Resultados e discussão

#### 4.4.3.1. Caracterização de AIDAM, ensaio com microcosmos e de eletrocoagulação

No ensaio de bioestimulação de BRS através dos microcosmos, houve sulfato-redução e remoção dos parâmetros de interesse ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}_t$  e acidez) com sucesso. Similarmente para o tratamento de EC, sulfato, acidez e íons metálicos também foram removidos, sendo todos estes valores ilustrados pela Tabela 17, que mostra a caracterização dos parâmetros de interesse da AIDAM antes e depois do tratamento, bem como as legislações pertinentes, para fins de comparação. O Valor Máximo Permitido (VMP) foi baseado na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), que prevê parâmetros para uso secundário não-potável. A Resolução CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011), também uma legislação ambiental, foi usada apenas de forma complementar, para poder estabelecer comparações com os padrões de lançamento de efluentes.

Embora na AIDAM submetida a tratamento biológico o sulfato inicialmente já atendesse o VMP, a bioestimulação de BRS apresentou uma remoção de sulfato de 98,89%, reiterando a eficiência deste processo. Os íons metálicos também apresentaram remoção igual ou superior a 94% e os parâmetros analisados atenderam aos VMP ao final dos 41 dias de tratamento em microcosmos. O pH apresentou um aumento considerável, atingindo a neutralidade por conta da presença natural de carbonatos na CC. Provavelmente o pH elevado auxiliou no processo de



remoção de íons metálicos, via precipitação em forma de hidróxidos ( $\text{OH}^-$ ), bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e sulfetos ( $\text{S}^{2-}$ ). Os sulfetos não foram quantificados neste momento, pois o efluente tratado ainda não havia sido submetido ao ensaio de purga, para remoção do sulfeto de hidrogênio.

**Tabela 17.** Caracterização físico-química da AIDAM antes e após o tratamento com microcosmos e EC.

Tratam.	Parâmetros	pH	$\text{SO}_4^{2-}$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Fe}_t$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Mn}_t$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Al}^{3+}$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Antes do tratamento		3,20	180 <sup>c</sup>	8,40	1,60	5,00
Após tratamento	Microcosmos	7,19	2,00	0,31	0,10	0,14
Eficiência de remoção		-	98,89%	96,31%	93,75%	97,20%
Antes do tratamento		3,84	300	29,2	2,0	10,84
Após tratamento	EC	8,94	84	0,06	0,3	1,37
Eficiência de remoção		-	72,00%	99,79%	85,00%	87,36%
CONAMA 357 (VMP) <sup>a</sup>	Legislação	6-9	250	5	0,5	0,2
CONAMA 430 (VMP) <sup>b</sup>		5-9	-	15	1,0	-

<sup>a</sup> Valor máximo permitido para águas de classe III, adequada para uso não-potável (BRASIL, 2005).

<sup>b</sup> Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2011).

<sup>c</sup> Por tratar-se de um curso natural, a água de rio está sujeita a variações ao longo das coletas realizadas, e eventos de chuva precedentes a este dia, provavelmente foram o motivo para a concentração de sulfato e dos íons metálicos encontrarem-se bastante reduzidos, comparando-se à média das coletas anteriores.

Já para o tratamento de EC, igualmente razoáveis remoções foram atingidas, além de pH mais alcalino e um tratamento de 5 horas de duração (frente aos 41 dias da bioestimulação). Entretanto, a remoção de sulfato apresentada foi de apenas 72%, mas com concentração adequada ao VMP. Os íons metálicos apresentaram remoção igual ou superior a 85% e com exceção ao Al, se adequaram ao VMP. O íon  $\text{Al}^{3+}$ , embora comece a precipitar em pH igual o superior a 6 (FALAGÁN et al., 2017), em pH próximo a 9 também pode se re-solubilizar em forma de íon aluminato ( $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ ) (KAUR et al., 2018), sendo provavelmente este o motivo de apresentar concentração quase sete vezes superior ao VMP. Embora o ensaio de EC não foi executado numa atmosfera redutora, como foi o caso anterior, não ocorreu formação de sulfetos, portanto a precipitação foi devida à formação de hidróxidos, (bi)carbonatos e/ou sulfatos complexados.

Como em ambos ensaios (bioestimulação e eletrocoagulação) atingiram-se eficiências razoáveis de remoção dos parâmetros analisados (sulfato, íons metálicos e acidez do meio),

foram realizados ensaios toxicológicos, no intuito de garantir segurança e qualidade do efluente tratado.

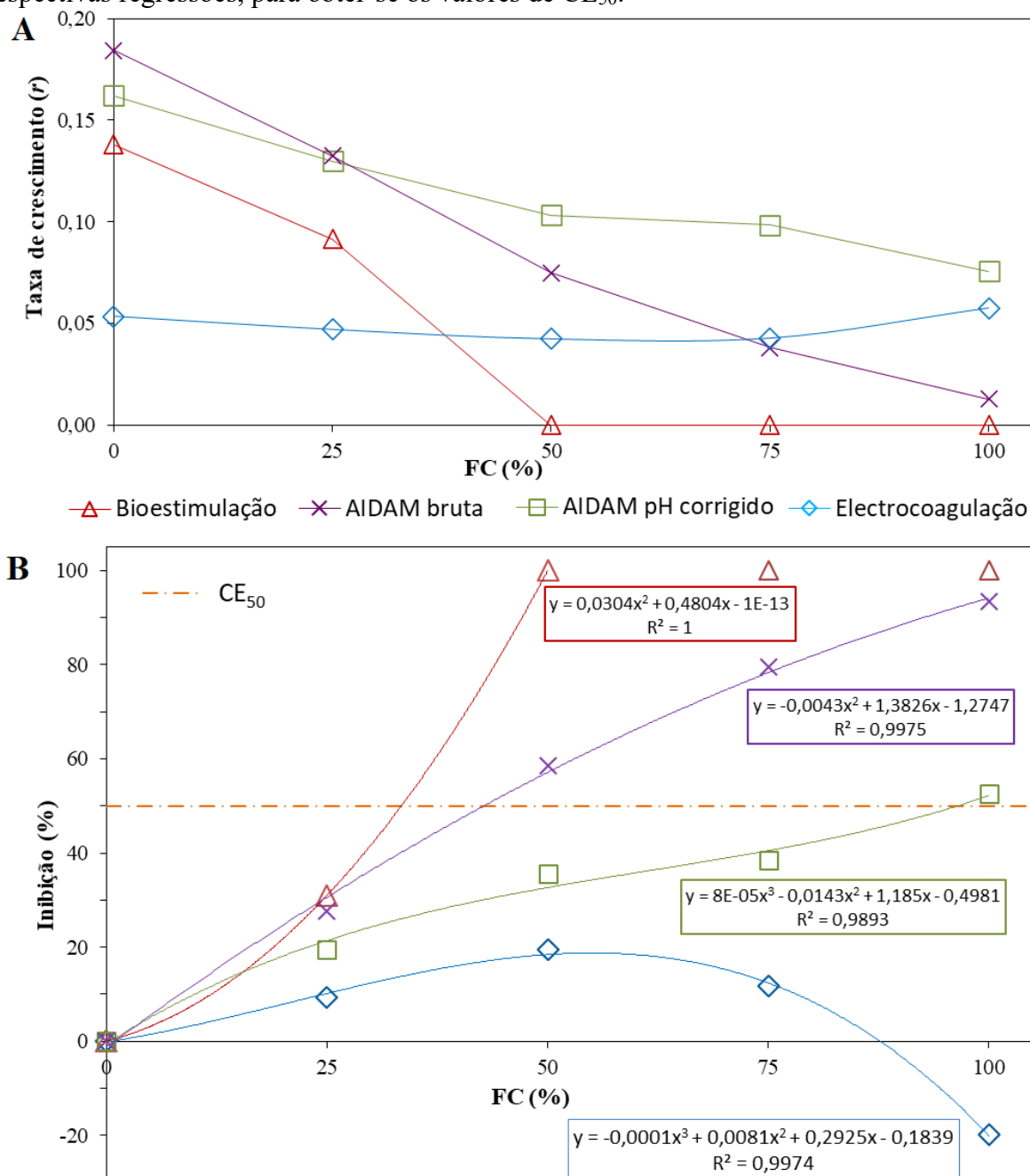
#### 4.4.3.2. *Ensaio toxicológicos*

Os ensaios toxicológicos com *Landoltia punctata* tiveram duração de sete dias, sendo este organismo-teste exposto à diferentes concentrações dos efluentes brutos e tratados. Primeiramente foram calculadas as taxas de crescimento de cada uma das amostras nas diferentes diluições (fator de concentração – FC), sendo este gráfico ilustrado pela Figura 45A.

Percebe-se que à exceção do ensaio de EC, todos apresentaram a mesma tendência: ao aumentar a concentração do efluente, apresenta-se uma queda na taxa de crescimento, destacando-se o ensaio de bioestimulação, que decresceu numa velocidade muito superior aos demais. O ensaio de EC apresentou maior taxa de crescimento com amostra bruta do que no controle (FC = 0), evidenciando que o efluente tratado pode possuir função nutriente para a macrófita.

A partir dos dados de taxa de crescimento, obtiveram-se as taxas de inibição do crescimento, sendo ilustradas pela Figura 45B. Com estes dados de inibição, extraíram-se as suas respectivas regressões não-lineares (equações de 2º e 3º grau) para obtenção das curvas. Como pode ser observado, para o efluente tratado por eletrocoagulação (losango azul), não foi atingida a concentração para 50% de concentração de efeito observado (CE<sub>50</sub>, linha pontilhada laranja), corroborando a não-toxicidade deste efluente tratado. Já o efluente tratado por bioestimulação (triângulo vermelho), apresentou considerável toxicidade, atingindo 100% de inibição já com FC=50%, proporcionando uma curvatura superior da própria AIDAM bruta (xis roxo), que também apresentou considerável toxicidade. Como a norma estabelece que o pH do meio seja entre 6,5 e 7,0, este ensaio teve pH corrigido para 6,8, com solução de NaOH, para assim, verificar se a toxicidade apresentada é por conta do pH ou advinda do efluente em si. Portanto, complementarmente, foi realizado o mesmo ensaio de AIDAM bruta com pH corrigido (quadrado verde), apresentando assim, uma diminuição considerável da toxicidade, evidenciando que a acidez é a grande responsável pela toxicidade da AIDAM, provavelmente porque não permite a precipitação de íons metálicos tóxicos. De forma a padronizar a toxicidade dos ensaios, na Tabela 18 encontra-se os valores de FC para cada um deles, sendo o grau de toxicidade inversamente proporcional à concentração correspondente ao CE<sub>50</sub>.

**Figura 45.** (A) Taxa de crescimento ( $r$ ) de *L. punctata* após 7 dias de exposição à diferentes fatores de concentração. (B) Curvas-resposta, baseadas nas taxas de inibição ( $I$ ) com suas respectivas regressões, para obter-se os valores de  $CE_{50}$ .



**Tabela 18.** Valores de FC para cada um dos ensaios atingir o  $CE_{50}$ , sendo listado em ordem decrescente de toxicidade.

	<b>Grau de toxicidade</b>	<b>Tratamento</b>	<b><math>CE_{50}</math> (FC, %)</b>
↑	mais tóxico	Bioestimulação	33,42
		AIDAM bruta	42,78
		AIDAM pH corrigido	92,37
	menos tóxico	Electrocoagulação	-

Quanto menor o valor de FC para atingir  $CE_{50}$ , mais tóxica apresenta-se esta substância. Em outras palavras: o efluente do ensaio de bioestimulação precisa de uma concentração de 33,42% para inibir metade da população das macrófitas, enquanto que para a AIDAM bruta atingir esta mesma inibição, é necessário um valor de 42,78%, e para AIDAM com pH corrigido, a concentração salta para 92,37%.

A maior toxicidade da AIDAM tratada em microcosmos em relação à AIDAM bruta provavelmente deve-se à presença de sulfeto residual, que foi medido após o ensaio de purga para remoção, e mesmo assim apresentou a concentração de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O tempo de purga de 30 minutos com  $\text{N}_2$  para remoção do  $\text{H}_2\text{S}$  foi determinado em ensaios prévios, pois após este tempo, a concentração de sulfeto permaneceu constante. Isto pode ser explicado pelo  $pka_1$ , que é mostrado pela Eq. 27 (MARTINS et al., 2011):



Como o pH do meio estava muito próximo ao  $pka_1$  (7,19), estequiometricamente as espécies no meio estavam divididas entre  $\text{HS}^-_{(aq)}$  e  $\text{H}_2\text{S}_{(aq)}$ , e para que haja volatilização, a espécie  $\text{HS}^-$  (que não é um gás) deve estar protonada ( $\text{H}_2\text{S}$ ), para então entrar em equilíbrio e ir para a fase gasosa, conforme descrito pela Eq. 28. Portanto o pH do meio não permitiu remoção total do  $\text{H}_2\text{S}$  através da purga, e a concentração residual permaneceu. Também deve-se destacar que este efluente tratado apresenta um odor pungente, distanciando-o então da aplicação do uso secundário não-potável, pois seria inviável utilizá-lo (por exemplo, para rega de jardins ou lavagem de calçadas).

#### 4.4.4. Conclusões

De acordo com os ensaios de toxicologia aguda realizados, entre os tratamentos de AIDAM propostos, o de bioestimulação de BRS (microcosmos) e o de EC, o efluente resultante deste último não apresentou toxicidade, inclusive sugerindo-se que o efluente tratado apresenta potencial nutriente para as macrófitas. Já o efluente do ensaio de bioestimulação, que em termos físico-químicos apresentou menores teores de sulfato e íons metálicos, apresentou elevada toxicidade, inclusive superior à da própria AIDAM bruta. Este fato deve-se provavelmente à presença de sulfeto residual, que remanesceu mesmo após o ensaio de purga, por conta do pH mais alcalino. Por tanto, o tratamento de AIDAM via eletrocoagulação mostrou-se superior ao

tratamento biológico, aliado também ao fato de precisar apenas de cinco horas (comparado aos 41 dias de tratamento biológico) e de a água tratada não apresentar odor.

Análises microscópicas de estruturas da epiderme da planta (estômatos) estão sendo efetuadas, no intuito de visualizar as alterações morfológicas nestes tecidos causadas pelas diferentes exposições.



## 5. CONCLUSÕES - Síntese dos resultados obtidos

---

Os resultados obtidos mostraram, para as condições operacionais testadas na pesquisa, que algumas hipóteses formuladas para este estudo foram confirmadas. Com base nestas hipóteses e nas questões norteadoras, tem-se as seguintes conclusões:

- A casca de camarão mostrou-se substrato adequado nos microcosmos para atividade sulfato-redutora de AIDAM (apresentando razoáveis remoções de acidez,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}_t$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Mn}_t$ ) e desenvolvimento de BRS, enquanto a quitina comercial não apresentou, mesmo quando ocorre correção do pH (adição de  $\text{CaCO}_3$ ). Desta forma, o conjunto da composição da casca de camarão (quitina + proteínas + sais minerais) concatenam como o substrato ideal, e não apenas a quitina, conforme alguns dados da literatura citavam.
- O sequenciamento genético mostrado no artigo 1 detectou BRS (gênero *Desulfosporosinus*), entretanto em abundância relativa bastante reduzida. Os gêneros mais abundantes foram *Citrobacter*, *Clostridium*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. De acordo com a literatura, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Klebsiella*, são fermentadoras e produtoras de quitinase, e estes resultados evidenciaram a peça-chave na relação entre BRS e fermentadoras (e/ou produtoras de quitinase), sugerindo-se uma relação harmônica de sinergia entre o consórcio microbiano: quebrando a imensa série de ligações glicosídicas da macromolécula quitina, deixando substrato disponível para BRS. Dados da literatura apontam que os gêneros *Citrobacter* e *Clostridium* também possuem evidências de realizar a sulfato-redução, mesmo não sendo classificadas como BRS.
- Embora a adição de sedimentos bênticos seja uma fonte próspera para inocular BRS nos microcosmos (e conforme feito no artigo 1), o artigo 2 mostrou que é possível a sulfato-redução sem a adição dos mesmos, evidenciando que apenas a água do rio já o possui suficientemente.
- O sequenciamento genético mostrado no artigo 2, analogamente ao artigo anterior, detectou BRS em abundância bastante reduzida (gêneros *Desulfosporosinus* e *Desulfovibrio*), e predominou os gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus* e *Anaerotruncus*, novamente evidenciando a relação sinérgica entre BRS e fermentadoras e/ou produtoras de quitinase.

- Também foi evidenciada a sulfato-redução nos microcosmos com a prévia remoção dos íons metálicos da AIDAM, mas a comunidade microbiana foi dominada pelo gênero *Comamonas* e minimamente detectado *Desulfovibrio*.
- Nos três ensaios em que foi evidenciada a atividade sulfato-redutora, a abundância bastante reduzida das BRS foi compatível com o encontrado na literatura, corroborando que a dinâmica do processo sulfato redutor está muito mais ligada ao substrato disponível às BRS (que foi fornecido pelas fermentadoras e/ou produtoras de quitinase) do que com a sua abundância das BRS no meio.
- Os dados contidos em livros e outras publicações de outrora sobre BRS podem estar atrelados a métodos menos eficientes na identificação bacteriana, como é o caso do método de cultura, que representa menos de 1% do total da comunidade bacteriana. Portanto, com o uso de novas tecnologias de sequenciamento, como foi usado neste trabalho, podemos estar identificando novos nomes ainda não elencados como BRS, e desta forma, ajudando a escrever novas páginas para a comunidade científica no que tange as BRS e as visões acerca do processo sulfato-redutor. Conforme a própria literatura reporta, pouco sabe-se sobre as BRS, e estamos apenas “arranhando a superfície”.
- No artigo 3, os ensaios de eletrocoagulação demonstraram que maiores tempos de exposição e maiores densidades de corrente proporcionam maiores remoções de sulfato. O ensaio de modo de exposição contínua de corrente elétrica, com densidade de corrente de  $65 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  apresentou a melhor remoção após 5 horas de ensaio, além de pH com valor superior a 8. Após 3 horas de ensaio nesta densidade de corrente, e após 4 horas com  $50 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ , já apresentaram remoção de sulfato convenientes, sendo que estas duas remoções não diferem estatisticamente entre si.
- No artigo 4, na qual foram avaliadas as toxicidades agudas para os dois tipos de tratamentos propostos, o ensaio de eletrocoagulação apresentou-se praticamente atóxico, inclusive sugeriu-se que apresente potencial nutriente para as plantas indicadoras, por apresentar taxa de crescimento maior que no controle. O tratado biológico resultante da bioestimulação de BRS apresentou elevada toxicidade, inclusive superior à da própria AIDAM bruta, aliado ao fato de apresentar forte odor característico de sulfeto. Portanto, neste quesito, o tratamento de eletrocoagulação mostrou-se superior.



## 6. RECOMENDAÇÕES

---

Tendo em vista os resultados obtidos com a presente pesquisa, sugere-se para trabalhos futuros as seguintes recomendações:

- As análises de sequenciamento detectando a expressão do gene da enzima dsr (dissimilatório sulfito-redutase), desta forma, a abordagem da comunidade bacteriana torna-se mais abrangente, pois foca-se na presença do gene responsável pela enzima da sulfato-redução, e não apenas na presença de bactérias classificadas ou não como sulfato-redutoras, pois conforme foi discutido nos artigos 1 e 2, ainda existem diversas lacunas sobre o processo sulfato-redutor, uma vez que diversas bactérias que não são classificadas como BRS são capazes de realizar a sulfato-redução.
- Nos ensaios de eletrocoagulação, realizar as cinéticas de remoção dos íons metálicos Fe<sub>i</sub>, Al<sup>3+</sup> e Mn<sub>i</sub>, bem como suas cinéticas de decaimento.
- A partir dos ensaios de toxicidade aguda, fazer análises microscópicas dos tecidos de *Landoltia punctata* (como os estômatos) após exposição em cada uma das CE<sub>50</sub>, no intuito de visualizar as alterações morfológicas nos tecidos causadas por tal exposição.
- Realizar ensaios de toxicidade crônica e também com organismos superiores, como os crustáceos *Artemia* sp e *Daphnia magna*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ADAIR, J. H.; SUVACI, E.; SINDEL, J. Surface and colloid chemistry. **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**, p. 1–10, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/01622-3>>.
- AL-ABED, S. R.; PINTO, P. X.; MCKERNAN, J.; FELD-COOK, E.; LOMNICKI, S. M. Mechanisms and effectivity of sulfate reducing bioreactors using a chitinous substrate in treating mining influenced water. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 270–277, 2017.
- ALAZARD, D.; JOSEPH, M.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; CAYOL, J. L.; OLLIVIER, B. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. **Extremophiles**, v. 14, n. 3, p. 305–312, 2010.
- AN, C.; HUANG, G.; YAO, Y.; ZHAO, S. Emerging usage of electrocoagulation technology for oil removal from wastewater: a review. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 537–556, 2017.
- ANANTHARAMAN, K.; HAUSMANN, B.; JUNGBLUTH, S. P.; KANTOR, R. S.; LAVY, A.; WARREN, L. A.; RAPPÉ, M. S.; PESTER, M.; LOY, A.; THOMAS, B. C.; BANFIELD, J. F. Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. **ISME Journal**, v. 12, n. 7, p. 1715–1728, 2018.
- ANDIA, J. P. M. **Remoção de boro de águas e efluentes de petróleo por adsorção**. 2009. 138 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, Brasil, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.17771/PUCRio.acad.14605>>. Acesso em: 16 jun. 2017.
- AOYAGI, T.; HAMAI, T.; HORI, T.; SATO, Y.; KOBAYASHI, M.; SATO, Y.; INABA, T.; OGATA, A.; HABE, H.; SAKATA, T. Hydraulic retention time and pH affect the performance and microbial communities of passive bioreactors for treatment of acid mine drainage. **AMB Express**, v. 7, n. 142, p. 1–11, 2017.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2017.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Físico-química vol. 3**. 9ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2004.
- AYALA-PARRA, P.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A. Treatment of acid rock drainage using a sulfate-reducing bioreactor with zero-valent iron. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 97–105, 2016.
- BAO, P.; HU, Z.-Y.; WANG, X.-J.; CHEN, J.; BA, Y.-X.; HUA, J.; ZHU, C.-Y.; ZHONG, M.; WU, C.-Y. Dechlorination of p,p'-DDTs coupled with sulfate reduction by novel sulfate-reducing bacterium *Clostridium* sp. BXM. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 303–310, 2012.
- BAO, Y.; GUO, C.; LU, G.; YI, X.; WANG, H.; DANG, Z. Role of microbial activity in Fe(III) hydroxysulfate mineral transformations in an acid mine drainage-impacted site from the Dabaoshan Mine. **Science of the Total Environment**, v. 616–617, p. 647–657, 2018.
- BAO, Y.; GUO, C.; WANG, H.; LU, G.; YANG, C.; CHEN, M.; DANG, Z. Fe- and S-Metabolizing Microbial Communities Dominate an AMD-Contaminated River Ecosystem and Play Important Roles in Fe and S Cycling. **Geomicrobiology Journal**, v. 34, n. 8, p. 695–705, 2017.

- BARBOSA, L. P.; COSTA, P. F.; BERTOLINO, S. M.; SILVA, J. C. C.; GUERRA-SÁ, R.; LEÃO, V. A.; TEIXEIRA, M. C. Nickel, manganese and copper removal by a mixed consortium of sulfate reducing bacteria at a high COD/sulfate ratio. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2171–2180, 2014.
- BARBOZA, N. R.; AMORIM, S. S.; SANTOS, P. A.; REIS, F. D.; CORDEIRO, M. M.; GUERRA-SÁ, R.; LEÃO, V. A. Indirect manganese removal by *Stenotrophomonas* sp. and *Lysinibacillus* SP. isolated from Brazilian mine water. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.
- BARIKANI, M.; OLIAEI, E.; SEDDIQI, H.; HONARKAR, H. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, v. 23, p. 307–326, 2014.
- BATTAGLIA-BRUNET, F.; CROUZET, C.; BURNOL, A.; COULON, S.; MORIN, D.; JOULIAN, C. Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. **Water Research**, v. 46, p. 3923–3933, 2012.
- BECERRA, C. A. **Role of sulfate-reducing bacteria in the attenuation of acid mine drainage through sulfate and iron reduction**. 2010. 138 p. Ph.D Thesis. University of Massachusetts Amherst, Amherst, 2010. Disponível em: <[https://scholarworks.umass.edu/open\\_access\\_dissertations/323/](https://scholarworks.umass.edu/open_access_dissertations/323/)>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- BECERRA, C. A.; LÓPEZ-LUNA, E. L.; ERGAS, S. J.; NÜSSLEIN, K. Microcosm-based study of the attenuation of an acid mine drainage-impacted site through biological sulfate and iron reduction. **Geomicrobiology Journal**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2009.
- BELOLLI, M.; QUADROS, J.; GUIDI, A. **A História do Carvão de Santa Catarina**. Criciúma-SC: Imprensa Oficial do Estado de Santa Catarina, 2002. v. I
- BENER, S.; BULCA, Ö.; PALAS, B.; TEKIN, G.; ATALAY, S.; ERSÖZ, G. Electrocoagulation process for the treatment of real textile wastewater: Effect of operative conditions on the organic carbon removal and kinetic study. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 129, p. 47–54, 2019.
- BERTOLINI, T. C. R.; FUNGARO, D. A. Estudos de equilíbrio e modelagem cinética da adsorção do corante cristal violeta sobre zeólitas de cinzas leve e pesada de carvão. **3rd International Workshop advances in cleaner production**, p. 1–10, 2011. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/267842224>>. Acesso em: 2 fev. 2017.
- BHATIA, S.; SHARMA, D. K. Thermophilic desulfurization of dibenzothiophene and different petroleum oils by *Klebsiella* sp. 13T. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3491–3497, 2012.
- BIANCO, F.; MONTEVERDE, G.; RACE, M.; PAPIRIO, S.; ESPOSITO, G. Comparing performances, costs and energy balance of ex situ remediation processes for PAH-contaminated marine sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19363–19374, 2020.
- BOMBERG, M.; ARNOLD, M.; KINNUNEN, P. Characterization of the bacterial and sulphate reducing community in the alkaline and constantly cold water of the closed kotalahti mine. **Minerals**, v. 5, p. 452–472, 2015.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 1978a.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Fractional factorial design at two levels. In: **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 1978b. p. 374–418.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 357**, n. 053, p. 58–63, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2018.

BRASIL. Plano nacional de energia 2030: geração termelétrica - carvão mineral. **Ministério de Minas e Energia**, p. 146, 2007. Disponível em: <[http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-165/topico-173/PNE 2030 - Geração Termelétrica \(Carvão Mineral\).pdf](http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-165/topico-173/PNE%2030%20-%20Gera%C3%A7%C3%A3o%20Termel%C3%A9trica%20(Carv%C3%A3o%20Mineral).pdf)>. Acesso em: 6 maio. 2019.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 430**, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 1 jul. 2018.

BRASIL. CPRM-Serviço Geológico do Brasil. **Carvão Mineral**, 2014. Disponível em: <<http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Canal-Escola/Carvao-Mineral-2558.html>>. Acesso em: 20 out. 2018.

BRASIL. Departamento Nacional de produção Mineral. **Anuário Mineral estadual de SC**, p. 95, 2017. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-estadual/santa-catarina/anuario-mineral-estadual-santa-catarina-2017-anos-base-2014-2015-e-2016.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2018.

BRASIL. 11º Relatório de monitoramento dos indicadores ambientais - ação civil pública nº 388 93.8000.533-4. **Processo nº 2000.72.04.002543-9**, p. 1–308, 2018.

BUZZI, D. C.; VIEGAS, L. S.; RODRIGUES, M. A. S.; BERNARDES, A. M.; TENÓRIO, J. A. S. Water recovery from acid mine drainage by electrodialysis. **Minerals Engineering**, v. 40, p. 82–89, 2013.

BWAPWA, J. K.; JAIYEOLA, A. T.; CHETTY, R. Bioremediation of acid mine drainage using algae strains: A review. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 62–70, 2017.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.

CAMILOTI, P. R.; MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 2014.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 4516–4522, 2011.

CETEM. Projeto conceitual para recuperação ambiental da bacia Carbonífera sul catarinense vol. 3. **Relatório Técnico SIECESC 46/2000**, p. 1–58, 2001. Disponível em: <[http://www.siecesc.com.br/pdf/conceitual\\_volume\\_iii.pdf](http://www.siecesc.com.br/pdf/conceitual_volume_iii.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2017.

CHEN, L. X.; HUANG, L. N.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; KUANG, J. L.; HUA, Z. S.; LIU, J.; SHU, W. S. Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 150–158, 2016.

CHRISTOFF, A. P.; SEREIA, A. F. R.; BOBERG, D. R.; MORAES, R. L. V.; OLIVEIRA, L. F. V. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **White Paper: Bacterial NGS Sequencing**, 2017.

CLARKE, P. H.; TRACEY, M. V. The occurrence of chitinase in some bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 188–196, 1956.

CNRH. Conjunto de normas legais: recursos hídricos. **Resolução nº 54, de 28 de novembro de 2005**, v. 2005, p. 1–3, 2005.

CNRH. Conjunto de normas legais: recursos hídricos. **Ministério no Meio Ambiente**, n. 8<sup>a</sup> ed, p. 1–684, 2014.

COBOS, M. A.; YOKOYAMA, M. T. Clostridium paraputrificum var. Ruminantium: colonisation and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. **Rumen Ecology Research Planning**, p. 152–162, 1995. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=Re5llj\\_G9A0C&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=Re5llj_G9A0C&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 10 dez. 2017.

COHEN, R. R. H. Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 1146–1157, 2006.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, J. M.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. Removal sulfate and metals Fe<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, and Zn<sup>+2</sup> from acid mine drainage in an anaerobic sequential batch reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 1985–1989, 2017.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of synthetic wastewaters at different levels of sulfate and COD/sulfate ratios in Horizontal-Flow Anaerobic Reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 3, p. 383–393, 2007.

DAS, B. K.; ROY, S.; DEV, S.; DAS, D.; BHATTACHARYA, J. Improvement of the degradation of sulfate rich wastewater using sweetmeat waste (SMW) as nutrient supplement. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 796–807, 2015.

DAUBERT, L. N.; BRENNAN, R. A. Passive remediation of acid mine drainage using crab shell chitin. **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 10, p. 1475–1480, 2007.

DEMERS, I.; BENZAAZOUA, M.; MBONIMPA, M.; BOUDA, M.; BOIS, D.; GAGNON, M. Valorisation of acid mine drainage treatment sludge as remediation component to control acid generation from mine wastes, part 1: material characterization and laboratory kinetic testing. **Minerals Engineering**, v. 76, p. 109–116, 2015.

DEV, S.; PATRA, A. K.; MUKHERJEE, A.; BHATTACHARYA, J. Suitability of different growth substrates as source of nitrogen for sulfate reducing bacteria. **Biodegradation**, v. 26, n. 6, p. 415–430, 2015.

DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, J. Understanding the performance of sulfate reducing bacteria based packed bed reactor by growth kinetics study and microbial profiling. **Journal of Environmental Management**, v. 177, p. 101–110, 2016.

DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, J. Optimization of the operation of packed bed bioreactor to improve the sulfate and metal removal from acid mine drainage. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 135–144, 2017.

EPAGRI; CEPA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2018-2019**, p. 197, 2019. Disponível em: <[http://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepapublicacoes/Sintese\\_2018\\_19.pdf](http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepapublicacoes/Sintese_2018_19.pdf)>.

FALAGÁN, C.; YUSTA, I.; SÁNCHEZ-ESPAÑA, J.; JOHNSON, D. B. Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. **Minerals Engineering**, v. 106, p. 79–85, 2017.

FAO. **Water quality for agriculture**. Rome, Italy: FAO Irrigation and drainage paper, 1985.

FAO. Design and analysis of experiments. In: JAYARAMAN, K. (Ed.). **A statistical manual for forestry research**. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 1999. p. 234.

FERREIRA, B. C. S.; LIMA, R. M. F. L.; LEÃO, V. A. Remoção de sulfato de efluentes industriais por precipitação. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, n. 4, p. 361–368, 2011.

FLORENTINO, A. P.; BRIENZA, C.; STAMS, A. J. M.; SÁNCHEZ-ANDREA, I. *Desulfurella amilsii* sp. nov., a novel acidotolerant sulfur-respiring bacterium isolated from river sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1249–1253, 2016a.

FLORENTINO, A. P.; STAMS, A. J. M.; SÁNCHEZ-ANDREA, I. Genome sequence of *desulfurella amilsii* strain TR1 and comparative genomics of *desulfurellaceae* family. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

FLORENTINO, A. P.; WEIJMA, J.; STAMS, A. J. M.; SÁNCHEZ-ANDREA, I. Sulfur reduction in acid rock drainage environments. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 11746–11755, 2015.

FLORENTINO, A. P.; WEIJMA, J.; STAMS, A. J. M.; SÁNCHEZ-ANDREA, I. Ecophysiology and Application of Acidophilic Sulfur-Reducing Microorganisms. In: RAMPELOTTO, P. H. (Ed.). **Biotechnology of Extremophiles: Advances and challenges**. Chapter 5. Porto Alegre: Springer, 2016b. p. 141–175.

FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**. 3rd. ed. 967 p. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

FOLLMANN, H. V. D. M.; SOUZA, E.; BATTISTELLI, A. A.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Determination of the optimal electrocoagulation operational conditions for pollutant removal and filterability improvement during the treatment of municipal wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 36, n. 101295, p. 1–10, 2020.

FREDERIKSEN, W. *Citrobacter*. In: WHITMAN, W. B.; F. RAINEY; P. KÄMPFER; M. TRUJILLO; J. CHUN; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Copenhagen, Denmark: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–23.

FRIPP, J.; ZIEMKIEWICZ, P. F.; CHARKAVORKI, H. Acid mine drainage treatment. **Ecosystem Management and Restoration Research Program-Technical Notes Collection (ERDC TN-EMRRP-SR-14)**, p. 1–7, 2000. Disponível em: <<https://sav.el.ercd.dren.mil/elpubs/pdf/sr14.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p. 1644–1652, 2015.

GOLDHABER, M. B. Sulfur-rich sediments. In: HOLLAND, H. D.; TUREKIAN, K. K. (Ed.).

**Treatise on Geochemistry**. Chapter 7.10: Pergamon, 2003. p. 257–288.

GREIN, F.; RAMOS, A. R.; VENCESLAU, S. S.; PEREIRA, I. A. C. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 145–160, 2013.

GREMBI, J. A.; SICK, B. A.; BRENNAN, R. A. Remediation of high-strength mine-impacted water with mixed organic substrates containing crab shell and spent mushroom compost. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 2, p. 1–10, 2016.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. Klebsiella. In: WHITMAN, W. B.; RAINEY, F.; KÄMPFER, P.; TRUJILLO, M.; CHUN, J.; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Paris, France: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–26.

GUIMARÃES, D.; LEÃO, V. A. Batch and fixed-bed assessment of sulphate removal by the weak base ion exchange resin Amberlyst A21. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 209–215, 2014.

GUO, J.; KANG, Y.; FENG, Y. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 278–285, 2017.

HAMEED, B. H.; TAN, I. A. W.; AHMAD, A. L. Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol on coconut husk-based activated carbon. **Chemical Engineering Journal**, v. 144, p. 235–244, 2008.

HAO, O. J.; CHEN, J. M.; HUANG, L.; BUGLASS, R. L. Sulfate-reducing bacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 155–187, 1996.

HAO, T.; XIANG, P.; MACKEY, H. R.; CHI, K.; LU, H.; CHUI, H.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; CHEN, G.-H. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, v. 65, p. 1–21, 2014.

HELFFERICH, F. G. Concepts, definitions, conventions, and notation. In: **Comprehensive Chemical Kinetics**. vol. 40: Elsevier, 2004. p. 7–16.

HESPANHOL, I.; MIERZWA, J. C.; RODRIGUES, L. D. B.; SILVA, M. C. C. Federação das indústrias do estado do Rio de Janeiro (FIRJAM). **Manual de conservação e reúso da água na indústria**, n. 1, p. 1–28, 2006. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/bis/manual-de-conservacao-e-reuso-da-agua-na-industria,3aa6381b363dd510VgnVCM1000004c00210aRCRD>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

HIPPE, H.; STACKEBRANDT, E. Desulfosporosinus. In: WHITMAN, W. B.; RAINEY, F.; KÄMPFER, P.; TRUJILLO, M.; CHUN, J.; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Braunschweig, Germany: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–11.

HO, Y. S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 3, p. 681–689, 2006.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 451–465, 1999.

HONG, H.; PRUDEN, A.; REARDON, K. F. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 1, p. 52–64, 2007.



HOSSINI, H.; MAKHDOUMI, P.; RASTEGAR, S. O.; MOHAMMADI-MOGHADAM, F.; GHAFFARI, H. R.; JAVID, A.; MIRZAEI, N. Optimization of the electrocoagulation process for sulfate removal using response surface methodology. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 47, n. Special Issue D, p. 63–71, 2015. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/7ab0/78ef5168fb7a4d999844aca1d50abe1c8e7d.pdf>>.

Acesso em: 1 dez. 2019.

HUA, Z. S.; HAN, Y. J.; CHEN, L. X.; LIU, J.; HU, M.; LI, S. J.; KUANG, J. L.; CHAIN, P. S.; HUANG, L. N.; SHU, W. S. Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics. **The ISME Journal**, v. 9, n. 6, p. 1280–1294, 2015.

HUSSAIN, A.; HASAN, A.; JAVID, A.; QAZI, J. I. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. **3 Biotech**, v. 6, n. 119, p. 1–10, 2016.

ISO/DIS 20079. International Organization for Standardization/Draft International Standard. **Water quality-Determination of toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*)-Duckweed growth inhibition test**, p. 1–23, 2010.

JEREMIAS, T. C. **Estudo do potencial de biossorventes de baixo custo para remediação de águas fluviais contaminadas com drenagem ácida mineral (DAM) visando seu uso secundário não potável**. 2019. Dissertação (Mestrado em Energia e Sustentabilidade), Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.

JING, Q.; ZHANG, M.; LIU, X.; LI, Y.; WANG, Z.; WEN, J. Bench-scale microbial remediation of the model acid mine drainage: Effects of nutrients and microbes on the source bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 128, p. 117–121, 2018.

JO, J. H.; KENNEDY, E. A.; KONG, H. H. Research techniques made simple: bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing in cutaneous research. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, p. 23–27, 2016.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, n. 4, p. 307–317, 1998.

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

KARDAS, I.; STRUSZCZYK, M. H.; KUCHARSKA, M.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; VAN DAM, J. E. G.; CIECHAŃSKA, D. Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications. In: NAVARD, P. (Ed.). **The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)**. Chapter 11. Viena: Springer-Verlag Wien, 2012. p. 329–373.

KAUR, G.; COUPERTHWAITE, S. J.; HATTON-JONES, B. W.; MILLAR, G. J. Alternative neutralisation materials for acid mine drainage treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 22, p. 46–58, 2018.

KEFENI, K. K.; MSAGATI, T. A. M.; MAMBA, B. B. Acid mine drainage: prevention, treatment options, and resource recovery: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 151, p. 475–493, 2017.

KEFENI, K. K.; MSAGATI, T. M.; MAREE, J. P.; MAMBA, B. B. Metals and sulphate removal from acid mine drainage in two steps via ferrite sludge and barium sulphate formation. **Minerals Engineering**, v. 81, p. 79–87, 2015.

- KIRAN, M. G.; PAKSHIRAJAN, K.; DAS, G. Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: mechanism and cell surface characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 62–70, 2017.
- KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2013.
- KOLMERT, A.; JOHNSON, D. B. Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 8, p. 836–843, 2001.
- KONOPKA, A.; LINDEMANN, S.; FREDRICKSON, J. Dynamics in microbial communities: unraveling mechanisms to identify principles. **The ISME Journal**, v. 9, p. 1488–1495, 2015.
- KOSCHORRECK, M. Microbial sulphate reduction at a low pH. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 3, p. 329–342, 2008.
- KREBS, A. S. J.; AMBONI, T. M.; ROMANO NETO, R.; ZANUZ, M.; GOMES, C. J. B.; AMARAL, J. E. Monitoramento das bocas de minas abandonadas com drenagens ácidas, na área correspondente à Bacia Carbonífera de Santa Catarina. **XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços**, p. 1–16, 2010. Disponível em: <[http://www.cprm.gov.br/publique/media/evento\\_PAP003018.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/evento_PAP003018.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2017.
- KUMAR, A.; KUMAR, D.; GEORGE, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 263–272, 2018.
- KUMAR, N.; OMOREGIE, E. O.; ROSE, J.; MASON, A.; LLOYD, J. R.; DIELS, L.; BASTIAENS, L. Inhibition of sulfate reducing bacteria in aquifer sediment by iron nanoparticles. **Water Research**, v. 51, p. 64–72, 2014.
- LALAU, C. M. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre em macrófitas da espécie *Landoltia punctata***. 2014. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. Disponível em: <<http://tede.ufsc.br/teses/PGEA0493-D.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2019.
- LALAU, C. M.; MOHEDANO, R. de A.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; DOS SANTOS, R. W.; DA COSTA, C. H.; VICENTINI, D. S.; MATIAS, W. G. Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. **Protoplasma**, v. 252, n. 1, p. 221–229, 2015.
- LALAU, C. M.; SIMIONI, C.; VICENTINI, D. S.; OURIQUES, L. C.; MOHEDANO, R. A.; PUERARI, R. C.; MATIAS, W. G. Toxicological effects of AgNPs on duckweed (*Landoltia punctata*). **Science of The Total Environment**, v. 710, n. 136318, p. 1–10, 2020.
- LATTUADA, R. M.; MENEZES, C. T. B.; PAVEL, P. T.; PERALBA, M. C. R.; DOS SANTOS, J. H. Z. Determination of metals by total reflection X-ray fluorescence and evaluation of toxicity of a river impacted by coal mining in the south of Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 531–537, 2009.
- LE PAPE, P.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; PARMENTIER, M.; JOULIAN, C.; GASSAUD, C.; FERNANDEZ-ROJO, L.; GUIGNER, J. M.; IKOGOU, M.; STETTEN, L.; OLIVI, L.;

- CASIOT, C.; MORIN, G. Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 764–772, 2017.
- LECHNER, U. Sedimentibacter. In: WHITMAN, W. B.; RAINEY, F.; KÄMPFER, P.; TRUJILLO, M.; CHUN, J.; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Halle, Germany: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–7.
- LEE, B. M.; KACEW, S.; KIM, H. S.; LU, F. C. **Lu's Basic Toxicology: fundamentals, target organs, and risk assessment**. 7th. ed. Boca Raton: CRC Press, 2018.
- LEFTICARIU, L.; WALTERS, E. R.; PUGH, C. W.; BENDER, K. S. Sulfate reducing bioreactor dependence on organic substrates for long-term remediation of acid mine drainage: field experiments. **Applied Geochemistry**, v. 63, n. December, p. 70–82, 2015.
- LEI, P.; GAN, M.; YANG, B.; LIU, X.; YANG, S.; ZHOU, S. Introduction to high-throughput sequencing technologies and review of its application in bioleaching. **Solid State Phenomena**, v. 262, p. 425–428, 2017.
- LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. 3rd. ed. 684 p. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452–463, 2007.
- LIU, D.; ZHU, Y.; LI, Z.; TIAN, D.; CHEN, L.; CHEN, P. Chitin nanofibrils for rapid and efficient removal of metal ions from water system. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 483–489, 2013.
- LIU, H.; YU, T.; LIU, Y. Sulfate reducing bacteria and their activities in oil sands process-affected water biofilm. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 116–122, 2015.
- LIU, X.; GONG, W.; LIU, L. Treatment of sulfate-rich and low pH wastewater by sulfate reducing bacteria with iron shavings in a laboratory. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 3, p. 595–600, 2014.
- LIU, Z.; MASZENAN, A. M.; LIU, Y.; NG, W. J. A brief review on possible approaches towards controlling sulfate-reducing bacteria (SRB) in wastewater treatment systems. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 10, p. 2799–2807, 2014.
- LOBO-RECIO, M. Á.; LAPOLLI, F. R.; BELLI, T. J.; FOLZKE, C. T.; TARPANI, R. R. Z. Study of the removal of residual aluminum through the biopolymers carboxymethylcellulose, chitin, and chitosan. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, n. 7–9, p. 1735–1743, 2013.
- LUZ, A. B.; SAMPAIO, J. A. Desativação de Minas. **Série Tecnologia Ambiental** 79, p. 50, 2015. Disponível em: <<http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/1831/1/STA-79.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2016.
- MA, Q.; QU, Y.-Y.; ZHANG, X.-W.; SHEN, W.-L.; LIU, Z.-Y.; WANG, J.-W.; ZHANG, Z.-J.; ZHOU, J.-T. Identification of the microbial community composition and structure of coal-mine wastewater treatment plants. **Microbiological Research**, v. 175, p. 1–5, 2015.
- MA, Y. F.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Y.; CHEN, D. W.; ZHU, Y.; ZHENG, H.; WANG, S. Y.; JIANG, C. Y.; ZHAO, G. P.; LIU, S. J. The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6812–6819, 2009.

- MACAN, J. M.; TEIXEIRA, G. A.; PICH, C. T.; PEDROSA, R. C.; FÁVERE, V. T.; GEREMIAS, R. Avaliação da toxicidade de drenagem ácida de mina de carvão, utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 3, p. 275–280, 2012. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2200>>. Acesso em: 1 dez. 2019.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14<sup>a</sup> ed. 960 p. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAIER, R. M. Bacterial growth. In: PEPPER, I.; GERBA, C.; GENTRY, T.; MAIER, R. M. (Ed.). **Environmental microbiology**. 2nd. ed. Chapter 3: Elsevier Inc., 2009. p. 37–54.
- MALLAKUNTALA, M. K.; VAIKUNTAPU, P. R.; BHUVANACHANDRA, B.; DAS, S. N.; PODILE, A. R. Transglycosylation by a chitinase from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* generates longer chitin oligosaccharides. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5113, p. 1–12, 2017.
- MAMELKINA, M. A.; COTILLAS, S.; LACASA, E.; SÁEZ, C.; TUUNILA, R.; SILLANPÄÄ, M.; HÄKKINEN, A.; RODRIGO, M. A. Removal of sulfate from mining waters by electrocoagulation. **Separation and Purification Technology**, v. 182, p. 87–93, 2017.
- MAMELKINA, M. A.; TUUNILA, R.; SILLANPÄÄ, M.; HÄKKINEN, A. Systematic study on sulfate removal from mining waters by electrocoagulation. **Separation and Purification Technology**, v. 216, p. 43–50, 2019.
- MARTÍNEZ, I.; MOHAMED, E.-S.; SANTOS, V. E.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA-OCHOA, F.; DÍAZ, E. Metabolic and process engineering for biodesulfurization in Gram-negative bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 262, p. 47–55, 2017.
- MARTINS, M. da C. **Avaliação genotóxica em hortaliças cultivadas em áreas de exploração de carvão: potencial mutagênico e riscos a saúde humana**. 2014. p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.unesc.net/handle/1/3442>>. Acesso em: 1 dez. 2019.
- MARTINS, M.; SANTOS, E. S.; FALEIRO, M. L.; CHAVES, S.; TENREIRO, R.; BARROS, R. J.; BARREIROS, A.; 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.
- MARTINS, R. J. E. **Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas**. 2004. 588 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2004. Disponível em: <[https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2004/1/PhD Thesis Martins RJE.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2004/1/PhD%20Thesis%20Martins%20RJE.pdf)>. Acesso em: 5 maio. 2019.
- MASINDI, V.; OSMAN, M. S.; ABU-MAHFOUZ, A. M. Integrated treatment of acid mine drainage using BOF slag, lime/soda ash and reverse osmosis (RO): Implication for the production of drinking water. **Desalination**, v. 424, p. 45–52, 2017.
- MATTEI, M. R.; D'ACUNTO, B.; ESPOSITO, G.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F. Mathematical modeling of competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens, and methanogens in multispecies biofilms. **Desalination and Water Treatment**, p. 1–9, 2014.
- MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A. I.; MESA, V.; SÁNCHEZ, J.; GOLYSHINA, O. V.; FERRER, M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 475, p. 1–17, 2015.
- MESA, V.; GALLEGO, J. L. R.; GONZÁLEZ-GIL, R.; LAUGA, B.; SÁNCHEZ, J.; MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A. I. Bacterial, archaeal, and eukaryotic diversity across

- distinct microhabitats in an acid mine drainage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- METCALF, L.; EDDY, H. P. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4th. ed. New York: McGraw Hill, 2003.
- MIRJAFARI, P.; BALDWIN, S. A. Decline in performance of biochemical reactors for sulphate removal from mine-influenced water is accompanied by changes in organic matter characteristics and microbial population composition. **Water**, v. 8, n. 124, p. 1–18, 2016.
- MITRA, S.; PRAMANIK, K.; GHOSH, P. K.; SOREN, T.; SARKAR, A.; DEY, R. S.; PANDEY, S.; MAITI, T. K. Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth promotion under Cd stress. **Microbiological Research**, v. 210, p. 12–25, 2018.
- MIZUTANI, K.; FISHER-POWER, L. M.; SHI, Z.; CHENG, T. Cu and Zn adsorption to a terrestrial sediment: Influence of solid-to-solution ratio. **Chemosphere**, v. 175, p. 341–349, 2017.
- MONTANHER, S. F.; OLIVEIRA, E. A.; ROLLEMBERG, M. C. Utilization of agro-residues in the metal ions removal from aqueous solutions. In: LEWINSKY, A. A. (Ed.). **Hazardous materials and wastewater: treatment removal and analysis**. Chapter 2. New York: Nova Science Publishers, 2007. p. 51–78.
- MOODLEY, I.; SHERIDAN, C. M.; KAPPELMEYER, U.; AKCIL, A. Environmentally sustainable acid mine drainage remediation: Research developments with a focus on waste/by-products. **Minerals Engineering**, v. 126, p. 207–220, 2018.
- MOOSA, S.; NEMAT, M.; HARRISON, S. T. L. 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.
- MOREIRA, R. F. P. M.; VANDRESEN, S.; LUIZ, D. B.; JOSÉ, H. J.; PUMA, G. L. Adsorption of arsenate, phosphate and humic acids onto acicular goethite nanoparticles recovered from acid mine drainage. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 1, p. 652–659, 2017.
- MORET, A.; RUBIO, J. Sulphate and molybdate ions uptake by chitin-based shrimp shells. **Minerals Engineering**, v. 16, n. 8, p. 715–722, 2003.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008.
- NAJIB, T.; SOLGI, M.; FARAZMAND, A.; HEYDARIAN, S. M.; NASERNEJAD, B. Optimization of sulfate removal by sulfate reducing bacteria using response surface methodology and heavy metal removal in a sulfidogenic UASB reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 3256–3265, 2017.
- NAME, T.; SHERIDAN, C. Remediation of acid mine drainage using metallurgical slags. **Minerals Engineering**, v. 64, p. 15–22, 2014.
- ÑANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 34–44, 2012.
- ÑANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors. **Hydrometallurgy**, v. 150, p. 222–226, 2014.
- ÑANCUCHEO, I.; ROWE, O. F.; HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. Solid and liquid media for

isolating and cultivating acidophilic and acid-tolerant sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 10, p. 1–6, 2016.

NARAYAN, K. D.; PANDEY, S. K.; DAS, S. K. Characterization of *Comamonas thiooxidans* sp. nov., and comparison of thiosulfate oxidation with *Comamonas testosteroni* and *Comamonas composti*. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 248–253, 2010.

NARIYAN, E.; SILLANPÄÄ, M.; WOLKERSDORFER, C. Electrocoagulation treatment of mine water from the deepest working European metal mine – performance, isotherm and kinetic studies. **Separation and Purification Technology**, v. 177, p. 363–373, 2017.

NARIYAN, E.; WOLKERSDORFER, C.; SILLANPÄÄ, M. Sulfate removal from acid mine water from the deepest active European mine by precipitation and various electrocoagulation configurations. **Journal of Environmental Management**, v. 227, p. 162–171, 2018.

NASCIMENTO, F. M. F.; MENDONÇA, R. M. G.; MACÊDO, M. I. F.; SOARES, P. S. M. Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em Santa Catarina. **CETEM -Centro de Tecnologia mineral**, p. 1–11, 2002. Disponível em: <[http://www.cprm.gov.br/publique/media/evento\\_nascimento.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/evento_nascimento.pdf)>. Acesso em: 5 maio. 2018.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. C. **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 256 p. Fortaleza, Brasil: Imprensa Universitária, 2014.

NATARAJAN, K. A. Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 18, n. 6, p. 1352–1360, 2008.

NAVARRO-NOYA, Y. E.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, E.; MORALES-JIMÉNEZ, J.; JAN-ROBLERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. **Applied Soil Ecology**, v. 62, p. 52–60, 2012.

NECULITA, C. M.; ROSA, E. A review of the implications and challenges of manganese removal from mine drainage. **Chemosphere**, v. 214, p. 491–510, 2019.

NIPPATLA, N.; PHILIP, L. Electrocoagulation-floatation assisted pulsed power plasma technology for the complete mineralization of potentially toxic dyes and real textile wastewater. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 125, p. 143–156, 2019.

NLEYA, Y.; SIMATE, G. S.; NDLOVU, S. Sustainability assessment of the recovery and utilisation of acid from acid mine drainage. **Journal of Cleaner Production**, v. 113, p. 17–27, 2016.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D. **Potencial da casca de camarão para remediação de águas contaminadas com drenagem ácida mineral visando seu reuso secundário não potável**. 2014. 151 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. Disponível em: <<http://tede.ufsc.br/teses/PGEA0498-D.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2017.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D. **Valorização da casca de camarão para tratamento da drenagem ácida mineral do carvão visando a obtenção de água de reuso**. 2018. 217 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, 2018. Disponível em: <<http://tede.ufsc.br/teses/PGEA0612-T.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; ALVES, A. A. de A.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Application of the statistical experimental design to optimize mine-impacted water (MIW)

remediation using shrimp-shell. **Chemosphere**, v. 167, p. 322–329, 2017a.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; LAPOLLI, F. R.; NAGEL-HASSEMER, M. E.; LOBO-RECIO, M. Á. Optimization of Fe and Mn removal from coal acid mine drainage (AMD) with waste biomaterials: statistical modeling and kinetic study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, p. 1–15, 2018.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; LAPOLLI, F. R.; NAGEL-HASSEMER, M. E.; LOBO-RECIO, M. Á. Optimization of acid mine drainage remediation with central composite rotatable design model. **Energy Procedia**, n. 136, p. 233–238, 2017b.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; NAGEL-HASSEMER, M. E.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Potencial dos resíduos do processamento de camarão para remediação de águas contaminadas com drenagem ácida mineral. **Polímeros**, v. 26, p. 1–7, 2016.

NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; RODRIGUES, C.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Adsorption of heavy metals from coal acid mine drainage by shrimp shell waste: Isotherm and continuous-flow studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p. 102787, 2019.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals: revised proposal for a new guideline 221—*Lemna* sp. growth inhibition test. p. 1–22, 2002. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2020.

OKABE, S. Ecophysiology of sulphate-reducing bacteria in environmental biofilms. In: BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. (Ed.). **Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems**. Chapter 12. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 359–381.

OLADIPO, O. G.; EZEOKOLI, O. T.; MABOETA, M. S.; BEZUIDENHOUT, J. J.; TIEDT, L. R.; JORDAAN, A.; BEZUIDENHOUT, C. C. Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal concentrations. **Journal of Environmental Management**, v. 212, p. 357–366, 2018.

OREN, A. Microbial Metabolism: Importance for Environmental Biotechnology. In: WANG, L. K.; IVANOV, V.; TAY, J.-H.; HUNG, Y.-T. (Ed.). **Environmental Biotechnology - Handbook of Environmental Engineering vol. 10**. Chapter 5. New York: Humana press, 2010. p. 193–255.

OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, A. C. B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F. Y.; PHILIPPI, V. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; FILIPAK NETO, F.; CESTARI, M. M.; DA SILVA DE ASSIS, H. C.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145–9160, 2014.

PAPIRIO, S.; VILLA-GOMEZ, D. K.; ESPOSITO, G.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L. Acid mine drainage treatment in fluidized-bed bioreactors by sulfate-reducing bacteria: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 23, p. 2545–2580, 2013.

PEIRAVI, M.; MOTE, S. R.; MOHANTY, M. K.; LIU, J. Bioelectrochemical treatment of acid mine drainage (AMD) from an abandoned coal mine under aerobic condition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 333, p. 329–338, 2017.

PEREIRA, S. P. P.; JESUS, F.; AGUIAR, S.; DE OLIVEIRA, R.; FERNANDES, M.; RANVILLE, J.; NOGUEIRA, A. J. A. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. **Science of the Total Environment**, v.

618, p. 1389–1399, 2018.

PÉREZ, N.; SCHWARZ, A.; URRUTIA, H. Tratamiento del drenaje ácido de minas: estudio de reducción de sulfato en mezclas orgánicas. **Tecnología y Ciencias del Agua**, v. 8, n. 1, p. 53–64, 2017.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; PIRASTRU, L.; SIROIS, L.; GERSON MATIAS, W.; POPOVIC, R. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll a Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. **Journal of Botany**, v. 2010, p. 1–9, 2010.

PERREAULT, F.; SAMADANI, M.; DEWEZ, D. Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. **Nanotoxicology**, v. 8, p. 374–382, 2013.

PESTER, M.; BITTNER, N.; DEEVONG, P.; WAGNER, M.; LOY, A. A “rare biosphere” microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. **The ISME Journal**, v. 4, p. 1–12, 2010.

PINTO, P. X.; AL-ABED, S. R.; MCKERNAN, J. Comparison of the efficiency of chitinous and ligneous substrates in metal and sulfate removal from mining-influenced water. **Journal of Environmental Management**, v. 227, p. 321–328, 2018.

PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CYCÓN, M.; KOZDRÓJ, J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 237–246, 2005.

POKORNA, D.; ZABRANSKA, J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1246–1259, 2015.

POSTGATE, J. R. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. In: **Bacteriological Reviews**. Chapter 4. University of Sussex: American Society for Microbiology, 1965. p. 425–441.

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

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

QIU, R.; ZHAO, B.; LIU, J.; HUANG, X.; LI, Q.; BREWER, E.; WANG, S.; SHI, N. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 1310–1315, 2009.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RABUS, R.; VENCESLAU, S. S.; WÖHLBRAND, L.; VOORDOUW, G.; WALL, J. D.; PEREIRA, I. A. C. A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 66, p. 55–321, 2015.

RAINEY, F. A.; HOLLEN, B. J.; SMALL, A. M. *Clostridium*. In: W. B. WHITMAN; F. RAINEY; P. KÄMPFER; M. TRUJILLO; J. CHUN; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (Ed.). **Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Baton Rouge, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–122.



REIS, M. P.; DIAS, M. F.; COSTA, P. S.; ÁVILA, M. P.; LEITE, L. R.; DE ARAÚJO, F. M. G.; SALIM, A. C. M.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; OLIVEIRA, G.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Metagenomic signatures of a tropical mining-impacted stream reveal complex microbial and metabolic networks. **Chemosphere**, v. 161, p. 266–273, 2016.

ROBINSON-LORA, M. A.; BRENNAN, R. A. Efficient metal removal and neutralization of acid mine drainage by crab-shell chitin under batch and continuous-flow conditions. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5063–5071, 2009a.

ROBINSON-LORA, M. A.; BRENNAN, R. A. The use of crab-shell chitin for biological denitrification: Batch and column tests. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 534–541, 2009b.

ROBINSON-LORA, M. A.; BRENNAN, R. A. Chitin complex for the remediation of mine impacted water: Geochemistry of metal removal and comparison with other common substrates. **Applied Geochemistry**, v. 25, n. 3, p. 336–344, 2010.

ROBINSON-LORA, M. A.; BRENNAN, R. A. Anaerobic precipitation of manganese and co-existing metals in mine impacted water treated with crab shell-associated minerals. **Applied Geochemistry**, v. 26, n. 5, p. 853–862, 2011.

RØDDE, R. H.; EINBU, A.; VÅRUM, K. M. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 388–393, 2008.

RODRIGUES, C.; FOLLMANN, H. V. D. M.; NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; NAGEL-HASSEMER, M. E.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Sulfate removal from mine-impacted water by electrocoagulation: statistical study, factorial design, and kinetics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. (In Press), 2020a.

RODRIGUES, C.; NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; FOLLMANN, H. V. D. M.; SILVEIRA, D. D.; NAGEL-HASSEMER, M. E.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Biostimulation of sulfate-reducing bacteria and metallic ions removal from coal mine-impacted water (MIW) using shrimp shell as treatment agent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 398, p. 122893, 2020b.

RODRIGUES, C.; NÚÑEZ-GÓMEZ, D.; SILVEIRA, D. D.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. Á. Chitin as a substrate for the biostimulation of sulfate-reducing bacteria in the treatment of mine-impacted water (MIW). **Journal of Hazardous Materials**, v. 375, p. 330–338, 2019.

RODRIGUES, D. F.; SAKATA, S. K.; COMASSETO, J. V.; BÍCEGO, M. C.; PELLIZARI, V. H. Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1304–1314, 2009.

RODRIGUEZ, R. P.; OLIVEIRA, G. H. D.; RAIMUNDI, I. M.; ZAIAT, M. Assessment of a UASB reactor for the removal of sulfate from acid mine water. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 74, p. 48–53, 2012.

RODRIGUEZ, R. P.; VICH, D. V.; GARCIA, M. L.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. Application of horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor for bioremediation of acid mine drainage. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 3, p. 399–410, 2016.

ROSICH-GIMENEZ, A. **Estudo do potencial das conchas de moluscos para o tratamento da drenagem ácida de mineração de carvão**. 2017. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

RUBIO, J.; SILVA, R. D. R.; COSTA, C. Imobilização de ânions de efluentes líquidos da mineração, com sais hidrolisáveis de alumínio. **XXV Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa & VIII Meeting of the Southern Hemisphere on Mineral Technology, Goiânia**, p. 339–346, 2013. Disponível em: <[https://www.artigos.entmme.org/download/2013/tratamento\\_de\\_efluentes\\_e\\_reciclagem-environment\\_recycling\\_and\\_waste\\_processing/2466](https://www.artigos.entmme.org/download/2013/tratamento_de_efluentes_e_reciclagem-environment_recycling_and_waste_processing/2466) - RUBIO, J.- IMOBILIZAÇÃO DE ÂNIONS DE EFLUENTES LÍQUIDOS DA MINERAÇÃO, COM SAIS HIDROLISÁVEIS DE ALUMÍNIO.pdf>. Acesso em: 4 out. 2017.

RUNTTI, H.; TOLONEN, E.-T.; TUOMIKOSKI, S.; LUUKKONEN, T.; LASSI, U. How to tackle the stringent sulfate removal requirements in mine water treatment—A review of potential methods. **Environmental Research**, v. 167, p. 207–222, 2018.

RYAN, M. J.; KNEY, A. D.; CARLEY, T. L. A study of selective precipitation techniques used to recover refined iron oxide pigments for the production of paint from a synthetic acid mine drainage solution. **Applied Geochemistry**, v. 79, p. 27–35, 2017.

SALLAM, A.; STEINBÜCHEL, A. Clostridium sulfidigenes sp. nov., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 1661–1665, 2009.

SAMUEL, J.; SHANTHI, S.; VASHANTHA, R. Utilization of agro-waste material as potential adsorbent for removal of Cu (II) and Ni (II) ions from aqueous phase. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, v. 4, n. 3, p. 346–354, 2016.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; KNITTEL, K.; AMANN, R.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Quantification of Tinto river sediment microbial communities: Importance of sulfate-reducing bacteria and their role in attenuating acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4638–4645, 2012a.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; RODRÍGUEZ, N.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6085–6093, 2011.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; ROJAS-OJEDA, P.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Screening of anaerobic activities in sediments of an acidic environment: Tinto River. **Extremophiles**, v. 16, n. 6, p. 829–839, 2012b.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; SANZ, J. L.; BIJMANS, M. F.; STAMS, A. J. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 269, n. 3, p. 98–109, 2014.

SÁNCHEZ-ANDREA, I.; STAMS, A. J. M.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 5, p. 672–678, 2013.

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

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

SÁNCHEZ-ESPAÑA, J. The behavior of iron and aluminum in acid mine drainage: speciation, mineralogy, and environmental significance. In: LETCHER, T. M. (Ed.). **Thermodynamics**,

**Solubility and Environmental Issues.** Chapter 7: Elsevier B.V., 2007. p. 137–150.

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

SARKAR, P.; ROY, A.; PAL, S.; MOHAPATRA, B.; KAZY, S. K.; MAITI, M. K.; SAR, P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 15–27, 2017.

SASS, H.; CYPIONKA, H. Response of sulphate-reducing bacteria to oxygen. In: BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. (Ed.). **Sulphate-reducing Bacteria Environmental and Engineered Systems.** Chapter 5. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 167–183.

SATO, Y.; HAMAI, T.; HORI, T.; AOYAGI, T.; INABA, T.; KOBAYASHI, M.; HABE, H.; SAKATA, T. Desulfosporosinus spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot- and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7783–7793, 2019.

SAUNDERS, J. A.; LEE, M. K.; WOLF, L. W.; MORTON, C. M.; FENG, Y.; THOMSON, I.; PARK, S. Geochemical, microbiological, and geophysical assessments of anaerobic immobilization of heavy metals. **Bioremediation Journal**, v. 9, n. 1, p. 33–48, 2005.

SEO, E. Y.; CHEONG, Y. W.; YIM, G. J.; MIN, K. W.; GERONI, J. N. Recovery of Fe, Al and Mn in acid coal mine drainage by sequential selective precipitation with control of pH. **Catena**, v. 148, p. 11–16, 2017.

SHAHIDI, F.; ABUZAYTOUN, R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. **Advances in food and nutrition research**, v. 49, p. 93–135, 2005.

SHAMAEI, L.; KHORSHIDI, B.; PERDICAKIS, B.; SADRZADEH, M. Treatment of oil sands produced water using combined electrocoagulation and chemical coagulation techniques. **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 560–572, 2018.

SHARMA, A.; PARASHAR, D.; SATYANARAYANA, T. Acidophilic Microbes: Biology and Applications. In: RAMPELOTTO, P. H. (Ed.). **Biotechnology of Extremophiles Advances and Challenges.** Chapter 7. Porto Alegre: Springer, 2016. p. 215–241.

SHEORAN, A. S.; SHEORAN, V. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. **Minerals Engineering**, v. 19, n. 2, p. 105–116, 2006.

SHI, B.; ZHAO, W.; ZHANG, Q. Explanation for hydrogen bonds of chitin-alcohols from lewis acid-base theories. **Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics**, v. 46, n. 5, p. 1033–1039, 2007.

SILVA, A. M.; LIMA, R. M. F.; LEÃO, V. A. Mine water treatment with limestone for sulfate removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221–222, p. 45–55, 2012.

SILVA, L. F. O.; VALLEJUELO, S. F.-O. de; MARTINEZ-ARKARAZO, I.; CASTRO, K.; OLIVEIRA, M. L. S.; SAMPAIO, C. H.; DE BRUM, I. A. S.; DE LEÃO, F. B.; TAFFAREL, S. R.; MADARIAGA, J. M. Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 169–178, 2013.

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

- SINGH, T. S. A.; RAMESH, S. T. An experimental study of CI Reactive Blue 25 removal from aqueous solution by electrocoagulation using Aluminum sacrificial electrode: Kinetics and influence of parameters on electrocoagulation performance. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 13–15, p. 2634–2642, 2014.
- SINGLETON, R.; ODOM, J. M.; SINGLETON JR, R. **The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives**. New York: Springer-Verlag, 1993.
- SKOUSEN, J.; ROSE, A.; GEIDEL, G.; FOREMAN, J.; EVANS, R.; HELLIER, W. **A handbook of technologies for avoidance and remediation of acid mine drainage**. Morgantown, West Virginia: National Mine Land Reclamation Center, 1998.
- SKOUSEN, J.; ZIPPER, C. E.; ROSE, A.; ZIEMKIEWICZ, P. F.; NAIRN, R.; MCDONALD, L. M.; KLEINMANN, R. L. Review of passive systems for acid mine drainage treatment. **Mine Water and the Environment**, v. 36, p. 133–153, 2017.
- SOFIANE, B.; SOFIA, K. S. Biosorption of heavy metals by chitin and the chitosan. **Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 5, p. 54–63, 2015.
- STACKEBRANDT, E.; SPROER, C.; RAINEY, F. A.; BURGHARDT, J.; PAUKER, O.; HIPPE, H. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1134–1139, 1997.
- STEGEMEIER, J. P.; COLMAN, B. P.; SCHWAB, F.; WIESNER, M. R.; LOWRY, G. V. Uptake and Distribution of Silver in the Aquatic Plant *Landoltia punctata* (Duckweed) Exposed to Silver and Silver Sulfide Nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 4936–4943, 2017.
- SUN, J.; HU, S.; SHARMA, K. R.; NI, B. J.; YUAN, Z. Stratified microbial structure and activity in sulfide- and methane- producing anaerobic sewer biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, p. 7042–7052, 2014.
- SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43 (2), p. 145–171, 2003.
- TAIT, S.; CLARKE, W. P.; KELLER, J.; BATSTONE, D. J. Removal of sulfate from high-strength wastewater by crystallisation. **Water Research**, v. 43, n. 3, p. 762–772, 2009.
- TAKAHASHI, S.; TOMITA, J.; NISHIOKA, K.; HISADA, T.; NISHIJIMA, M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- TANG, W.; GONG, J.; WU, L.; LI, Y.; ZHANG, M.; ZENG, X. DGGE diversity of manganese mine samples and isolation of a *Lysinibacillus* sp. efficient in removal of high Mn (II) concentrations. **Chemosphere**, v. 165, p. 277–283, 2016.
- TELLES, D. D.; COSTA, R. H. P. G. **Reúso da água: conceito, teorias e práticas**. 311 p. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed. Blusher, 2007.
- THAUER, R. K.; STACKEBRANDT, E.; HAMILTON, W. A. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. In: BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. (Ed.). **Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems**. Chapter 1. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 1–37.
- TOLONEN, E.-T.; HU, T.; RÄMÖ, J.; LASSI, U. The removal of sulphate from mine water by

precipitation as ettringite and the utilisation of the precipitate as a sorbent for arsenate removal. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 856–862, 2016.

VANWONTERGHEM, I.; JENSEN, P. D.; HO, D. P.; BATSTONE, D. J.; TYSON, G. W. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 55–64, 2014.

VASQUEZ, Y.; ESCOBAR, M. C.; SAENZ, J. S.; QUICENO-VALLEJO, M. F.; NECULITA, C. M.; ARBELI, Z.; ROLDAN, F. Effect of hydraulic retention time on microbial community in biochemical passive reactors during treatment of acid mine drainage. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 624–632, 2018.

VEPSÄLÄINEN, M. **Electrocoagulation in the treatment of industrial waters and wastewaters**. 2012. VTT publications.154 p. Thesis (Doctor of Science), Lappeenranta University of Technology, Finland., 2012. Disponível em: <<https://www.vtt.fi/inf/pdf/science/2012/S19.pdf>>. Acesso em: 2 maio. 2019.

VEPSÄLÄINEN, M.; KIVISAARI, H.; PULLIAINEN, M.; OIKARI, A.; SILLANPÄÄ, M. Removal of toxic pollutants from pulp mill effluents by electrocoagulation. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 2, p. 141–150, 2011.

VEPSÄLÄINEN, M.; PULLIAINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Effect of electrochemical cell structure on natural organic matter (NOM) removal from surface water through electrocoagulation (EC). **Separation and Purification Technology**, v. 99, p. 20–27, 2012.

VEPSÄLÄINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Electrocoagulation in the treatment of industrial waters and wastewaters. In: SILLANPÄÄ, M. (Ed.). **Advanced Water Treatment - Electrochemical methods**. Miami: Elsevier Inc., 2020. p. 1–78.

VILLA-GÓMEZ, D.; ABABNEH, H.; PAPIRIO, S.; ROUSSEAU, D. P. L.; LENS, P. N. L. Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inversed fluidized bed reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 200–207, 2011.

VILLA-GÓMEZ, D. K. **Simultaneous sulfate reduction and metal precipitation in an inverse fluidized bed reactor**. 2013. 209 p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais), Wageningen University, 2013. Disponível em: <[https://www.wur.nl/upload\\_mm/3/2/1/89442c10-3d27-4875-a8d2-191d55ab20ff\\_2013\\_Simultaneous\\_sulfate\\_reduction\\_and\\_metal\\_precipitation\\_in\\_an\\_inverse\\_fluidized\\_bed\\_reactor%2C\\_Denys\\_Kristalia\\_Villa\\_Gomez.pdf](https://www.wur.nl/upload_mm/3/2/1/89442c10-3d27-4875-a8d2-191d55ab20ff_2013_Simultaneous_sulfate_reduction_and_metal_precipitation_in_an_inverse_fluidized_bed_reactor%2C_Denys_Kristalia_Villa_Gomez.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2018.

VILLA-GÓMEZ, D. K.; PAPIRIO, S.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; FARGES, F.; NIKITENKO, S.; KRAMER, H.; LENS, P. N. L. Influence of sulfide concentration and macronutrients on the characteristics of metal precipitates relevant to metal recovery in bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 26–34, 2012.

VITAL, B.; BARTACEK, J.; ORTEGA-BRAVO, J. C.; JEISON, D. Treatment of acid mine drainage by forward osmosis: Heavy metal rejection and reverse flux of draw solution constituents. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 85–91, 2018.

VOLLMERS, J.; WIEGAND, S.; KASTER, A.-K. Comparing and evaluating metagenome assembly tools from a microbiologist's perspective - not only size matters! **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–31, 2017.

WANG, W. Literature review on duckweed toxicity testing. **Environmental Research**, v. 52, n. 1, p. 7–22, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(05\)80147-1](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(05)80147-1)>. Acesso em: 24 jul. 2019.

- WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.
- WATANABE, T.; KIMURA, K.; SUMIYA, T.; NIKAIDOU, N.; SUZUKI, K.; SUZUKI, M.; TAIYOJI, M.; FERRER, S.; REGUE, M. Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 22, p. 7111–7117, 1997.
- WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption on carbon from colution. **Journal of Sanitary Engineering Division**, v. 89, p. 31–59, 1963.
- WEI, C.; SONG, X.; WANG, Q.; HU, Z. Sorption kinetics, isotherms and mechanisms of PFOS on soils with different physicochemical properties. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 40–50, 2017.
- WEI, M.; YU, Z.; JIANG, Z.; ZHANG, H. Microbial diversity and biogenic methane potential of a thermogenic-gas coal mine. **International Journal of Coal Geology**, v. 134–135, p. 96–107, 2014.
- WEI, M.; YU, Z.; ZHANG, H. Molecular characterization of microbial communities in bioaerosols of a coal mine by 454 pyrosequencing and real-time PCR. **Journal of Environmental Sciences**, v. 30, p. 241–251, 2015.
- WIKIPEDIA. **Chitin**. Disponível em: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Chitin>>. Acesso em: 15 maio. 2018.
- WILLEMS, A.; GILLIS, M. Comamonas. In: WHITMAN, W. B.; RAINEY, F.; KÄMPFER, P.; TRUJILLO, M.; CHUN, J.; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Gent, Belgium: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–17.
- WU, F.; TSENG, R.; JUANG, R. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on chitosan. **Water Research**, v. 35, n. 3, p. 613–618, 2001.
- WU, F.; TSENG, R.; JUANG, R. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, p. 366–373, 2009.
- WU, M.; HU, Y.; LIU, R.; LIN, S.; SUN, W.; LU, H. Electrocoagulation method for treatment and reuse of sulphide mineral processing wastewater: characterization and kinetics. **Science of the Total Environment**, v. 696, 2019.
- WU, Y.; SHUKAL, S.; MUKHERJEE, M.; CAO, B. Involvement in denitrification is beneficial to the biofilm lifestyle of *Comamonas testosteroni*: a mechanistic study and its environmental implications. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 19, p. 11551–11559, 2015.
- XIA, F. F.; ZHANG, H. T.; WEI, X. M.; SU, Y.; HE, R. Characterization of H<sub>2</sub>S removal and microbial community in landfill cover soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 18906–18917, 2015.
- XU, J.; YANG, Y.; LIU, Y.; RAN, C.; LI, J.; HE, S.; XU, L.; AI, C.; ZHOU, Z. Characterization of an exo-chitinase from a *Citrobacter* strain isolated from the intestine content of large yellow croakers. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 56, n. 7, p. 1089–1104, 2016.
- YANG, S. L.; TANG, Y. Q.; GOU, M.; JIANG, X. Effect of sulfate addition on methane production and sulfate reduction in a mesophilic acetate-fed anaerobic reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3269–3277, 2015.

- YATES, G. T.; SMOTZER, T. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. **Journal of Theoretical Biology**, v. 244, p. 511–517, 2007.
- ZARASVAND, K. A.; RAI, V. R. Identification of the traditional and non-traditional sulfate-reducing bacteria associated with corroded ship hull. **3 Biotech**, v. 6, n. 197, p. 1–8, 2016.
- ZEMPLIČ, L. F.; KREŽE, T.; STRNAD, S.; ŠAUPERL, O.; VESEL, A. Functional cellulose fibres for hygienic and medical applications. In: NEMR, A. EL (Ed.). **Textiles: types, uses and production methods**. Chapter 12: Nova Science Publishers, 2012. p. 467–487.
- ZEZULKA, Š.; KUMMEROVÁ, M.; BABULA, P.; VÁŇOVÁ, L. Lemna minor exposed to fluoranthene: Growth, biochemical, physiological and histochemical changes. **Aquatic Toxicology**, v. 140–141, p. 37–47, 2013.
- ZHANG, H.; YUN, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 334–339, 2017a.
- ZHANG, M.; LIU, X.; LI, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; WEN, J. Microbial community and metabolic pathway succession driven by changed nutrient inputs in tailings: Effects of different nutrients on tailing remediation. **Scientific Reports**, v. 7 (1), n. 474, p. 1–10, 2017b.
- ZHANG, M.; WANG, H. Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage. **Minerals Engineering**, v. 69, p. 81–90, 2014.
- ZHANG, M.; WANG, H. Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. **Minerals Engineering**, v. 92, p. 63–71, 2016.
- ZHANG, M.; WANG, H.; HAN, X. Preparation of metal-resistant immobilized sulfate reducing bacteria beads for acid mine drainage treatment. **Chemosphere**, v. 154, p. 215–223, 2016.
- ZHANG, Q.; HE, Y.; WANG, W.; LIN, N.; WU, C.; LI, N. Corrosion behavior of WC-Co hardmetals in the oil-in-water emulsions containing sulfate reducing *Citrobacter* sp. **Corrosion Science**, v. 94, p. 48–60, 2015.
- ZHAO, F.; ZHOU, J. D.; MA, F.; SHI, R. J.; HAN, S. Q.; ZHANG, J.; ZHANG, Y. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H<sub>2</sub>S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: Applications for microbial enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 24–30, 2016.
- ZHOU, J.; XING, J. Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 96, p. 14–22, 2015.
- ZHU, X.; ZHOU, Y.; FENG, J. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n. 11, p. 831–838, 2007.





## 8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Abundâncias relativas (%) e número de sequências detectadas, em nível de gênero dos 20 mais detectados, no início e fim da fase *log* de crescimento.

<b>Gênero</b>	<b>dia 11</b>		<b>dia 30</b>	
<i>Citrobacter</i>	38,50%	2.658	4,84%	202
<i>Clostridium</i>	6,81%	470	50,60%	2.112
<i>Klebsiella</i>	28,81%	1.989	1,44%	60
<i>Enterobacter</i>	0,00%	0	23,72%	990
<i>Fonticella</i>	0,00%	0	9,54%	398
<i>Serratia</i>	4,65%	321	1,82%	76
<i>Bacillus</i>	4,88%	337	0,00%	0
<i>Ruminococcaceae unclassified genus</i>	3,72%	257	0,43%	18
<i>Terrisporobacter</i>	2,19%	151	0,36%	15
<i>Dysgonomonas</i>	1,06%	73	1,75%	73
<i>Burkholderia</i>	2,03%	140	0,00%	0
<i>Anaerospobacter</i>	1,78%	123	0,14%	6
<i>Ruminiclostridium</i>	1,19%	82	0,67%	28
<i>Sedimentibacter</i>	0,32%	22	1,87%	78
<i>Peptoclostridium</i>	1,20%	83	0,26%	11
<i>Lachnoclostridium</i>	0,97%	67	0,19%	8
<i>Acidaminococcaceae unclassified genus</i>	1,00%	69	0,00%	0
<i>Romboutsia</i>	0,81%	56	0,00%	0
<i>Achromobacter</i>	0,00%	0	1,32%	55
<i>Desulfosporosinus</i>	0,09%	6	1,05%	44
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>6.904</b>	<b>100%</b>	<b>4.174</b>

APÊNDICE B – Abundâncias relativas (%) e número de sequências detectadas, em nível de gênero dos 20 mais detectados. Entre outros (da 21ª colocação em diante), estão citados os dois gêneros de BRS encontradas.

<b>Gênero</b>	<b>dia 11</b>		<b>dia 31</b>	
<i>Clostridium</i>	27,04%	295	12,75%	365
<i>Klebsiella</i>	26,03%	284	9,82%	281
<i>Lysinibacillus</i>	2,75%	30	18,13%	519
<i>Sedimentibacter</i>	6,87%	75	9,92%	284
<i>Anaerotruncus</i>	10,08%	110	8,42%	241
<i>Elizabethkingia</i>	5,87%	64	9,26%	265
<i>Tissierella unclassified genus</i>	3,85%	42	6,95%	199
<i>Terrisporobacter</i>	3,57%	39	4,33%	124
<i>Ruminococcaceae unclassified genus</i>	0,55%	6	4,30%	123
<i>Burkholderia</i>	0,27%	3	3,98%	114
<i>Citrobacter</i>	1,83%	20	1,75%	50
<i>Tyzzarella</i>	2,93%	32	1,33%	38
<i>Romboutsia</i>	0,73%	8	1,33%	38
<i>Ruminiclostridium</i>	1,47%	16	0,52%	15
<i>Peptoclostridium</i>	0,64%	7	0,84%	24
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	1,37%	15	0,52%	15
<i>Bacillus</i>	1,65%	18	0,38%	11
<i>Pseudomonas</i>	0,00%	0	0,73%	21
<i>Enterobacter</i>	0,00%	0	0,66%	19
<i>Mobilitalea</i>	0,00%	0	0,63%	18
Outros	2,47%	27	3,42%	98
<i>Desulfovibrio</i>	0,00%	0	0,28%	8
<i>Desulfosporosinus</i>	0,00%	0	0,03%	1
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>1.091</b>	<b>12,75%</b>	<b>2.862</b>

APÊNDICE C – Abundâncias relativas (%) e número de sequências detectadas, em nível de gênero dos 20 mais detectados. Entre outros (da 21ª colocação em diante), está citado o gênero de BRS encontrada.

<b>Gênero</b>	<b>dia 9</b>		<b>dia 41</b>	
<i>Comamonas</i>	96,11%	14.561	97,52%	19.172
<i>Clostridium</i>	0,95%	144	0,27%	54
<i>Anaerotruncus</i>	0,26%	39	0,43%	85
<i>Acinetobacter</i>	0,59%	90	0,04%	7
<i>Sedimentibacter</i>	0,20%	31	0,24%	47
<i>Klebsiella</i>	0,42%	63	0,02%	4
<i>Mobilitalea</i>	0,00%	0	0,23%	46
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0,20%	30	0,03%	6
<i>Bacillus</i>	0,21%	32	0,02%	4
<i>Polaromonas</i>	0,00%	0	0,18%	36
<i>Arcobacter</i>	0,00%	0	0,15%	30
<i>Stenotrophomonas</i>	0,03%	4	0,12%	23
<i>Comamonadaceae unclassified genus</i>	0,07%	11	0,04%	8
<i>Ruminococcaceae unclassified genus</i>	0,02%	3	0,08%	15
<i>Enterobacter</i>	0,09%	13	0,03%	5
<i>Diaphorobacter</i>	0,00%	0	0,09%	17
<i>Sporacetigenium</i>	0,09%	13	0,02%	3
<i>Citrobacter</i>	0,08%	12	0,02%	3
<i>Ruminiclostridium</i>	0,09%	13	0,01%	2
<i>Burkholderiales unclassified genus</i>	0,02%	3	0,06%	11
Outros	0,58%	89	0,41%	82
<i>Desulfovibrio</i>	0,00%	0	0,05%	9
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>15.151</b>	<b>100%</b>	<b>19.660</b>