



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE NITRATO POR  
CULTURA MISTA ENRIQUECIDA COM BACTÉRIAS  
REDUTORAS DE SULFATO (BRS) EM EFLUENTE  
CONTENDO SULFATO**

**Uberlândia**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE NITRATO POR  
CULTURA MISTA ENRIQUECIDA COM BACTÉRIAS  
REDUTORAS DE SULFATO (BRS) EM EFLUENTE  
CONTENDO SULFATO**

**Sandra Mara Santana Rocha**

**Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química da Universidade Federal de Uberlândia  
como parte dos requisitos necessários à obtenção  
do título de Mestre em Engenharia Química, área  
de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento  
de Processos Químicos.**

**Uberlândia - MG**

**2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

R672a Rocha, Sandra Mara Santana, 1977-  
Avaliação da utilização de nitrato em efluentes contendo sulfato e cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS) / Sandra Mara Santana Rocha. - Uberlândia, 2006.  
159f. : il.  
Orientador: Vicelma Luiz Cardoso.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.  
1. Engenharia química - Teses. 2. Sulfetos - Teses. 2. Nitratos - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA,  
EM 17/02/2006

BANCA EXAMINADORA:

---

Profª. Dra. Vicelma Luiz Cardoso  
Orientadora (PPG-EQ/UFU)

---

Profª. Drª. Magali Christe Cammarota  
Corientadora(Escola de Química/UFRJ)

---

Profª. Drª. Miriam Maria de Resende  
(PPG-EQ/UFU)

---

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro  
(PPG-EQ/UFU)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Expedito e Wilma, e a todos os amigos que me deram apoio e incentivo nesta etapa tão importante da minha vida, especialmente ao Danylo e Demian, companheiros de longa data.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por sua bondade e misericórdia, por minha vida, pela oportunidade, pela força e pela paz interior, sem as quais seria impossível dar seguimento a esta etapa tão importante e tão gratificante;
- À Profª. Vicelma Luiz Cardoso pela orientação, pela total dedicação e confiança durante toda minha trajetória na Engenharia Química, pelos ensinamentos e pela amizade;
- À Profª. Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Magali Christie Cammarota pela co-orientação, colaboração e incentivo ao longo deste projeto;
- À CAPES pela oportunidade a mim concedida de fazer parte do programa de pós-graduação e pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto pessoal não poderia ser realizado;
- À Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo fornecimento da cultura microbiana empregada neste trabalho. .
- Aos amigos e parceiros do Núcleo de Bioquímica, especialmente ao Cristian Bolner, à Patrícia Vieira e Rafael Vieira.
- Aos alunos de iniciação científica, Hamiltom Passos e Ricardo, pela ajuda nos experimentos e atividades do laboratório que muito contribuíram para o êxito deste trabalho;
- À amiga Cynara Reis Aguiar pela parceria, pelo apoio, pelas horas mais divertidas, pelo incentivo nas horas mais difíceis.
- Aos amigos Aderjane, Aline, Danylo, Demian, Lucas, Poliana, Reimar e Vanessa por serem pessoas especiais nesta etapa da minha vida, pela amizade e ajuda sempre que precisei. À vocês agradeço parte do resultado deste trabalho e de vocês levarei e guardarei a mais sincera amizade;
- Ao Cláudio Duarte pela elaboração do programa utilizado na otimização do planejamento experimental e pelo esclarecimento das dúvidas;
- Ao Édio José pela ajuda e colaboração nos assuntos relacionados à informática e tudo quanto precisei na minha longa jornada na Engenharia Química.
- Aos técnicos e funcionários da FEQUI pela ajuda indispensável;
- Aos professores João Jorge Damasceno, Luiz Cláudio Oliveira, Carla Hori, Márcia Gonçalves, Lucienne Lobato, Marcos Barrozo pelo aprendizado obtido nas disciplinas por eles ministradas;

- Ao professor Eloízio Júlio Ribeiro pelo incentivo, pelo carinho e atenção. Ao professor Ubirajara Coutinho Filho pelas correções, críticas e sugestões ao meu trabalho e pela ajuda sempre disponível. À profa. Miriam Maria de Resende e a pelas sugestões e correções que muito contribuíram para finalização do trabalho;
- Aos amigos Roberta Dantas, Juliana Lira, José Carlos Freitas, Cíntia Siqueira, pelos vários momentos de descontração, pela amizade, pelo companheirismo, sem os quais seria difícil seguir esta caminhada;
- Aos meus pais Wilma Santana Rocha e Expedito da Silva Rocha pelo apoio incondicional, pelo incentivo, pelo amor, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes durante todo este período. A eles agradeço a minha educação, a minha alegria, a minha vida. A minha irmã Silmara, que onde quer que esteja sei que sempre me ajudou;
- A Alex Ander pelo seu apoio que mesmo de longe me incentivou e me ajudou a vencer mais esta etapa da minha vida.
- A todos que colaboraram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

Índice de Figuras .....	i
Índice de Tabelas .....	iv
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
2.1 – EFLUENTES RICOS EM SULFATO .....	5
2.1.1 – Efluente Proveniente de Usina de Açúcar e Alcool .....	5
2.1.2 – Efluente de Curtumes .....	6
2.1.3 – Efluente de Celulose e Papel .....	8
2.1.4 – Água de Produção de Petróleo.....	8
2.1.4.1 – Características da Água de Produção .....	10
2.2 – BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA.....	12
2.3– BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS) .....	14
2.3.1 – Caracterização .....	16
2.3.2 – Crescimento .....	18
2.3.3 – Cultivo .....	19
2.3.4 – Ciclo do Enxofre e Redução Desassimilativa do Sulfato .....	21
2.4 – SULFETO DE HIDROGÊNIO .....	26
2.4.1 – Identificação e Classificação .....	27
2.4.2 – Propriedades Físico Químicas .....	28
2.4.3 – Informações Toxicológicas .....	28
2.4.3.1 – Efeitos a uma única superexposição ou a uma exposição repetida .....	29
2.4.4 – Problemas Relacionados à Presença do Sulfeto .....	30
2.4.4.1 – Biocorrosão.....	31
2.5– TÉCNICAS PARA MINIMIZAR A PRODUÇÃO DE SULFETO .....	34
2.6– BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO (BRN) .....	35
2.6.1 – Caracterização .....	38
2.6.2 – Crescimento .....	39



2.6.3 – Cultivo .....	39
2.6.4 – Ciclo do Nitrogênio e Desnitrificação do nitrato.....	39
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 – CULTURA MICROBIANA .....	43
3.2 – MEIOS DE CULTIVO .....	43
3.2.1 – Efluente Sintético .....	43
3.2.2 –Meio para o Cultivo de Bactérias Redutoras de Sulfato.....	45
3.2.3 – Meio para o Cultivo de Bactérias Heterotróficas Anaeróbias .....	46
3.2.4 – Meio para o Cultivo de Bactérias Redutoras de Nitrato.....	47
3.3 – ACLIMATAÇÃO DA CULTURA MICROBIANA AO CARBONO.....	48
3.4 – PREPARO DO INÓCULO .....	49
3.5 – TESTES PRELIMINARES.....	50
3.5.1 – Teste de Sensibilidade da Cultura Microbiana ao Nitrato.....	50
3.5.2 – Concentração de Sulfato.....	50
3.5.3 – Concentração de Carbono.....	50
3.6 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	51
3.6.1 – Avaliação da Produção de H <sub>2</sub> S.....	55
3.6.2 – Análise Estatística das Respostas .....	56
3.7- INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO NA GERAÇÃO DE H <sub>2</sub> S.....	59
3.8 – EFEITO DA ADIÇÃO INTERMITENTE DE NITRATO NA BIOGÊNESE DE H <sub>2</sub> S .....	59
3.9 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SULFETO EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITRATO	61
3.10 – METODOLOGIA ANALÍTICA .....	61
3.10.1 – Sulfeto Total .....	62
3.10.2 – Sulfato.....	62
3.10.3 – Nitrato.....	63
3.10.4 – Nitrito .....	63
3.10.5 –QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA .....	64
3.10.5.1 – Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) .....	64
3.10.5.2 – Bactérias Anaeróbias .....	64
3.10.5.3 – Bactérias Redutoras de Nitrato (BRN).....	64
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	66
4.1 – ACLIMATAÇÃO DA CULTURA MICROBIANA .....	66
4.2 – TESTE DE PRELIMINARES.....	68

4.2.1 – Teste de Sensibilidade da Cultura Microbiana ao Nitrato.....	68
4.2.2 – Efeito da concentração de Sulfato .....	69
4.3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	70
4.3.1 – Análise estatística das respostas .....	70
4.3.1.1 – Produção de H <sub>2</sub> S.....	70
4.3.1.2 - Bactérias Redutoras de Sulfato .....	77
4.3.1.3 - Bactérias Heterotróficas Anaeróbias.....	83
4.3.1.4 – Consumo de Sulfato.....	89
4.3.1.5 – Consumo de Nitrato .....	94
4.3.1.6 – Resumo dos Resultados do Planejamento .....	98
4.4 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> S .....	100
4.5 – EFEITO DA ADIÇÃO INTERMITENTE DE NITRATO NA BIOGÊNESE DE H <sub>2</sub> S .....	101
4.6 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SULFETO COM OU SEM ADIÇÃO DE NITRATO....	112
4.6.1 – Consumo de Nitrato.....	113
4.6.2 – Crescimento Microbiano .....	114
4.6.3 – Produção de Sulfeto.....	120
4.6.3.1 – Modelo proposto cinética da produção de sulfeto sem adição de nitrato.....	122
4.6.3.2 – Modelo proposto para a cinética com adição nitrato.....	126
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>129</b>
5.1 – CONCLUSÕES .....	129
5.2 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES .....	130
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>140</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>157</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>158</b>
<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>159</b>
<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>160</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação esquemática da interação interespecies em bioreatores anaeróbios.....	14
Figura 2.2 – Interações das bactérias redutoras de sulfato .....	15
Figura 2.3 – Bactérias redutoras de sulfato da espécie <i>Desulfobacter postgatei</i> .....	18
Figura 2.4 – Esquema representativo da redução desassimilativa do íon sulfato.....	20
Figura 2.5 – Ciclo do enxofre na natureza.....	22
Figura 2.6 – Ciclo Biológico do Enxofre .....	23
Figura 2.7 - Possível rota para a redução desassimilativa do sulfato. ....	25
Figura 2.8 – Processo eletroquímico d corrosão .....	32
Figura 2.9 – <i>Garciella nitratreductens</i> , isolada de poços de petróleo no Golfo do México	38
Figura 2.10 – Ciclo do Nitrogênio na Natureza.....	42
Figura 3.1 – Esquema do Planejamento Composto Central.....	52
Figura 3.2 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário. ...	58
Figura 3.3 – Distribuição das etapas com o tempo de operação.....	60
Figura 4.1 – Superfície de resposta para a produção de sulfeto em função das concentrações de nitrato e sulfato.....	75
Figura 4.2 – Superfície de resposta para a produção de sulfeto em função das concentrações de carbono e sulfato .....	75
Figura 4.3 – Superfície de resposta para a produção de sulfeto em função das concentrações de carbono e nitrato.....	76
Figura 4.4 - Superfície de resposta para número de BRS em função das concentrações de nitrato e carbono .....	80
Figura 4.5 - Superfície de resposta para número de BRS em função das concentrações de sulfato e carbono.....	81
Figura 4.6 - Superfície de resposta para número de BRS em função das concentrações de nitrato e sulfato .....	81
Figura 4.7- Superfície de resposta para número de bactérias heterotróficas anaeróbias em função das concentrações de sulfato e carbono .....	87
Figura 4.8- Superfície de resposta para número de bactérias heterotróficas anaeróbias em função das concentrações de carbono e nitrato.....	87

Figura 4.9 - Superfície de resposta para número de bactérias heterotróficas anaeróbias em função das concentrações de sulfato e nitrato.....	88
Figura 4.10 - Superfície de resposta para o consumo de sulfato em função das concentrações de carbono e sulfato .....	91
Figura 4.11 - Superfície de resposta para o consumo de sulfato em função das concentrações de nitrato e sulfato.....	92
Figura 4.12 - Superfície de resposta para o consumo de sulfato em função das concentrações de nitrato e carbono.....	92
Figura 4.13 - Superfície de resposta para o consumo de nitrato em função das concentrações de sulfato e carbono .....	96
Figura 4.14 – Superfície de resposta para o consumo de nitrato em função das concentrações de nitrato e sulfato.....	97
Figura 4.15 – Superfície de resposta para o consumo de nitrato em função das concentrações de carbono e nitrato.....	97
Figura 4.16 – Variação da concentração de nitrato durante a primeira etapa experimental	103
Figura 4.17 – Numero de bactérias heterotróficas anaeróbias com o tempo de operação ..	105
Figura 4.18 – Concentração do consumo de nitrato em função do tempo de operação após adição de 1000mg/L.....	106
Figura 4.19 – Concentração e consumo de nitrato em função do tempo de operação na terceira etapa.....	108
Figura 4.20 Concentração e consumo de nitrato em função do tempo de operação após adição de nutrientes e nitrato .....	109
Figura 4.21 – Evolução da concentração de nitrato durante as quatro etapas .....	110
Figura 4.22 – Variação da concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias para as quatro etapas .....	111
Figura 4.23 – Perfil do consumo de nitrato .....	114
Figura 4.24 – Cinética do crescimento do consórcio microbiano em efluente sintético na ausência de nitrato .....	116
Figura 4.25 – Concentração de BRN,BRS e <a href="#">BHA</a> com o tempo de operação na cinética com adição de nitrato.....	117
Figura 4.26 – Produção de sulfeto e consumo de sulfato para os cultivos do consórcio microbiano realizado com e sem adição de nitrato.....	121
Figura 4.27 – Evolução da concentração de BRS, consumo de sulfato e produção de H <sub>2</sub> S	125

Figura 4.28 – Evolução do comportamento do consumo de nitrato e crescimento de BRN .....	127
---	-----

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Concentração de alguns constituintes de amostras de vinhaça proveniente da Usina São Martinho, Guariba, SP (2003) .....	6
Tabela 2.2 – Dados típicos de parâmetros medidos em efluentes brutos de curtumes com processos convencionais completos e distribuição por etapas básicas ou macro-etapas do processo (matéria prima: peles bovinas salgadas; dados em kg/t pele).....	7
Tabela 2.2 – Geração de efluentes líquidos no processamento de couro .....	9
Tabela 2.3 – Dados Termodinâmicos de algumas reações bioquímicas realizadas por BRS.....	19
Tabela 3.1 – Composição química do efluente sintético .....	44
Tabela 3.2 – Composição química do meio Postgate E .....	45
Tabela 3.3: - Composição química do meio fluido ao Tioglicolato .....	46
Tabela 3.4: - Composição química do Meio para BRN .....	47
Tabela 3.5: - Composição química da solução de elementos traço .....	48
Tabela 3.6: - Composição química da solução salina redutora .....	49
Tabela 3.7: Variáveis do processo .....	54
Tabela 3.8– Matriz do planejamento .....	55
Tabela 4.1 – Aclimação da cultura microbiana a diferentes concentrações de carbono ..	67
Tabela 4.2 – Teste de sensibilidade da cultura microbiana ao nitrato .....	69
Tabela 4.3 – Efeito d concentração de sulfato no crescimento das BRS.....	69
Tabela 4.4 – Resultados da produção de sulfeto, em diferentes condições experimentais .	71
Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla para produção de sulfeto .....	72
Tabela 4.6 – Concentração das BRS para cada condição experimental.....	77
Tabela 4.7 – Resultados da regressão múltipla para a quantificação de BRS.....	79
Tabela 4.8 – Concentração de BHA em diferentes condições experimentais.....	83
Tabela 4.9 – Resultados da regressão múltipla da quantificação de BHA .....	85
Tabela 4.10 – Consumo de sulfato nas condições experimentais estudadas.....	89

Tabela 4.11 - Resultados da regressão múltipla para a concentração de sulfato consumido.....	90
Tabela 4.12 – Resultados do consumo de nitrato, nas condições de cada experimento.....	94
Tabela 4.13 – Resultados da regressão múltipla para o consumo de nitrato .....	95
Tabela 4.14 – Resumo dos pontos de maximização e minimização das respostas .....	99
Tabela 4.15 – Valores finais dos testes realizados em distintas concentrações de carbono	100
Tabela 4.16 – Resultados obtidos na primeira etapa após cinco adições de 500 mg/L de nitrato a cada 2 dias .....	101
Tabela 4.17 – Resultados obtidos na segunda etapa, com adição de 1000mg/L de carbono .....	104
Tabela 4.18 – Resultados experimentais após adição de nutrientes .....	106
Tabela 4.19 – Resultados experimentais da quarta etapa .....	109
Tabela 4.20 – Taxa de consumo de nitrato em função do tempo em cada etapa do experimento .....	112
Tabela 4.21 – Resultados obtidos nas análises de monitoramento do consumo de nitrato durante a cinética com adição de nitrato .....	113
Tabela 4.22 - Concentração dos microrganismos presentes no consórcio microbiano durante a cinética de produção de sulfeto em presença e ausência de nitrato.....	119
Tabela 4.23 – Monitoramento de sulfato e de sulfeto durante os estudos cinéticos com e sem adição de nitrato .....	120
Tabela 4.24 - Parâmetros do modelo para a cinética de formação de BRS decomposição de sulfato e produção de H <sub>2</sub> S.....	124
Tabela 4.25 – Parâmetros do modelo para a cinética de formação de BRN e consumo de nitrato.....	127

## RESUMO

Este trabalho avaliou a redução da produção de sulfeto em um efluente sintético rico em sulfato. Foi empregada uma cultura mista, isolada da água de produção de petróleo de Carmópolis - SE, enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS). Inicialmente, a cultura microbiana foi aclimatada a concentrações crescentes de Carbono (0,1 - 5 g/L), podendo-se observar crescimento em todas as concentrações testadas. Foi realizado um planejamento composto central (PCC) para estudar a influência das concentrações de sulfato, carbono e nitrato na redução da produção de sulfeto em condição de anaerobiose. Foram avaliadas como respostas a produção de sulfeto; o crescimento de bactérias anaeróbias e bactérias redutoras de sulfato; o consumo de sulfato e nitrato. Com a otimização do processo de produção de sulfeto, empregando-se a técnica de superfície de resposta, obteve-se os pontos de minimização da produção de sulfeto. Os resultados da otimização para a minimização da produção de sulfeto mostraram que a razão  $\text{SO}_4^{2-}$ : C:  $\text{NO}_3^-$  de 3,6: 1: 5,1, levam a uma mínima produção de sulfeto (8,2 mg/L). Foi estudada a influência da concentração de carbono na produção de sulfeto, para as condições de otimização de sulfato e nitrato, comprovando-se através deste estudo que a concentração de carbono não oferece grande influência na produção do sulfeto. Também foi feito um estudo do comportamento da cultura microbiana perante a entrada intermitente de nitrato em tempos pré-estabelecidos, onde se notou que a taxa de consumo de nitrato só foi significativa quando havia um número maior de bactérias anaeróbias, uma maior concentração de nitrato e quando se adicionou nutrientes e fontes de carbono. Este fato deve ter ocorrido devido a presença de Bactérias Redutoras de Nitrato (BRN) na cultura microbiana. Os dados da condição de otimização foram então avaliados em duas cinéticas de produção de sulfeto uma na presença de nitrato e outra na ausência do mesmo.

**Palavras-chave:** nitrato, produção de sulfeto, bactérias redutoras de nitrato e bactérias redutoras de sulfato.



## ABSTRACT

This work analyzed the decrease of sulfite production in a sulfate rich synthetic effluent. A mixed culture was used, isolated from the water used in petroleum production in Carmópolis, Sergipe State, Brazil, enriched with sulfate reducing bacteria (SRB). Initially, the microbial culture was acclimated to rising concentrations of Carbon, (0.1 - 5.0 g/L), and growth could be observed in all tested concentrations. A Central Composite Design was used to study the influence of the concentrations of sulfate, carbon and nitrate on the decrease of sulfite production in anaerobic condition. The response parameters evaluated were the sulfite production, the growth of anaerobic and sulfate reducing bacteria and the consumption of sulfate and nitrate. The minimization points for the sulfite production were obtained with the process optimization using the response surface methodology. The results from the optimization for minimization of sulfite production showed that the point of  $\text{SO}_4^{2-}$ : C:  $\text{NO}_3^-$  de 3,6: 1: 5,1, lead to a minimum sulfite production (8.2 mg/L). The influence of carbon concentration on the sulfite production was studied for the optimized conditions of sulfate and nitrate, proving through this study that the concentration of carbon does not have substantial influence on the production of sulfite. Another study was carried out about the behavior of the microbial culture with intermittent addition of nitrate at pre-established intervals, and it could be observed that the rate of nitrate consumption was only significant when there was a larger number of anaerobic bacteria, a larger concentration of nitrate and when nutrients and carbon source had been added to the medium. This must have happened due to the number of Nitrate Reducing Bacteria (NRB) present in the microbial culture. The data from the optimized conditions were then evaluated in two kinetics of sulfite production, one in the presence and the other in the absence of nitrate.

**Key words:** nitrate, sulfite production, nitrate reducing bacteria, sulfate reducing bacteria.

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O tratamento anaeróbio de efluentes contendo altas concentrações de sulfato apresenta problemas relacionados principalmente à geração de sulfeto. O sulfeto é a forma de enxofre energeticamente mais estável e, sob condições anaeróbias, é altamente reativo, corrosivo e tóxico (COLLERAN *et al.*, 1994). Por conseguinte, o tratamento anaeróbio pode ocasionar diversos problemas físico-químicos (corrosão, odores, aumento na concentração da Demanda Química de Oxigênio (DQO) no efluente) e/ou biológicos (toxicidade, inibição), devido à produção de sulfeto de hidrogênio.

Efluentes deste tipo são gerados em vários processos industriais, como por exemplo, na exploração e produção de petróleo, e naqueles que fazem uso de ácido sulfúrico ou de matérias-primas ricas em sulfato (indústrias de fermentação e pesqueira), ou ainda naqueles que empregam compostos reduzidos de enxofre, tais como sulfeto (curtume, polpeamento Kraft), sulfito (indústria de papel sulfite) e tiosulfato (branqueamento de papel) (LENS *et al.*, 1995). Segundo Lima *et al.* (2000), quanto maior a disponibilidade de matéria orgânica para metabolização microbiana, maior a produção de sulfeto para um mesmo tempo de retenção hidráulica.

Este é um dos problemas cruciais dos sistemas *offshore* de exploração de petróleo, que empregam a injeção de água do mar no interior dos reservatórios, com a finalidade de estimular a saída do petróleo, técnica denominada de recuperação secundária de petróleo. A produção primária do petróleo recupera menos de 30% do óleo presente no interior de um reservatório. Contudo, o uso da água do mar, que contém quantidades apreciáveis de sulfato, em torno de 3 g/L, propicia a geração de altos teores de sulfeto por ação microbiana, o que favorece sobretudo a corrosão dos materiais metálicos (THOMAS, 2004)

Os microrganismos podem participar ativamente no processo de corrosão, causando a dissolução do metal quer direta ou indiretamente, através do seu metabolismo. Quando a corrosão do material metálico se processa sob a influência de microrganismos, ela é denominada de corrosão microbiologicamente induzida (CMI) (KERESZTES, FELHOSI & KÁLMÁN, 2001).

Atualmente, os processos de biocorrosão são reconhecidos como a maior fonte de problemas e falhas estruturais que afetam uma grande variedade de indústrias, como a petrolífera,

a celulósica e de pasta de papel, a de geração elétrica (por via térmica, hidroelétrica ou nuclear), a alimentar, entre outras (VIDELLA, 2003).

Os custos derivados de problemas com corrosão metálica, de acordo com avaliação realizada nos Estados Unidos da América pela U.S. Federal Highway Administration (FHWA), representam aproximadamente 4,2% do PIB, o que corresponde a cerca de US\$ 276 bilhões anuais (U.S. FEDERAL HIGHWAY ADMINISTRATION, 2002). Estima-se que aproximadamente 20% do total da corrosão sejam decorrentes da CMI (FLEMMING, 1996). No Brasil, segundo avaliação realizada pela Associação Brasileira de Corrosão, os custos relacionados à corrosão são de aproximadamente US\$ 15 bilhões por ano, representando 3% do PIB ([www.abraco.org.br](http://www.abraco.org.br)).

A indústria do petróleo se destaca como uma das que mais são afetadas pelos fenômenos corrosivos, em virtude da vultuosa quantidade de material metálico utilizado, muitas vezes recobrimdo grandes extensões de difícil acesso. A corrosão de estruturas metálicas, incluindo plataformas *offshore*, oleodutos e gasodutos, tem sido fonte de preocupação e, por conseguinte, foco de inúmeros estudos com a finalidade de prevenir possíveis rupturas das tubulações. Os vazamentos e/ou derrames de fluidos, além do problema econômico intrínseco, pode ser a causa de impactos ambientais catastróficos, em decorrência da contaminação do solo e/ou água em grandes proporções.

Dentre os vários microrganismos reconhecidamente envolvidos em casos de CMI, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas os principais microrganismos anaeróbios envolvidos (JAVAHERDASHTI, 1999). As BRS são bactérias heterotróficas que normalmente utilizam uma fonte de carbono orgânica e obtêm energia a partir da redução do íon sulfato. Como resultado dessa redução, ocorre a produção de sulfetos, bissulfetos e gás sulfídrico ( $H_2S$ ), potenciais agentes da corrosão anaeróbia do ferro (GONZÁLEZ *et al.*, 1998). O crescimento das BRS, principalmente por ocorrer invariavelmente associado à produção de  $H_2S$ , pode causar conseqüências adversas tanto nos processos industriais como no ambiente. Na indústria petrolífera, a geração de gás sulfídrico é denominada de acidificação biogênica ou *souring* biogênico. O gás sulfídrico, devido a sua alta toxicidade e corrosividade, causa problemas tanto para a saúde dos seres vivos quanto de ordem operacional, como a corrosão de tubulações, o plugueamento de poços, podendo inclusive concorrer para o aumento do conteúdo de  $H_2S$  no óleo e gás produzidos, o que representa uma redução drástica dos seus valores econômicos.

Uma alternativa que vem sendo cada vez mais explorada no controle da atividade de BRS e, conseqüentemente, da geração de H<sub>2</sub>S biogênico, de modo a prevenir a corrosão microbiologicamente induzida, tem sido a aplicação de nitrato (NEMATI *et al.*, 2001). O uso de nitrato, em substituição aos biocidas normalmente empregados, representa não só ganhos econômicos, mas a redução das agressões ao ambiente.

A tecnologia da exclusão biocompetitiva pela utilização do nitrato permite estimular seletivamente a microbiota presente em sistemas de injeção de água do mar e reservatórios de petróleo (HITZMAN *et al.*, 1998). Neste caso, há o favorecimento da atividade das bactérias redutoras de nitrato (BRN), o que em conseqüência reduz o metabolismo das BRS e, por conseguinte, implica em decréscimo do *souring* biogênico (MAXWELL *et al.*, 2003). Segundo esses autores, a presença de nitrato estimula a atividade das BRN, por ser seu metabolismo energeticamente mais favorável do que o consumo de sulfato pelas BRS. Por sua vez, a atividade mais intensa das BRN resulta na redução do suprimento de ácidos orgânicos, impedindo o desenvolvimento das BRS. Pode ainda ocorrer a atividade concomitante de espécies de BRN que apresentam a capacidade simultânea de oxidação de sulfeto (BRN-OS), ocasionando a remoção de sulfeto e a elevação do potencial redox do sistema, o que resulta no estabelecimento de condição imprópria para o crescimento das BRS (JENNEMAN E GERVETZ, 1999).

Neste contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial de aplicação de nitrato para redução da geração de H<sub>2</sub>S em sistemas anaeróbios constituídos de cultura mista enriquecida com Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).

Os objetivos específicos foram:

- Aclimatar uma cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS) através de cultivos sucessivos em meio sintético (meio Postgate E) com concentrações crescentes de carbono (ácidos orgânicos de cadeia curta), variando de 0,1 a 5 g/L;
- Selecionar as melhores condições operacionais através do planejamento composto central (PCC), avaliando a influência das concentrações de carbono, de sulfato e de nitrato sobre a redução da geração de sulfeto e o consumo de nitrato;
- Avaliar a geração de H<sub>2</sub>S, o consumo de nitrato e sulfato e a formação de nitrito em sistemas com adição intermitente de nitrato;

- Avaliar a cinética de biogênese de sulfeto, consumo de nitrato e crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias redutoras de nitrato (BRN) e bactérias heterotróficas anaeróbias (BHA) nas condições de otimização, com e sem adição de nitrato.

## **2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 EFLUENTES RICOS EM SULFATO**

Efluentes industriais ricos em sulfato são gerados em vários processos como, por exemplo, naqueles que fazem uso de ácido sulfúrico ou de matérias-primas ricas em sulfato (fermentação), ou ainda de compostos reduzidos de enxofre, tais como sulfeto (curtume, polpimento Kraft), sulfito (indústria de papel sulfite), e tiosulfato (branqueamento de papel) (LENS *et al.*, 1995), e na indústria de petróleo, na fase de extração e produção.

#### **2.1.1 - EFLUENTE PROVENIENTE DE USINA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL**

Os resíduos líquidos resultantes da fabricação do açúcar e álcool são: água de lavagem da cana-de-açúcar, água condensada dos evaporadores, água das colunas barométricas, restilo, água de lavagem dos pisos e equipamentos, água de refrigeração e água de descarga de caldeiras.

As destilarias de álcool ou aguardente produzem, como principal resíduo, a vinhaça. Este material, que recebe diversas denominações regionais (restilo, vinhoto, caldas, vinhote, tiborna, coxixi ou garapão), tem sido há longo tempo uma constante preocupação dos órgãos responsáveis pelo controle da poluição (BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

A composição da vinhaça depende de vários fatores, sendo os mais importantes a natureza e composição da matéria-prima e a operação do aparelho térmico de destilação. O estudo sobre a composição da vinhaça iniciou-se com a fermentação de mel final com Almeida em 1952 (apud BRAILE & CAVALCANTI, 1993). Ficando evidente tratar-se de um material líquido orgânico, constituído em média por 93% de água, com 75% dos constituintes sólidos sendo de origem orgânica.

Novos dados a respeito da composição de vinhaças foram apresentados em 1973 por Glória e seus colaboradores (apud BRAILE & CAVALCANTI, 1993). Apesar das vinhaças derivadas de mosto de melaço, mosto misto e mosto de caldo diferir bastante na concentração de enxofre expresso na forma de sulfato (Tabela 2.1), esta concentração média se encontra próxima a 4,43 kg/m<sup>3</sup> (Centro de Ciências Agrárias- UFSCAR, 2005)

Tabela 2.1 - Concentração de alguns constituintes de amostras de vinhaça proveniente da Usina São Martinho, Guariba, SP (2003).

Análise Química											
pH	M.O	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(%)			(Kg/m <sup>3</sup> )				(g/m <sup>3</sup> )			
4,2	1,57	0,38	0,045	2,17	0,6	0,50	1,87	1,0	51	3,9	2,0

Fonte: Centro de Ciências Agrárias- UFSCAR, 2005

### 2.1.2 - EFLUENTE DE CURTUMES

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de couros, com uma produção anual de 32,5 milhões de peles. Os Estados Unidos detêm a medalha de ouro neste quesito, mantendo há 5 anos a marca de 36 milhões de couros/ano. No Brasil, a produção vem aumentando significativamente, contabilizando em 2002, 16 milhões de unidades de couro exportadas, correspondentes ao montante de US\$ 1,04 bilhões, conforme o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior ([http://www.francal.com.br/codigo/p\\_noticias-conteudo.asp?noticia\\_ID=1221](http://www.francal.com.br/codigo/p_noticias-conteudo.asp?noticia_ID=1221), 12/12/2005).

O processo de transformação de peles em couros é normalmente dividido em três etapas principais, conhecidas por *ribeira*, *curtimento* e *acabamento*. O acabamento, por sua vez, é usualmente dividido em “acabamento molhado”, “pré-acabamento” e “acabamento final”.

As águas das operações de ribeira são fortemente alcalinas e esbranquiçadas (cal em excesso) e contêm sebo, pêlos, tecido muscular, gordura e sangue, em suspensão. Em solução, sais (principais ânions - sulfeto, sulfato, cloreto; principais cátions - sódio, cálcio, amônio), proteínas e aminoácidos diversos; em menor quantidade, tensoativos (detergentes), amins e eventualmente alguns conservantes ou biocidas e inseticidas (produtos orgânicos).

Os efluentes líquidos provenientes das operações *de piquel* e *curtimento* contêm principalmente sal (cloreto de sódio), ácidos minerais (sulfúrico, clorídrico), orgânicos (lático e fórmico), cromo e/ou taninos (orgânicos polifenólicos), proteínas e, eventualmente, alguns fungicidas (orgânicos aromáticos) em pequenas quantidades. São águas turvas, de cor

verde escuro (curtimento ao cromo) ou castanhos (curtimento por taninos), que apresentam pH ácido, podendo ter altas concentrações de DQO e DBO, conforme o curtente utilizado.

As principais águas residuais das operações de acabamento molhado ou pós-curtimento e de acabamento, normalmente apresentam alto teor de cromo (do enxugamento e, por vezes, do recurtimento); sais diversos (da neutralização); cores diversas, devido aos corantes utilizados (do tingimento), muitos à base de anilina ou azo-corantes, e temperatura mais elevada. Outras operações destes três grupos de etapas não apresentam efluentes líquidos ou estes são pouco significativos.

A Tabela 2.2 apresenta alguns valores médios ou faixas de valores para parâmetros medidos nos efluentes brutos de curtumes.

Tabela 2.2 - Dados típicos de parâmetros medidos em efluentes brutos de curtumes com processos convencionais completos e distribuição por etapas básicas ou macro-etapas do processo (matéria-prima: peles bovinas salgadas; dados em kg/t pele)

<b>Etapa Básica Do Processo</b>	<b>Uso de Água(m<sup>3</sup>/t)</b>	<b>Cromo (Cr<sup>3+</sup>)</b>	<b>Sulfeto</b>	<b>N Total</b>	<b>Cloreto</b>	<b>Sulfato</b>	<b>Óleos e Graxas</b>
<b>Ribeira</b>	7-25		2-9	9-14	120-150	5-20	5-8
<b>Curtimento</b>	1-3	2-5		0-1	20-60	30-50	1-2
<b>Pós-curtimento</b>	4-8	1-2		1-2	5-10	10-40	3-8
<b>Acabamento</b>	0-1	0-10	0-4	0-5	----	---	---
<b>Total</b>	12-37	3-7	2-9	10-17	145-220	45-110	9-18

fonte: grupo IUE 6, IULTCS, 2002

As cargas poluentes emitidas são significativas, sendo a fase de ribeira até a etapa anterior ao curtimento, as responsáveis pela maior parte das cargas poluentes e tóxicas dos efluentes de curtumes (Tabelas 2.2). Adicionalmente, o sulfeto, presente nos efluentes da ribeira, é mais tóxico para o ser humano do que o cromo do curtimento, considerando que este último está na sua forma trivalente.

Além da carga poluidora inerente, caso certos cuidados operacionais não sejam tomados, os efluentes líquidos dos curtumes que realizam a ribeira podem apresentar problemas de odor devido à formação de gás sulfídrico, proveniente do sulfeto, o que pode causar graves problemas de saúde para a população no entorno.



### 2.1.3 - EFLUENTE DE CELULOSE E PAPEL

Como um dos *players* do mercado globalizado, o setor de papel e celulose brasileiro ocupa a sétima posição mundial, com uma produção anual de 9,4 milhões de toneladas de celulose, e é o 11º do mundo no *ranking* dos fabricantes de papel, com um volume de 8,2 milhões de toneladas de papel produzidas por ano. ([www.bahiainvest.com.br/port/segmentos/papel.asp](http://www.bahiainvest.com.br/port/segmentos/papel.asp), acessado em 12/2005).

A produção de celulose é um processo que requer grandes quantidades de água e gera, também, grande vazão de efluentes. Além dos volumes consideráveis de água e de efluentes, algumas características químicas dos efluentes gerados na fabricação de celulose, notadamente cor e compostos orgânicos clorados (AOX), são potenciais causadoras de danos ambientais ([www.cetesb.sp.gov.br/Ambiente/producaolimpa/casos/caso07.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Ambiente/producaolimpa/casos/caso07.pdf), acessado em 12/2005)

O emprego do sulfato ou processo *Kraft* tem sido muito usado na fabricação de celulose porque diminui o custo de fabricação devido a recuperação de produtos químicos e calor, partindo da queima do licor-negro proveniente do cozimento. Por isso, os efluentes do processo sulfato contêm pouca lignina e produtos químicos cozidos, porém são ricos em sulfato (BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

O processo sulfato, que utiliza soluções alcalinas para dissolver a lignina e outras partes não celulósicas da madeira (a lignina é a substância que uni as fibras de celulose umas às outras), tem a vantagem de produzir uma celulose de alta qualidade. O processo de digestão pode ser obtido por cargas (intermitentes), produção direta ou indireta ou por produção direta e contínua.

### 2.1.4-ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

A água co-produzida representa a maior corrente dos efluentes gerados nas atividades de exploração, perfuração e produção de petróleo. A quantidade de água gerada com óleo associado varia muito durante o processo de produção de petróleo. No início, um campo produz pouca água, em torno de 5 a 15% da corrente produzida. Entretanto, à medida que a vida econômica dos poços vai se esgotando, o volume de água pode aumentar significativamente, correspondendo a uma faixa de 75 a 90% (HANG & VARADARAJ, 1996; ALI *et al.*, 1998; THOMAS, 2004).

A produção excessiva de água é um problema sério nos campos de petróleo maduros, isto é, nos campos que têm permanecido em operação por um longo período de tempo. Segundo STEPHENSON (1991), o volume de água produzida em um campo maduro pode exceder 10 vezes o volume de óleo produzido. Esta produção de água resulta numa coluna hidrostática que dificulta a recuperação de óleo nos poços.

Visto que muitos campos de óleo e gás em regiões como as do Mar do Norte, África Ocidental, Ásia Pacífica e Golfo do México têm alcançado, no estágio maduro, uma produção excessiva de água, esta se tornou uma das maiores preocupações no negócio de produção de óleo e gás. Em média, para cada m<sup>3</sup>/dia de petróleo produzido são gerados de 3 a 4 m<sup>3</sup>/dia de água. Há campos onde este número se eleva a 7 ou mais m<sup>3</sup>/dia (THOMAS, 2004).

A produção *offshore* primeiramente trata as misturas óleo/água por meio de separação mecânica dos fluidos. Os fluidos produzidos (água/óleo/gás) passam, inicialmente, por separadores, que podem ser bifásicos ou trifásicos, atuando em série ou paralelo (THOMAS, 2004). No separador bifásico ocorre a separação gás/líquido, enquanto que no separador trifásico ocorre, também, a separação óleo/água.

Tipicamente, nas plataformas marítimas, a água proveniente dos separadores e tratadores de óleo é enviada para um vaso degaseificador, com a função de remover traços de gás ainda presentes no líquido. Em seguida a água passa por um separador água/óleo e finalmente em um tubo de despejo. Depois da remoção da maior parte do óleo, a água produzida é tipicamente descartada abaixo da superfície do mar. Todo o óleo recuperado nessas etapas é recolhido em um tanque para sua recuperação (VIEIRA, 2003).

Os hidrociclones e os flotores são os equipamentos de separação óleo/água mais utilizados pela indústria do petróleo. Estes equipamentos não separam os compostos dissolvidos na água de produção. A flotação, por exemplo, promove a recuperação do resíduo de óleo através de separação gravitacional, enquanto que os hidrociclones propicia a aceleração deste processo (FANG & LIN, 1988; FLANIGAN et al., 1989 BURKE et al., 1991; RIVIERE & GARLAND, 1994; CASTRO et al., 1998).

Depois do reservatório de separação, a água, contendo ainda óleo na forma de gotas microemulsionadas, precisa ser descartada junto com muitos produtos químicos dissolvidos e microrganismos. Esses produtos químicos e microrganismos representam um grande risco e poluição ambiental marinha e terrestre (GUIDA & FRUGE, 1995; ZITHA, 1999).

Em muitos campos terrestres do mundo, áreas *onshore*, a água produzida pode ser injetada em formações subterrâneas que já contenham águas não disponíveis para o consumo humano, reinjetada em poços para sua utilização no processo de recuperação secundária ou

ainda descartada, após devido tratamento. Segundo STEPHENSON (1991) e THOMAS (2004), a água produzida em muitas áreas *onshore* e *offshore*, localizadas em países tropicais, é descartada diretamente no ambiente.

O descarte de tais volumes de resíduos no meio ambiente é preocupante devido ao pouco conhecimento sobre seus constituintes e, sobretudo, sobre seus efeitos a médio e longo prazo. Até o momento, os estudos realizados mostram que esse descarte pode ser feito sem qualquer dano ao ambiente aquático, desde que haja a diluição adequada do efluente (HANSEN & DAVIES, 1994; STROMGREN *et al.*, 1995; UTVIK, 1999; THOMAS, 2004).

#### **2.1.4.1 - CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE PRODUÇÃO**

As águas de produção contêm uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos, cuja composição e quantidade variam em função das características do reservatório e da localização, bem como da idade do poço, do tipo de óleo a ser extraído, e até mesmo, do método de recuperação deste óleo. Em geral, a relação água/óleo aumenta com o tempo (SEABRA, 1984; BURNS *et al.*, 1999). Dentre os compostos que compõem as águas produzidas encontram-se (STEPHSON, 1991; HANSEN & DAVIES, 1994; TELLEZ *et al.*, 2002):

- Compostos de óleo dispersos e dissolvidos;
- Minerais dissolvidos;
- Produtos químicos utilizados durante a produção;
- Sólidos produzidos, incluindo produtos de corrosão e incrustação, graxas e asfaltenos;
- Microrganismos;
- Gases dissolvidos, incluindo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S.

Os compostos orgânicos ocorrem naturalmente na água de produção e suas quantidades relativas e distribuição de peso molecular variam consideravelmente de campo para campo.

Óleo é o termo comumente aplicado para definir este material orgânico disperso ou dissolvido. O óleo disperso consiste em pequenas gotas de óleo individuais que estão suspensas na fase aquosa. Já o óleo solúvel pode apresentar dois subgrupos: os compostos parcialmente solúveis e os compostos muito solúveis.

Os sais constituem o principal grupo de compostos inorgânicos presentes na água de produção. a concentração de sólidos dissolvidos totais (SDT) pode variar entre 100 a

300.000 mg/L, sendo que a concentração de cloreto de sódio pode corresponder a até 80% deste total (TELLEZ & KHANDAN, 1996).

Normalmente, os cátions presentes na água de produção são:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; e os ânions são  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{HCO}_3^-$ , os quais afetam a capacidade de tamponamento e a salinidade. A água produzida também pode conter traços de vários metais pesados, tais como cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), níquel (Ni), prata (Ag) e zinco (Zn), assim como traço de metais radioativos como potássio<sup>40</sup> ( $\text{K}^{40}$ ), urânio<sup>238</sup> ( $\text{U}^{238}$ ), tório<sup>232</sup> ( $\text{T}^{232}$ ), ou rádio<sup>226</sup> ( $\text{R}^{226}$ ).

Em relação aos metais radioativos, o risco ambiental associado à possível presença desses compostos é praticamente nulo, já que estes apresentam concentrações extremamente baixas (HANSEN & DAVIES, 1994)

Os produtos químicos são normalmente adicionados para tratar ou prevenir os problemas operacionais que, em geral, ocorrem no processo e produção (STEPHENSON, 1991). A quantidade e o tipo de produtos químicos requeridos variam de plataforma para plataforma, e podem ser utilizados de forma batelada ou contínua. Em tratamentos do tipo batelada uma grande quantidade do produto é injetada no poço. Os produtos que devem ser usados desta maneira são os inibidores de incrustação e de corrosão e biocidas. Já no tratamento contínuo, esses produtos são adicionados de modo que seus níveis na corrente de água produzida sejam inferiores ao seu grau de toxicidade. Os produtos químicos que são utilizados neste processo são floculantes, coagulantes, desestabilizadores de emulsão e antiespumantes.

Diversos microrganismos, tais como bactérias, algas e fungos estão frequentemente presentes nas águas produzidas. Estes microrganismos podem gerar, através de seus metabolismos, substâncias que dificultam a separação água/óleo e posterior tratamento desse óleo.

Dentre as bactérias, destacam-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Sua presença tem sido observada constantemente em águas de produção e seu metabolismo gera substâncias de caráter corrosivo, como ácido sulfídrico (POSGATE, 1984; RABUS et al. 1996; NEMATI, 2001; THOMAS, 2004).

A água de produção é muito rica em sulfato, o que pode incidir em alta produção de sulfeto pela atividade de BRS. O aumento da concentração de  $\text{H}_2\text{S}$  pode resultar em riscos de corrosão associados à falhas catastróficas dos materiais. Existe ainda, a preocupação com os impactos ambientais gerados por vazamentos e/ou derrames de fluidos da indústria de

petróleo, os quais levam à contaminação do solo, ar e/ou água, tanto pelos fluidos, como pelo próprio  $H_2S$ .

Por isso, a corrosão microbiológica é responsável pela maioria dos processos de deterioração nas linhas de água de injeção em instalações de recuperação secundária do petróleo (CRAVO, 2001)

## 2.2 - BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA

No processo de conversão da matéria orgânica em condições de ausência de oxigênio são utilizados aceptores de elétrons inorgânicos como  $NO_3^-$  (redução de nitrato),  $SO_4^{2-}$  (redução de sulfato), ou  $CO_2$  (formação de metano) (ATLAS, 1981 apud VIEIRA, 2003). Muitos pesquisadores têm demonstrado que benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) podem ser degradados em ecossistemas, em condição de anaerobiose (BOOPATHY, 2003). Alcanos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e alcenos também podem ser degradados em condições anaeróbias (SUFLITA *et al.*, 2000).

O tratamento anaeróbio de efluentes oferece uma série de benefícios que superam as poucas limitações. Dentre as vantagens está à baixa produção de lodo anaeróbio, que inclusive pode permanecer ativo por vários meses independente de alimentação e, principalmente a redução de custos, pois não requer aeração e, freqüentemente, dispensa a adição de nutrientes. No que concerne às limitações, podem ser citadas: partida lenta, a não ser que seja utilizado um lodo previamente aclimatado e a geração de gás sulfídrico, um agente corrosivo e tóxico para os seres vivos.

Na digestão anaeróbia, diversos grupos de microrganismos atuam interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de haver produção de novas células microbianas. As bases bioquímicas e as complexas relações simbióticas existentes, entre as numerosas espécies bacterianas envolvidas, ainda não foram totalmente elucidadas, mesmo porque envolveu a interação de várias e distintas espécies microbianas (MCCARTY, 1982, apud VIEIRA, 2003).

Os microrganismos que participam do processo de decomposição anaeróbia podem ser divididos em quatro importantes grupos de bactérias, com comportamentos fisiológicos distintos: bactérias fermentativas, bactérias acetogênicas, archeas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (BARTON, 1995).

De acordo com a composição dos substratos disponíveis, as diversas bactérias que compõem o lodo anaeróbio seguirão diferentes vias metabólicas (BARBOSA, 1988). Um modelo proposto por MCCARTY apresenta o processo de digestão anaeróbia e suas interações, em três estágios principais (SPEECE,1996):

- *Hidrólise e Fermentação*

A hidrólise dos carboidratos, proteínas e lipídeos originam açúcares, aminoácidos, ácidos graxos de cadeias longas e álcoois, que por fermentação originam ácidos orgânicos voláteis, principalmente o ácido acético, outros álcoois, hidrogênio e dióxido de carbono. Essa etapa é mediada pela atividade de bactérias denominadas hidrolíticas-fermentativas, representadas por uma grande variedade de espécies, muitas anaeróbias estritas, como as do gênero *Clostridium*, e algumas facultativas, como as do gênero *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Escherichia*.

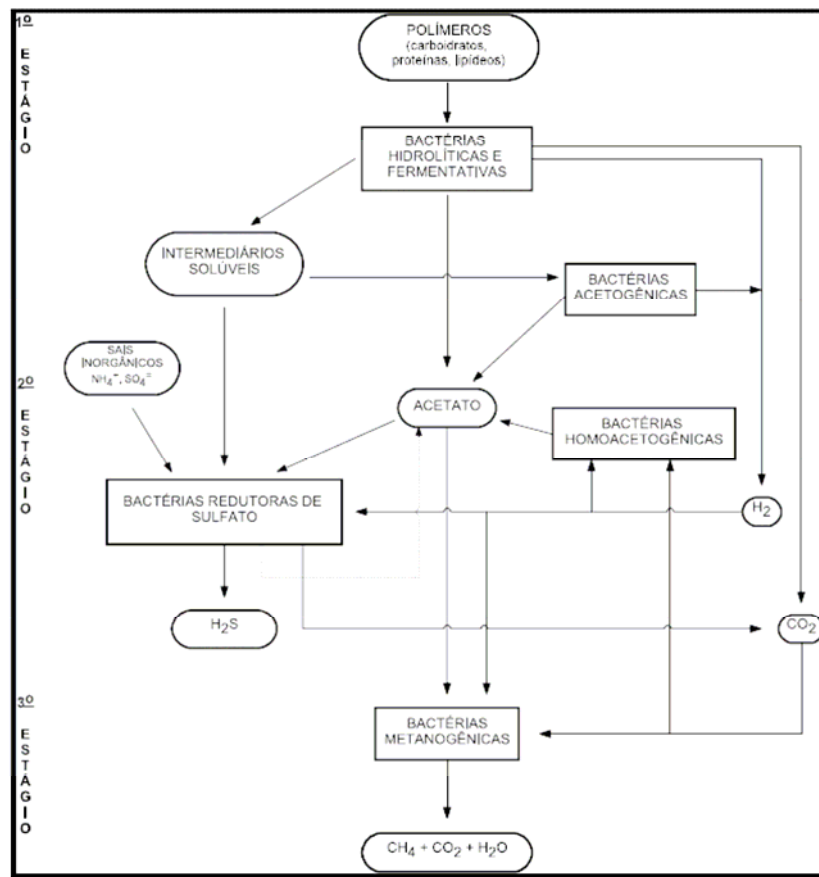
- *Acetogênese e Desidrogenação*

Neste estágio participam 3 grupos bacterianos distintos: as bactérias acetogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as bactérias redutoras de sulfato (BRS), que serão detalhadas *a posteriori*. As bactérias envolvidas, de uma forma geral, utilizam os intermediários solúveis, originados no estágio anterior como o acetato, o H<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub>, com formação de mais acetato, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e também de H<sub>2</sub>S (gás sulfídrico). Como exemplo de bactérias que compõem o grupo das acetogênicas, as espécies: *Syntrophomonas wolfei* e *Syntrophobacter wolinii*. Como exemplo de espécies homoacetogênicas: *Clostridium acetivum*, *Clostridium thermoacetivum* e *Acetobacter woodii*.

- *Metanogênese*

Este envolve um grupo de bactérias especiais, tidas como responsáveis pela fase limitando processo, as archeas metanogênicas. Essas espécies bacterianas, através da descarboxilação do acetato ou da redução do dióxido de carbono pelo hidrogênio, produzem o metano, a forma gasosa mais reduzida do carbono na natureza (VAZOLLER,1993). As metanogênicas são anaeróbias estritas, se desenvolvem somente em ambientes com baixo potencial redox (< -300 mV) e utilizam substratos muito específicos para o crescimento e produção do metano, tais como ácido acético, hidrogênio, dióxido de carbono, formiato, metilaminas e metanol. Mas, somente o gênero *Methanosarcina* apresenta capacidade de utilizar quase todos estes substratos.

A figura 2.1 mostra uma representação esquemática da interação das varias espécies envolvidas no processo de biodegradação em reatores anaeróbios.



**Figura 2.1** - Representação esquemática da interação interespecífica em bioreatores anaeróbios

### 2.3 - BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

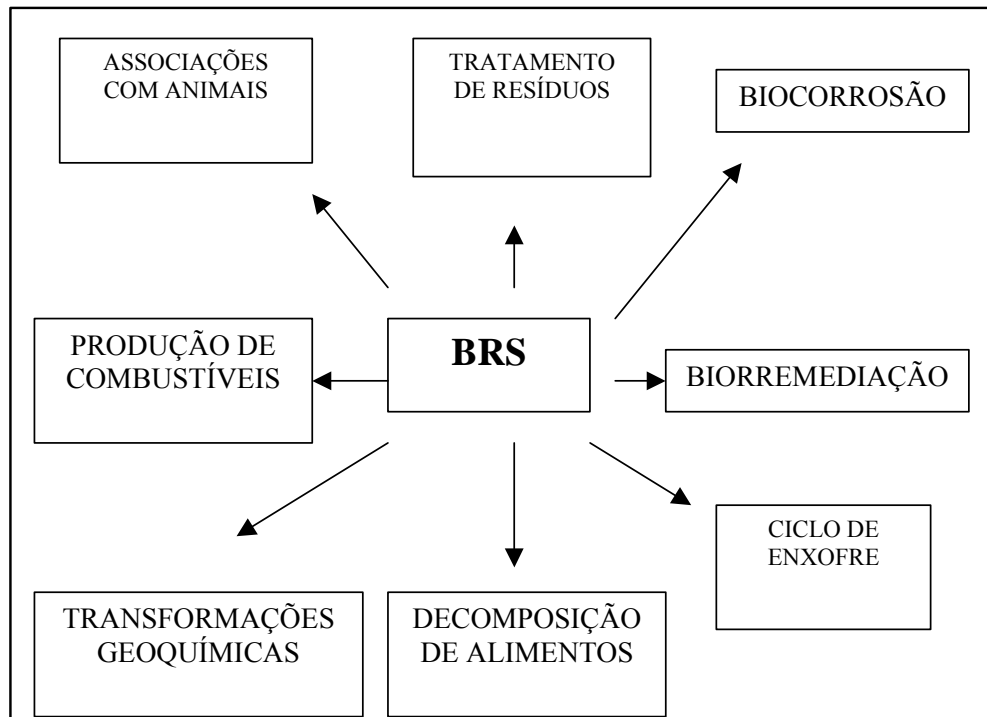
As bactérias redutoras de sulfato (BRS) formam um grupo fisiológico de procariontes que têm a capacidade exclusiva de utilizar sulfato como aceptor final de elétrons durante a respiração (BARTON & TOMEI, 1995). Essas bactérias fazem parte de um grupo distinto de microrganismos presentes em uma grande variedade de ambientes anaeróbios (KRUMHOLZ *et al.*, 2002; ODOM & SINGELTON, 1993).

Inicialmente pouca atenção foi dispensada às BRS, no entanto, pesquisadores demonstraram interesse em descobrir suas interações com outras formas de vida e seus processos metabólicos. Então, foi descoberto que essas bactérias estão amplamente distribuídas na Terra e reconheceu-se que esses organismos desenvolvem papéis significantes na natureza, em virtude do seu potencial para numerosas interações, conforme ressalta a Figura 2.2. Uma característica marcante das BRS é a maneira pela qual o sulfato é metabolizado (BARTON & TOMEI, 1995).

As bactérias redutoras de sulfato foram descobertas por Beijerinck em 1895, que descreveu a espécie *Spirillum desulfuricans*. Logo sucederam-se estudos e pesquisas a respeito destas bactérias e outros fatos marcantes na caracterização das BRS (POSTGATE, 1984).

Nos últimos anos, as BRS vêm sendo reconhecidas por atuarem em vários processos, tais como: corrosão microbiologicamente induzida, biodessulfurização e remediação ambiental.

Na corrosão microbiologicamente induzida, o  $H_2S$  produzido através do metabolismo das BRS ataca as superfícies de metais empregados na construção de equipamentos e dutos, e inclusive de não metais, como concreto (GENTIL, 1996).



**Figura 2.2** – Interações das bactérias redutoras de sulfato.

**Fonte:** BARTON & TOMEI, 1995.

Por outro lado, as BRS podem ser empregadas na biodessulfurização do petróleo e de seus derivados. Os combustíveis fósseis apresentam, em sua composição, compostos sulfurados, em concentrações variáveis, que são muito prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (emissão de  $SO_x$ , formação da chuva ácida, redução da fertilidade do solo) e às indústrias (corrosão de equipamentos). Para diminuir a concentração desses compostos o petróleo é atualmente tratado na fase de refino e produção. A biodessulfurização anaeróbia é



uma opção mais atrativa do que a aeróbia, já que o produto final do processo ( $H_2S$ ) pode ser facilmente recuperado por operações nas refinarias (VIEIRA, 2003).

O emprego das bactérias redutoras de sulfato também tem sido estudado para aplicação na biorremediação de solos, águas subterrâneas e outros ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (ALVAREZ & DA SILVA, 2004; BOOPATHY, 2003; KLEIKEMPER *et al.*, 2002; KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001; SUFLITA *et al.*, 2000; WIDDEL *et al.*, 1999; LOVLEY *et al.*, 1996). Essas bactérias conseguem ter atividade metabólica na presença de compostos reconhecidamente recalcitrantes e prejudiciais ao meio ambiente.

### 2.3.1 – CARACTERIZAÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato estão amplamente distribuídas em ambientes terrestres e aquáticos. A presença de BRS com alta atividade metabólica é facilmente reconhecida pelo enegrecimento da água ou dos sedimentos devido a precipitação do sulfeto de ferro ( $FeS$ ), e pelo odor característico de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Essas bactérias são facilmente encontradas em ambientes marinhos, estuários, sedimentos e lagos salinos ou hipersalinos, por conterem altas concentrações de sulfato. Porém, já foram encontradas BRS ativas em ambientes não salinos e em água doce. Também é relatada a presença de BRS em ambientes poluídos como em plantas de purificação anaeróbia, em alimentos deteriorados, plantas de lodo, em águas de campos de exploração de óleo, ambientes contaminados com hidrocarbonetos e com compostos halogenados, etc (POSTGATE, 1984; BARTON, 1995; KLEIMKEMPER *et al.*, 2002).

As bactérias redutoras de sulfato podem ser classificadas em 4 grupos: mesófilas Gram-negativas, eubactérias termófilas Gram-negativas, Gram-positivas formadoras de esporos e arqueobactérias termófilas Gram-negativas (POSTGATE, 1984; BARTON, 1995).

As BRS mesófilas Gram-negativas não formadoras de esporos são as mais difundidas na natureza. Dentre elas, cinco gêneros oxidam parcialmente compostos orgânicos a acetato: *Desulfovibrio*, *Desulfobotulus*, *Desulfobulbus*, *Desulfohalobium* e *Desulfomicrobium*. Enquanto sete gêneros oxidam substratos orgânicos completamente a  $CO_2$ : *Desulfoarculus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfonema* e *Desulfosarcina* (BARTON, 1995).

Os dois gêneros mais conhecidos de bactérias redutoras de sulfato são *Desulfovibrio*

e *Desulfotomaculum*, mas ao longo dos anos outros gêneros foram identificados (*Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus*, etc.) (POSTGATE, 1984). O gênero *Desulfovibrio* é o mais conhecido, pois seus membros são geralmente fáceis de isolar e purificar. Esse gênero inclui cinco espécies que não esporulam e têm flagelos polares (BARTON & TOMEI, 1995).

As células de BRS apresentam morfologia bastante diversificada, podendo ser esféricas, ovais, espirais, na forma de bastonetes ou de vibrios, com diâmetro variando de 0,4 a 3,0  $\mu\text{m}$ . Algumas espécies apresentam mobilidade e outras são capazes de esporular. As filamentosas (*Desulfonema*) exibem um movimento deslizante (HOLT *et al.*, 1994 apud VIEIRA, 2003)

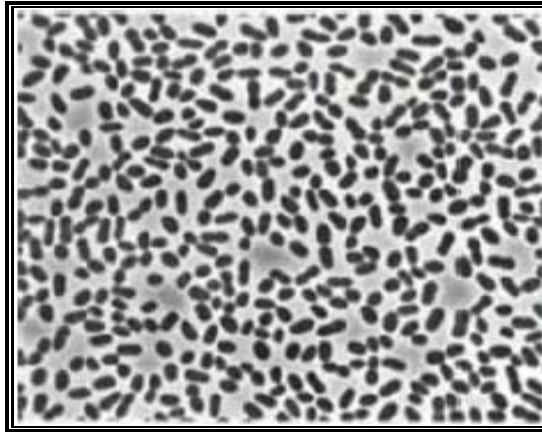
Os membros do gênero *Desulfovibrio* são geralmente curvos e sigmóides, mas existem exceções à regra como, por exemplo, a espécie *Desulfovibrio desulfuricans* que têm a forma de bastonetes ou vibrios. Desulfovibrios são propensos a pleomorfismos em culturas velhas ou adquirem a forma espiralada em ambientes inadequados ao crescimento (POSTGATE, 1984).

A maioria dos desulfovibrios são monotríquios, apesar de serem conhecidas cepas de *Desulfovibrio desulfuricans* sem flagelos. Algumas espécies de *Desulfovibrio* apresentam duplo flagelo (POSTGATE, 1984).

As bactérias do gênero *Desulfotomaculum* são Gram-positivas formadoras de esporos e incluem espécies que oxidam compostos orgânicos completa e incompletamente. Neste gênero há espécies termófilas, que sobrevivem em temperaturas entre 50 e 65°C, principalmente devido à formação de esporos (BARTON, 1995).

O gênero *Thermodesulfobacterium* é parte do grupo das eubactérias termófilas e Gram-negativas. Neste gênero há espécies que são nutricionalmente restritas e que não oxidam completamente compostos orgânicos. As arqueobactérias redutoras de sulfato são Gram-negativas, termófilas; são encontradas em áreas hidrotermais submarinas anaeróbias e necessitam de sal e altas temperaturas para seu crescimento (BARTON, 1995).

A Figura 2.3 mostra a fotografia de uma colônia de bactérias redutoras de sulfato da espécie *Desulfobacter postgatei*.



**Figura 2.3** - Bactérias redutoras de sulfato da espécie *Desulfobacter postgatei*.

### 2.3.2 – CRESCIMENTO

As bactérias redutoras de sulfato são microrganismos estritamente anaeróbios. Algumas podem crescer na ausência de sulfato, usando outro acceptor final de elétrons, como nitrato e/ou nitrito, entretanto não podem crescer tendo o oxigênio como acceptor final de elétrons.

Essas bactérias crescem lentamente se comparadas com outras espécies bacterianas, como, por exemplo, as do gênero *Pseudomonas* (POSTGATE, 1984). O crescimento de BRS mesófilas é geralmente lento, levando de alguns dias a duas semanas a 30°C, de acordo com a espécie. Já as termófilas crescem mais rapidamente; a 55°C, o crescimento leva de 12 a 18 horas. Uma razão para o crescimento lento é a geração de H<sub>2</sub>S - produto da respiração - que diminui a taxa de crescimento que pode ser zero para altas concentrações de H<sub>2</sub>S. Esse fenômeno pode ser devido à toxicidade intrínseca do H<sub>2</sub>S aos sistemas vivos, mas é mais provável que seja decorrente da insolubilidade do ferro pela formação de FeS (POSTGATE, 1984).

O crescimento das culturas de *Desulfovibrio*, em diferentes meios, é linear ao invés de exponencial. É possível generalizar de forma qualitativa que os organismos produtores de acetato, como a maioria das espécies dos gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomacula*, crescem rapidamente, ocorrendo duplicação da concentração celular, a 30°C, em 3 a 6 horas. Os tipos que utilizam acetato, como *Desulfobacter spp*, crescem muito mais lentamente e, normalmente, são incapazes de dobrar a massa celular em tempos inferiores a 20 horas (POSTGATE, 1984).

### 2.3.3 – CULTIVO

Uma gama de substratos podem ser utilizados pelas bactérias redutoras de sulfato como fonte de energia (doadores orgânicos de elétrons) para crescimento inclui lactato, formiato, piruvato, malato, fumarato, colina e certos alcóois primários como metanol, etanol, propanol e butanol, e até contaminantes ambientais (KRUMHOLZ *et al.*, 2002; ODOM & SINGELTON, 1993). Algumas podem também utilizar alguns constituintes do petróleo como os alcanos, tolueno, benzeno e hidrocarbonetos poliaromáticos (SOGIN *et al.*, 2003). Comoceptor final de elétrons, utilizam o íon sulfato que pode ser substituído por tiosulfato, tetracionato, sulfito ou metabissulfito (SÉRVULO, 1991). Em adição aos substratos orgânicos, hidrogênio gasoso pode atuar como doador na cadeia de transporte de elétrons realizada por *Desulfovibrio*. As principais reações bioquímicas realizadas com alguns desses substratos estão apresentadas na Tabela 2.3 bem como a variação da Energia Livre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ), a 27°C, associada a cada uma delas.

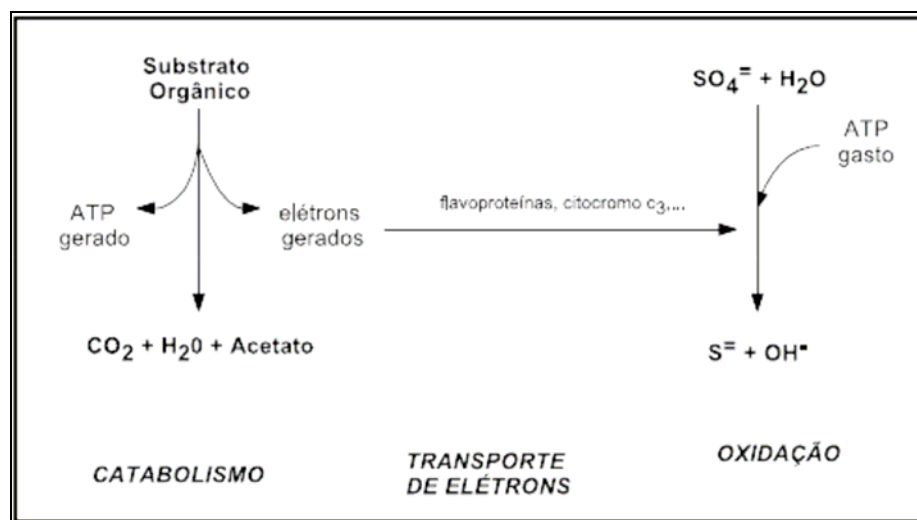
**Tabela 2.3** - Dados termodinâmicos de algumas reações bioquímicas realizadas por BRS.

Reação a 27 °C	$\Delta G^0$ (KJ/mol)
$Acetato^- + SO_4^{2-} \Leftrightarrow H_2O + CO_2 + HCO_3^- + S^{2-}$	-12,41
$4Piruvato^- + SO_4^{2-} \Leftrightarrow 4Acetato^- + 4CO_2 + S^{2-}$	-331,06
$2Lactato^- + SO_4^{2-} \Leftrightarrow 2Acetato^- + 2CO_2 + 2H_2O + S^{2-}$	-140,45
$4Formiato^- + SO_4^{2-} \Leftrightarrow 4HCO_3^- + S^{2-}$	-182,67
$CH_4 + SO_4^{2-} \Leftrightarrow CO_2 + 2H_2O + S^{2-}$	+16,72
$4H_2 + SO_4^{2-} \Leftrightarrow S^{2-} + 4H_2O$	-123,98

Fonte: RIZZO & LEITE, 2004

A redução desassimilativa do sulfato é um tipo de metabolismo essencialmente oxidativo, que ocorre em condições de anaerobiose. O metabolismo pode ser dividido em dois processos não oxidativos, catabolismo e transporte de elétrons, seguidos por um processo oxidativo, a redução do sulfato, conforme é verificado observando-se a Figura 2.4, uma moléculade ATP é gerada ao nível do catabolismo do substrato orgânico e uma molécula de ATP é consumida na redução do íon sulfato. Desta forma se somente essas reações ocorressem a nível celular, os microrganismos não poderiam apresentar crescimento. No

entanto, o que se observa é o crescimento dos microrganismos e a cadeia respiratória é o sistema alternativo de fosforilação mais provável para a geração de ATP (POSTGATE, 1984).



**Figura 2.4** - Esquema representativo da redução desassimilativa do íon sulfato

Fonte : RIZZO & LEITE, 2004

As BRS utilizam nitrogênio, orgânico ou inorgânico, para crescimento; algumas linhagens podem fixar nitrogênio gasoso. Determinadas linhagens são também capazes de crescer às custas de nitrato como acceptor final de elétrons. Barton (1995) isolou uma cepa de *Desulfovibrio* sp capaz de usar nitrato, nitrito e 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como fontes de nitrogênio e aceptores de elétrons para crescimento.

Os metais são muito importantes como cofatores para muitas enzimas das BRS, por isso devem estar presentes nos meios de crescimento. O ferro é essencial para a produção de citocromos e produção de hidrogenases (enzima responsável pela oxidação do hidrogênio molecular). Níquel e selênio são necessários para a atividade dessas enzimas.

Vários tipos de meios de cultura são utilizados para crescimento das BRS. Porém, o meio mais comumente usado é o meio Postgate C, que tem a seguinte composição, por litro:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0 g;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 4.5 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.06 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 g; Extrato de leveduras, 1.0 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.004 g; Citrato de sódio, 0.3 g e Lactato de sódio (ou outro doador de elétrons), 3.5 g. O potencial de redução do meio deve estar abaixo de 150 mV e o ambiente redutor pode ser obtido através do uso de 1mM de  $\text{Na}_2\text{S}$  ou 1mM de tioglicolato de sódio mais 1mM de ascorbato de sódio (BARTON, 1995).

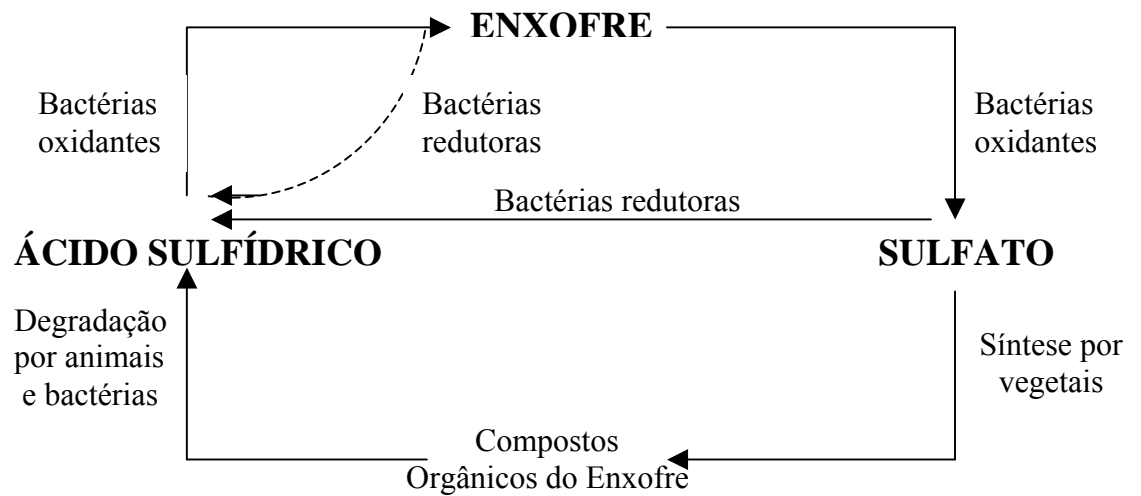
As BRS podem ser encontradas tanto em ambientes ácidos (pH 4,0) (POSTGATE, 1984) como em ambientes alcalinos com pH até 9,5 (BARTON, 1995).

Diferentemente da maioria das bactérias anaeróbias, as BRS são capazes de sobreviver na presença de quantidade limitada de oxigênio. Esta tolerância ao ar pode ser atribuída a presença de catalase e superóxido dismutase (BARTON, 1995). Se a concentração de oxigênio dissolvido em águas residuárias estiver entre 0,1 e 1,0 mg/L, as BRS serão inibidas, mas conseguem sobreviver, permanecendo em estado latente. Em concentrações acima de 1,0 mg/L, ocorre a inibição da redução do sulfato, em consequência do aumento do potencial de oxi-redução do meio (SILVA, 2000).

Algumas substâncias também provocam a inibição da redução do sulfato, por apresentarem estruturas análogas. Dentre elas destacam-se o selenato e os íons monofluorofosfato que são os inibidores mais poderosos e mais específicos. O molibdato é um inibidor, assim como o cromato, mas não da mesma forma que o selenato; este ânion inibe as células de *Desulfovibrio* formando um análogo instável do sulfato ativado, esgotando os ATPs da célula. O efeito do molibdato nas BRS é relativamente específico e, por isso, é um inibidor útil na redução do sulfato (POSTGATE, 1984). Segundo Barton (1995), o sulfeto de hidrogênio em elevadas concentrações (16 mM H<sub>2</sub>S) inibe o crescimento das BRS.

#### **2.3.4 – CICLO DO ENXOFRE E REDUÇÃO DESASSIMILATIVA DO SULFATO**

Nos microrganismos geralmente associados aos processos de corrosão, o enxofre ou seus compostos constituem parte importante do metabolismo e este, por sua vez, se relaciona com o ciclo do enxofre na natureza. A Figura 2.5 apresenta o ciclo do enxofre na natureza.



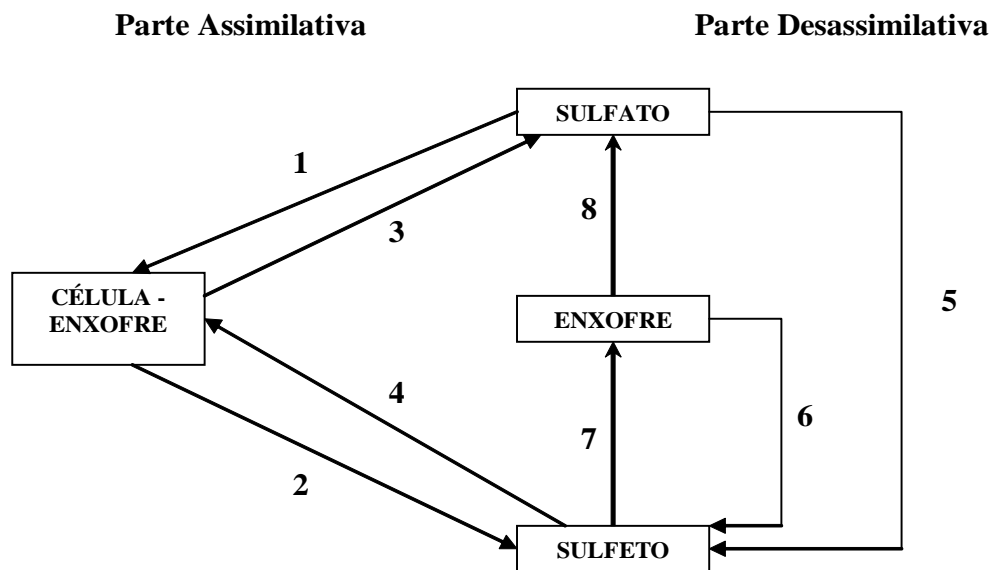
**Figura 2.5** - O ciclo do enxofre na natureza.

(Fonte: [www.ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br))

Dentro do grupo de bactérias relacionadas com o enxofre temos as bactérias oxidantes (aeróbicas) e as redutoras (anaeróbicas). Entre as bactérias oxidantes encontramos as pertencentes ao gênero *Thiobacillus*, responsáveis pela corrosão devido à formação de ácidos agressivos ao meio a partir da oxidação de enxofre ou compostos de enxofre tais como sulfeto, sulfito, tiosulfato e politionatos a sulfato com a simultânea produção de ácido sulfúrico.

As bactérias redutoras de sulfato são as únicas que têm a capacidade de utilizar o sulfato comoceptor final de elétrons. Esse processo de respiração, que ocorre em condições anaeróbicas, é conduzido pelas BRS com o propósito de gerar compostos de alta energia para reações de biossíntese envolvidas no seu crescimento e manutenção (BARTON, 1995).

Há milhões de anos, o enxofre presente na superfície da Terra está disponível na biosfera na forma oxidada, como sulfato e óxidos de enxofre no solo, rochas, rios e mares. Biologicamente, para incorporação das diferentes formas de enxofre em material celular, este deve ser reduzido. A redução do sulfato, assim como a fixação do nitrogênio e a produção de oxigênio biologicamente são considerados processos indispensáveis à vida no planeta. Sabe-se que os animais não têm a capacidade de conduzir a reação de conversão de sulfatos em sulfetos, sendo assim dependentes das plantas e dos microrganismos para seu suprimento de enxofre reduzido. A redução do sulfato inorgânico a sulfeto, orgânico ou inorgânico, e a subsequente oxidação deste sulfeto a sulfato, é conhecida como *Ciclo do Enxofre* (Figura 2.6). Este ciclo é constituído de uma parte assimilativa e outra desassimilativa (BARTON, 1995).



**Figura 2.6** – Ciclo biológico do enxofre.

Célula-enxofre indica o enxofre ligado a bactérias, fungos, animais e plantas. (1) Redução assimilativa do sulfato por bactérias, fungos e plantas; (2) Morte e decomposição por bactérias e fungos; (3) Excreção do sulfato por animais; (4) Assimilação do sulfeto por bactérias (e algumas plantas); (5) Redução desassimilativa do sulfato; (6) Redução desassimilativa do enxofre elementar; (7) Oxidação quimiotrófica e fototrófica do sulfeto; (8) Oxidação quimiotrófica e fototrófica do enxofre.

Fonte: Adaptado de BARTON, 1995.

As plantas, os fungos e algumas espécies de bactérias usam o sulfato como sua única fonte de enxofre, e para tanto, reduzem o átomo de enxofre do maior estado de oxidação para o mais reduzido. Este processo é dito *redução assimilativa do sulfato*, assim chamado, pois o enxofre é assimilado, isto é, ele é incorporado nos organismos em aminoácidos (cisteína e metionina) e vitaminas (tiamina, biotina, ácido pantotênico), que são constituintes de proteínas e coenzimas, respectivamente. As bactérias redutoras de sulfato realizam tanto a *redução assimilativa* como a *redução desassimilativa do sulfato*. Nesta última, o íon sulfato age como agente oxidante para a assimilação da matéria orgânica, como ocorre com o oxigênio na respiração aeróbia. De modo que, somente uma pequena quantidade do enxofre é

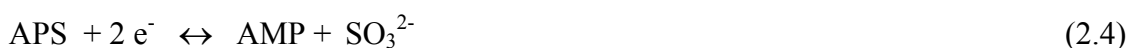


assimilada pelo organismo, sendo sua grande maioria liberada no ambiente como íon sulfeto, normalmente convertido a H<sub>2</sub>S livre em meio aquoso. Este processo também é denominado de *respiração do sulfato* (POSTGATE, 1984). Abaixo estão representadas as equações correspondentes à redução do sulfato mediante oxidação total (2.1) ou parcial (2.2) da matéria orgânica.



Uma grande variedade de compostos orgânicos pode ser assimilada pelas BRS, variando desde ácidos graxos simples a hidrocarbonetos aromáticos complexos.

A etapa inicial na redução do sulfato corresponde à ativação deste íon pelo ATP (trifosfato de adenosina) com formação de um composto orgânico de enxofre de alta energia, a adenosina 5'-fosfosulfato (APS). Durante esta reação, que é catalisada pela enzima ATP-sulfurilase, ocorre a substituição de dois resíduos de fosfato do ATP pelo sulfato. Em seguida, o pirofosfato (PP<sub>i</sub>) é rapidamente convertido em fosfato inorgânico pela enzima pirofosfatase, dependente de Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, sendo inativada em aerobiose. Parece que a pirofosfatase teria a função fisiológica de conservar ATP quando o microrganismo estivesse em condição desfavorável, através da inibição da conversão de APS. A constante de equilíbrio da ATP-sulfurilase não é favorável à formação de APS, sendo a reação conduzida neste sentido somente pela hidrólise do PP<sub>i</sub>.



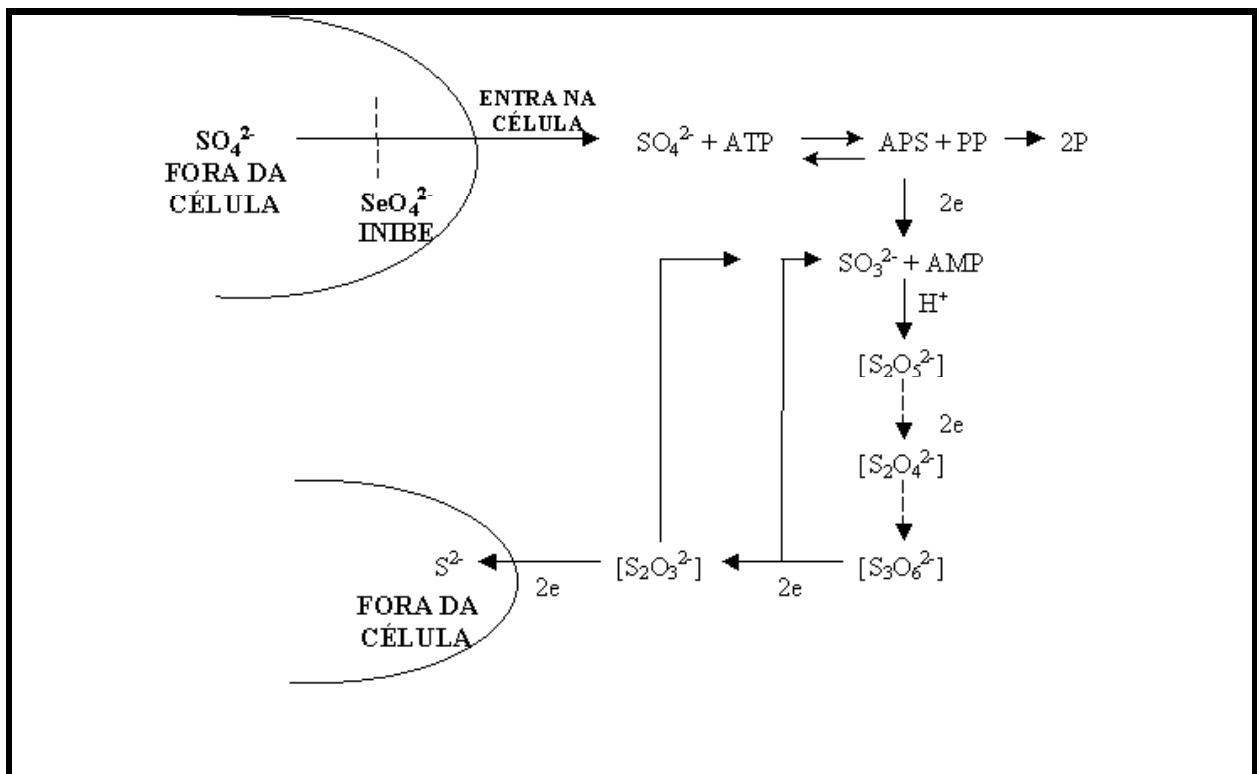
A segunda etapa é a redução da adenosina fosfosulfato a AMP (monofosfato de adenosina) e sulfito pela ação da enzima APS-redutase.

Em seguida, o sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) é reduzido a sulfeto (S<sup>2-</sup>) através de uma série de etapas que são muito pouco conhecidas bioquimicamente. Historicamente, pensava-se que esse processo de redução era causado por um “sistema de sulfito redutase”; no entanto, evidências sugerem que o sulfito é reduzido a sulfeto por um ou dois mecanismos possíveis. Uma hipótese é que a redução direta de sulfito a sulfeto ocorra sem a formação de nenhum

composto intermediário. Outra hipótese propõe a formação de dois intermediários, tritionato e tiosulfato, sendo que a etapa final é a redução de tiosulfato a sulfeto e a sulfeto (BARTON, 1995).

A possível rota da redução desassimilativa do sulfato, de acordo com Postgate (1984), segue os passos apresentados na Figura 2.7. O sulfato é convertido a metabissulfato ( $S_2O_5^{2-}$ ), que é reduzido a tritionato ( $S_3O_6^{2-}$ ), passando por alguns intermediários como, por exemplo, o ditionato,  $S_2O_4^{2-}$ . Parte do tritionato é então convertido a tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) e parte é usada para regenerar o sulfato. Em seguida, o tiosulfato é reduzido a sulfeto, sendo uma parte novamente convertida a sulfato. Entre os transportadores de elétrons envolvidos no metabolismo das BRS tem-se: citocromos (b,  $c_3$ ), ferredoxinas, flavodoxinas,  $NAD^+$  e  $NADP^+$  (MADIGAN *et al.*, 1997 *apud* VIEIRA, 2003).

As bactérias que conduzem a redução desassimilativa do sulfato fazem parte de um grupo de quatorze gêneros de eubactérias. São eles: *Desulfovibrio*, *Desulfoarculus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfobotulus*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfohalobium*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *sulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium*, e um gênero de arqueobactéria, *Archaeoglobus* (BARTON,1995).



**Figura 2.7** - Possível rota para a redução desassimilativa do sulfato.

Fonte: POSTGATE, 1984.

## 2.4 - SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S)

O sulfeto de hidrogênio, ácido sulfídrico, ou também conhecido por gás sulfídrico, é um gás com odor pungente, solúvel em água e etanol, podendo ser preparado pela ação de ácidos minerais em sulfetos metálicos, geralmente ácido clorídrico com sulfeto de ferro II. Em solução ácida o ácido sulfídrico é um agente redutor moderado.

Este ácido tem um papel importante em análises qualitativas tradicionais, por precipitar com metais formando sulfetos insolúveis. O seu cheiro de “ovo podre” é normalmente suficientemente característico, porém um teste de detecção adotado advém da sua precipitação em soluções alcalinas de sais de chumbo, através da formação de um precipitado preto. O ácido sulfídrico é muito venenoso, inclusive mais tóxico que o ácido cianídrico, e em altas concentrações se torna inodoro, sendo rapidamente letal. O sulfeto de hidrogênio, produto da decomposição ou de reação com ácidos, é altamente tóxico (50-100 ppm em ar) e pode se acumular em espaços limitados.

O ácido sulfídrico pode ser oxidado a enxofre elementar por exposição ao ar ou, como é mais freqüente, por ação microbiana formando diferentes formas de enxofre, em condição de aerobiose ou anaerobiose. O H<sub>2</sub>S pode ser gerado durante a decomposição anaeróbia de produtos orgânicos por bactérias como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas pyocyanea* e bactérias redutoras de sulfato.

Este gás, através de uma série de reações, produz ácido, todavia indesejáveis, e que além de agressivos ao concreto utilizado nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), podem também causar odores desagradáveis e desconforto para as áreas residenciais próximas (<http://www.recuperar.com.br/revistas.htm>, 2005). O H<sub>2</sub>S também pode ser encontrado em processos de produção e refino de petróleo, sistemas de esgoto, indústrias de papel, águas subterrâneas e numa variedade de processos industriais. Locais onde haja estagnação de água com quantidades variadas de matéria orgânica/nutrientes e em ambientes contaminados com bactérias, estão sujeitos a processos de geração de H<sub>2</sub>S.

O H<sub>2</sub>S encontrado em alguns campos de petróleo pode ser originado de várias fontes e, na maioria das vezes, é resultante de processos de biodegradação como, por exemplo, a decomposição de matéria orgânica vegetal e animal constituinte do petróleo. Este gás já foi responsável por diversos acidentes, sendo alguns deles fatais, pois é extremamente tóxico,

corrosivo e inflamável, exigindo vigilância permanente e um plano de controle de emergência específico ([www.clickmacae.com.br](http://www.clickmacae.com.br)).

Na indústria do petróleo, o H<sub>2</sub>S poderá estar presente nos reservatórios de petróleo e nos campos *offshore*, onde há injeção de água do mar, pela sua abundância e disponibilidade. A água do mar, além de ser fonte de diversos grupos de bactérias, entre elas as BRS, é uma fonte potencial de íons sulfato e de nutrientes para os microrganismos presentes na água de formação. Adicionalmente, o gás sulfídrico pode ser proveniente de mecanismos de dissolução de sulfetos minerais, da decomposição de compostos orgânicos sulfurados, etc. Outra fonte de H<sub>2</sub>S tem sido atribuída à atividade de bactérias redutoras de sulfato, no interior do reservatório.

A contaminação por BRS das instalações de superfícies de planta de processo e tanques e também dos oleodutos, aliada as condições favoráveis ao seu desenvolvimento pode resultar em produção de H<sub>2</sub>S. Condições do tipo: estagnação, anaerobiose (ausência de oxigênio), presença de nutrientes (fontes de enxofre, como o sulfato presente na água produzida e na água do mar) e temperatura adequada ao grupo de bactérias presentes no meio favorecem o processo microbiológico. Este processo tende a ser mais intenso onde houver acúmulo de material orgânico, como sedimentável e borras.

#### 2.4.1 – IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

( [www.whitemartins.com.br](http://www.whitemartins.com.br) )

- **Nome químico:** sulfeto de hidrogênio
- **Sinônimo:** Hidrogênio sulfuretado, gás malcheiroso, hidreto de enxofre, gás sulfídrico, gás hepático, ácido hidrosulfúrico
- **Fórmula molecular:** H<sub>2</sub>S  
**Classificação Toxicológica:** Gás irritante secundário
- **Estabilidade:** Estável
- **Incompatibilidade (materiais a evitar):** Amônia, bases, pentafluoreto de bromo, trifluoreto de cloro, trióxido de cromo e calor, cobre (cobre pulverizado e ar), flúor, chumbo, óxido de chumbo, mercúrio, ácido nítrico, trifluoreto de nitrogênio, sulfeto de nitrogênio, compostos orgânicos, agentes oxidantes, difluoreto de oxigênio, borracha, sódio, umidade e água.

- **Produtos Passíveis de Risco Após a Decomposição:** Decomposição térmica ou por queima pode produzir dióxido de enxofre, enxofre e hidrogênio.
- **Risco de Polimerização:** Não ocorrerá.

#### 2.4.2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

([www.whitemartins.com.br](http://www.whitemartins.com.br))

- **Estado Físico:** Gás
- **Cor:** Incolor
- **Odor:** Ovo podre
- **Peso molecular:** 34,08
- **Densidade do Gás (ar = 1):** a 15 °C e 1 atm: 1,189
- **Densidade do Gás (água = 1):** a 15,6 °C : 0,79
  
- **Porcentagem de Matéria Volátil em Volume:** 100
- **Solubilidade em Água, (V/V):** a 20 °C e 1 atm: 38 kg/m<sup>3</sup>
- **Pressão do Vapor:** a 15,6 °C: 229 psia
- **Ponto de Ebulição, a 1 atm:** -60,2 °C
- **Ponto de Congelamento, a 1 atm:** -82,9 °C
- **Ponto de Fulgor (Método ou Norma):** Gás inflamável
- **Temperatura de Auto-Ignicão:** 260 °C a 1 atm
- **Limite de Inflamabilidade no Ar, % em Volume:**  
**Inferior:** 4,3%  
**Superior:** 46%

#### 2.4.3 – INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

PERIGO: gás liqüefeito tóxico e inflamável, sob pressão. Pode ser fatal se inalado. Pode formar misturas explosivas com o ar. Pode causar danos no aparelho respiratório e sistema nervoso central. Pode causar irritação nos olhos. O gás nem sempre pode ser detectado pelo odor. Sintomas podem se retardar. Equipamento autônomo de respiração deve

ser utilizado pela equipe de salvamento. Odor de ovo podre. ( [www.whitemartins.com.br](http://www.whitemartins.com.br) : acessado em outubro de 2005)

Apesar do termo “gás”, o H<sub>2</sub>S, que é solúvel em água, poderá estar na forma dissolvida, e em determinadas condições é liberado para a atmosfera, sob a forma de gás. Este, se inalado, poderá causar danos à saúde dos seres vivos. Portanto, se o H<sub>2</sub>S está em contato com água, esta também o conterá, liberando-o para a atmosfera.

Por ter densidade maior que a do ar, são esperadas concentrações mais elevadas nos pontos mais baixos.

Exposição prolongada ao H<sub>2</sub>S poderá acarretar perda da sensibilidade ao odor, de intensidade variável de acordo com a concentração do mesmo. Então, uma pessoa exposta ao H<sub>2</sub>S pode pensar que a concentração do gás está diminuindo, quando na realidade poderá estar aumentando. A susceptibilidade ao envenenamento pelo H<sub>2</sub>S varia de acordo com a concentração e o tempo da exposição a este gás ( [www.clickmacae.com.br](http://www.clickmacae.com.br) acessado em outubro de 2005).

**Valor Limite de Tolerância (LTV):** 8 ppm (NR-15). O Limite de Tolerância deve ser utilizado como um guia no controle da saúde, e não como uma divisão entre concentrações perigosas ou seguras.

#### **2.4.3.1 EFEITOS A UMA ÚNICA SUPEREXPOSIÇÃO (AGUDA) OU A UMA EXPOSIÇÃO REPETIDA (CRÔNICA):**

**Ingestão:** É uma maneira muito pouco provável de exposição. Este produto é um gás a pressão e temperatura normais, mas o congelamento dos lábios e da boca podem ocorrer devido ao contato com o líquido.

**Inalação:** Pode ser fatal se inalado. Provoca parada respiratória por depressão das atividades do sistema nervoso central. Efeitos da superexposição incluem dor de cabeça, vertigem, tonteira, confusão mental, dor no peito, alterações olfatórias, inconsciência e morte. Rinites, faringites, pneumonites, edema pulmonar e cianose podem ocorrer. A falta de oxigênio pode causar a morte.

**Contato com a pele:** Causa irritação visível com vermelhidão local e inchaço. O líquido pode ser corrosivo e causar congelamento. A lesão criogênica é semelhante à queimadura.

**Contato com os olhos:** Causa irritação e uma excessiva vermelhidão da conjuntiva. Prolongada exposição ao vapor a baixa concentração pode causar conjuntivite dolorosa e danos na córnea com vesiculação do epitélio da córnea.

**Efeitos da superexposição repetida (crônica):** A exposição repetida pode causar náusea, vômitos, perda de peso, baixa pressão sanguínea persistente e perda do senso de olfato.

**Outros efeitos da superexposição:** Algumas vezes os sobreviventes exibem seqüelas neurológicas como: amnésia, tremedeira, neurastenia, distúrbio do equilíbrio ou um comprometimento mais sério do cérebro e danos na cortical.

**Condições clínicas agravadas pela superexposição:** Respirar o vapor e/ou névoa úmida pode agravar asma ou doença fibrótica pulmonar.

**Informações laboratoriais com possível relevância para a avaliação dos riscos para a saúde humana:** Embora o sulfeto de hidrogênio não demonstre, repetida e prolongada hipoxia maternal induzida por superexposição a outros asfixiantes químicos, tem produzido toxidez embrio-fetal em animais de laboratório.

**Carcinogenicidade:** Sulfeto de hidrogênio não é considerado material carcinogênico pelos órgãos NTP, OSHA, ou IARC.

#### **2.4.4 - PROBLEMAS RELACIONADOS À PRESENÇA DE SULFETO**

O principal problema frente à presença de sulfeto de hidrogênio produzido pelas BRS nas áreas de produção devido as suas características é a corrosão nos tanques de armazenamento e dutos. O risco de toxicidade inerente ao sulfeto de hidrogênio refere-se aos limites de exposição TWA : média ponderada de tempo (Time Weighted Average) para este composto que é de 10 ppm. Quando os níveis de sulfeto de hidrogênio atingem valores superiores a estes, constituem um sério risco de toxicidade para os operários, gerando um ambiente de trabalho pouco seguro e desagradável (mau cheiroso) ([www.aga.com.br](http://www.aga.com.br)).

Os problemas de corrosão são uma preocupação constante, manifestando-se através de um severo ataque por *pitting*, observado diretamente nas tubulações e indiretamente no aumento dos custos de manutenção e nas paradas não programadas decorrentes desta condição. Problemas decorrentes da biocorrosão:

- Substituição prematura de equipamentos com reflexos no custo industrial.

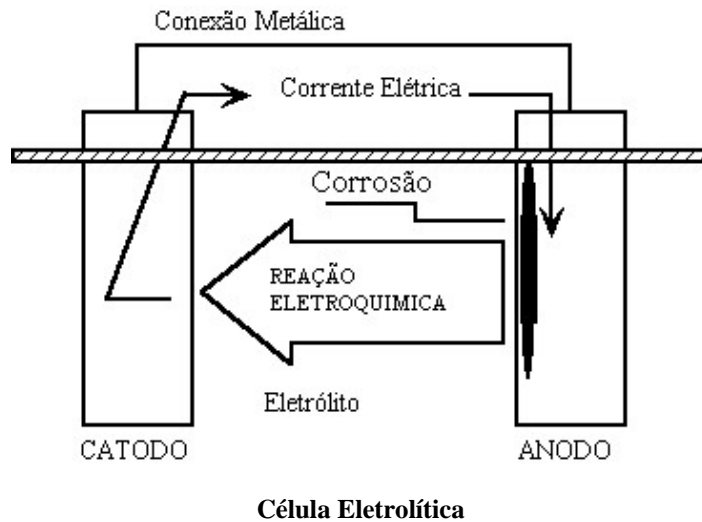
- Necessidade de projetos superdimensionados para suportar os efeitos da corrosão: por exemplo, aumento nas espessuras, diâmetros, etc.
- Paralisação inesperada do equipamento causando transtornos no planejamento de produção.
- Perda de um produto (por exemplo, se uma tubulação de um sistema hidráulico desenvolve um vazamento devido a uma corrosão induzida, contaminando o produto).
- Perda de eficiência (por exemplo, produtos gerados pela corrosão diminuem a velocidade de transferência de calor em um sistema de resfriamento) (<http://www.engefac.com.br/corrosao.htm>, acessado em outubro de 2005).

#### **2.4.4.1 – BIOCORROSÃO**

A corrosão é um fenômeno químico ou eletroquímico de superfície que resulta na deterioração dos materiais, normalmente metálicos, tanto expostos a ambientes aquosos ou ligeiramente úmidos (corrosão eletroquímica) quanto secos (corrosão química). Na natureza, a corrosão química é menos freqüente do que a eletroquímica, estando envolvida em operações onde as temperaturas são elevadas.

Na corrosão eletroquímica, a dissolução do metal efetua-se em regiões anódicas, com liberação de elétrons que participam da reação no catodo, como mostra a figura 2.8. Geralmente, estas reações envolvem a redução de oxigênio, em meios aerados com pH neutro ou alcalino. Em condições ácidas, os prótons formados no anodo podem dar origem a hidrogênio atômico e, posteriormente, a hidrogênio molecular, que pode ficar adsorvido à superfície do material metálico, polarizando-o e, assim, reduzindo a velocidade do processo corrosivo. Em ambientes anaeróbios, a corrosão envolve dissociação da água e redução dos prótons no catodo (GENTIL, 1996).





**Figura 2.8** - Processo eletroquímico da corrosão

Os microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza e apresentam tendência a aderir às superfícies que ofereçam condições favoráveis ao seu desenvolvimento, colonizando-as. O desenvolvimento das populações microbianas resulta na formação de estruturas microbianas denominadas de biofilmes ou *biofouling*. Os biofilmes são estruturas complexas constituídas de agregados celulares embebidos em uma matriz polimérica extracelular, resultante do metabolismo microbiano, contendo ainda matéria orgânica e inorgânica e, principalmente, água (CHARACKLIS & MARSHALL, 1990; LEWANDOWSKY *et al.*, 1995). A presença física do biofilme na superfície do metal e/ou sua atividade metabólica conduz a importantes modificações da interface metal/solução, formando uma barreira ao contato entre o metal e o líquido circundante. É por isso que deve-se considerar que a corrosão microbiológica ocorre sobre uma superfície modificada, com características físico-químicas e biológicas muito particulares e que poderia ser denominada de biologicamente condicionada. Ignorar este fato e pretender interpretar um processo de corrosão microbiológica com os mesmos parâmetros e considerações que um caso de corrosão inorgânica pode conduzir a um fracasso total e inclusive a um agravamento dos problemas que afetam o sistema em questão (VIDELA, 2003).

A denominação corrosão microbiologicamente induzida (CMI) empregada para expressar a participação dos microrganismos nos fenômenos da corrosão, pode induzir tratar-se de um diferente tipo de ação. No entanto, a CMI na maioria dos casos promove a aceleração da cinética das reações, sem alterar a natureza eletroquímica do processo corrosivo (NAGIUB & MANSFELD, 2002; ORNEK *et al.*, 2002). Logo, na CMI também se tem um

processo de oxidação que leva a dissolução do metal (corrosão) na região anódica e, simultaneamente, um processo catódico complementar, resultando na redução de algum componente do meio através da reação catódica (VIDELA, 2003).

Os microrganismos participam do processo de corrosão de forma ativa, produzindo substâncias corrosivas, originadas durante seu crescimento ou metabolismo, as quais podem ser de natureza química diversa, como ácidos, álcalis, sulfeto entre outros, transformando um meio originalmente inerte em agressivo. Pode também haver a criação de pilhas de aeração diferencial como resultado do consumo desigual de oxigênio, devido à distribuição não homogênea do biofilme ao longo da superfície metálica bem como pela formação de tubérculos (VIDELA, 2003). As células de concentração de oxigênio podem se formar sobre superfícies metálicas mesmo pela presença de microrganismos mortos, por exemplo, biofilmes tratados com biocidas. Neste caso, os biofilmes não contribuirão na criação de pilhas de aeração diferencial, mas promoverão uma barreira difusional ao oxigênio.

Em comparação com os ambientes secos, os ambientes aquosos são os mais agressivos e que promovem maior corrosão das estruturas metálicas, uma vez que o crescimento dos organismos vivos é extremamente dependente de água. Como consequência, os ambientes marinhos constituem-se em um problema ainda mais sério, uma vez que a água do mar além de microrganismos contém alta salinidade, e várias outras impurezas como sais, gases dissolvidos e matéria orgânica (CRAVO, 2001).

Boa parte da corrosão marinha pode ser iniciada pela adesão e crescimento de bactérias e outros organismos marinhos. As superfícies do metal em contato com sistemas aquáticos representam os sítios da atividade microbiana. Em muitos casos, após uma semana de contato com a água do mar, as superfícies do metal começam a apresentar aderência de bactérias, protozoários e algas iniciando assim o processo de formação do biofilme (WALCH, 1991).

A corrosão induzida por microrganismos (CIM) tem recebido importante atenção devido às perdas econômicas a ela atribuídas. Nos Estados Unidos uma larga porção das perdas por corrosão (\$300 bilhões por ano) são atribuídas a ação bacteriana. Entre os fatores associados à ação bacteriana em superfícies metálicas estão incluídos:

- Presença de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) contido na água;
- Produção de  $H_2S$  pelas bactérias redutoras de sulfato a partir de sulfato;
- Presença de bactérias oxidantes de enxofre (*Thiobacillus ferrooxidans*);

- Formação de sulfeto ferroso detectado como uma fase intermediária nos processos de biocorrosão;
- Teor de oxigênio que é responsável por altas taxas de corrosão.

## 2.5. TÉCNICAS PARA MINIMIZAR A PRODUÇÃO DE SULFETO

O gás sulfídrico é gerado pela atividade de bactérias redutoras de sulfato (BRS) tanto em ambientes anaeróbicos como aeróbicos (em condição anóxica). Por isso, são vários os estudos desenvolvidos com o intuito de definir uma metodologia adequada, ainda não existindo um método prático para impedir a redução microbiológica de sulfato. De acordo com Speece (1996), algumas estratégias para o controle da toxicidade pelo sulfeto são: elevação do pH para deslocamento significativo do  $H_2S$  para  $HS^-$ ; limpeza e reciclo do gás para o controle de sulfeto por meio de absorção em esponja de ferro ou pedaços de madeira embebidos com  $FeCl_3$  ou líquido alcalino; precipitação de sulfeto com sais de ferro ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ); inibição da atividade de BRS com molibdênio; precipitação de sulfeto com  $MgO$ ; controle do sulfeto com operação em duas fases (pré-tratamento para reduzir biologicamente o sulfato, antes da etapa metanogênica). A inibição das BRS por molibdato, elementos de transição e antibióticos é uma possibilidade, mas que na maioria dos casos não é aplicável em maiores escalas devido ao custo (LENS et al., 1999). Até o presente momento a aplicação de biocidas tem sido a forma de controle mais adotada, embora nem sempre satisfatória, quer pelo custo quer pela eficiência alcançada (Energy Institute, 2003; [www.bio.ucalgary.ca](http://www.bio.ucalgary.ca), 2004). Na verdade, a seleção da estratégia a ser adotada depende basicamente da eficiência pretendida.

Uma alternativa que vem sendo cada vez mais explorada no controle da atividade de BRS, e conseqüentemente na remoção de  $H_2S$  e redução da corrosão microbiológica, tem sido a aplicação de nitrato. O seu uso em substituição aos biocidas, normalmente empregados, representa não só ganhos econômicos, mas a redução das agressões ao ambiente. A aplicação de nitrato favorece a atividade das bactérias redutoras de nitrato (BRN), o que em conseqüência inibe o metabolismo das BRS e, por conseguinte, impede a geração de  $H_2S$  (MAXWELL et al., 2003).

Segundo Maxwell et al. (2003), a presença de nitrato estimula a atividade das BRN, por ser seu metabolismo energeticamente mais favorável do que o consumo de sulfato pelas BRS. Por sua vez, a atividade mais intensa das BRN resulta na redução das fontes

nutricionais, impedindo o desenvolvimento das BRS. Pode ainda ocorrer a atividade concomitante de espécies de BRN que apresentam a capacidade simultânea de oxidação de sulfeto (BRN-OS), ocasionando a remoção de sulfeto e a elevação do potencial redox do sistema, o que resulta no estabelecimento de condição imprópria para o crescimento das BRS (JENNEMAN & GERVETZ, 1999). Mesmo havendo a presença de sulfato e nitrato, o nitrato será preferencialmente consumido propiciando o predomínio das BRN. Algumas espécies de BRS são capazes de utilizar nitrato em substituição ao sulfato, portanto a presença de nitrato não necessariamente levará à eliminação deste grupo microbiano, mas de qualquer forma o objetivo será atingido, ou seja, haverá redução de sulfeto (POSTGATE, 1984; MOURA *et al.*, 1997; MAXWELL *et al.*, 2003; [www.bio.ulcagary.ca](http://www.bio.ulcagary.ca), 2004).

Não há dúvidas quanto à efetiva ação do nitrato na inibição seletiva das BRS e, principalmente, no controle do sulfeto biogênico. Adicionalmente seu uso é mais vantajoso do que o tratamento com biocidas, convencionalmente adotado. Entretanto o tratamento com nitrato e/ou nitrito está condicionado ao custo, disponibilidade e, em especial, ao modo de aplicação, uma vez que dependendo do sistema a ser tratado poderá ser necessária a adição de outros sais e/ou biomassa exógena a fim de garantir a eficácia do processo biológico.

Comercialmente, o nitrato é aplicado na forma de sal de cálcio, sódio, potássio e amônio (MCLNERNEY *et al.*, 1993; HAEGH, 2000; MAXWELL *et al.*, 2003;). Estudos de laboratório não mostraram diferenças apreciáveis na produção de sulfeto em função do sal utilizado (MAXWELL *et al.*, 2003). Todavia, foi determinado um maior acúmulo de nitrito quando  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  foram empregados. De qualquer forma, a escolha do sal a ser aplicado deverá também levar em consideração custo, disponibilidade no comércio e problemas técnicos, como a tendência de formar incrustações. No campo, a dosagem de nitrato, quando aplicado como sal de sódio, varia de 87 a 500 mg/L. Normalmente, este tipo de tratamento requer adição contínua do ânion.

## **2.6 BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO ( BRN)**

As Bactérias Redutoras de Nitrato incluem espécies anaeróbias e aeróbias, sendo comumente encontradas em poços de petróleo, águas do mar e de produção, mas se apresentam em baixas quantidades quando comparadas às outras espécies, o que dificulta desta maneira sua proliferação (GARBOSSA, 2003).

A atividade das BRN é estimulada pela presença de nitrato, pois seu metabolismo é energeticamente mais favorável que o consumo de sulfato pelas BRS (MAXWELL *et al.*, 2003).

Por sua vez, a atividade mais intensa das BRN resulta no consumo das fontes nutricionais, impedindo o desenvolvimento das BRS. Pode ainda ocorrer a atividade concomitante de espécies de BRN que apresentam a capacidade simultânea de oxidação de sulfeto (BRN-OS), ocasionando a remoção de sulfeto e a elevação do potencial redox do sistema, o que resulta no estabelecimento de condição imprópria para o crescimento das BRS (JENNEMAN & GERVETZ, 1999). De modo que, mesmo havendo a presença concomitante de sulfato e nitrato, o nitrato será preferencialmente consumido propiciando o predomínio das BRN.

Nitrato é a forma mais completamente oxidada do nitrogênio. Ele é formado durante os estágios finais da decomposição biológica, tanto em estações de tratamento de água como em mananciais de água natural. Sua presença não é estranha, principalmente em águas armazenadas em cisternas em comunidades rurais. Nitratos inorgânicos, assim como o nitrato de amônia, são largamente utilizados como fertilizantes. Baixas concentrações de nitrato podem estar presentes em águas naturais. No entanto, um máximo de 10 ppm de nitrato (nitrogênio) é permissível em água potável e nos aquários a quantidade de nitratos na maioria das vezes aumenta mais ou menos rapidamente dependendo da nitrificação (GARBOSSA, 2003).

O nitrato, através da desnitrificação, pode ser reduzido a  $N_2$ . Muitas variedades de bactérias heterotróficas são hábeis em desnitrificar efluentes em condições anóxicas (*Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Bacillus*). Este processo ocorre na presença de uma fonte de carbono que funciona como doador de elétrons, enquanto o  $NO_3^-$  age como aceptor de elétrons na cadeia respiratória. Este conjunto de bactérias capazes de utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons recebe o nome de Bactérias Redutoras de Nitrato.

É na etapa de desnitrificação biológica que ocorre a efetiva remoção biológica do nitrogênio, em ambiente anóxico, caracterizado pela utilização do nitrogênio inorgânico, nas formas de nitrito e nitrato, e sua conversão para as formas mais reduzidas,  $N_2O$ ,  $NO$ ,  $N_2$ . Entretanto, a redução desassimilatória do nitrato a nitrogênio amoniacal na forma de íon amônio ( $NH_4^+$ ) pode ocorrer no mesmo habitat, em que ocorre a desnitrificação, e até mesmo

gerar competição pelo  $\text{NO}_3^-$ . Nesses processos desassimilatórios, o nitrogênio reduzido não é utilizado pelas células (TIEDJE, 1994).

A desnitrificação ocorre em duas etapas, na primeira o nitrato é reduzido a nitrito, e na segunda ocorre a redução do nitrito a nitrogênio gasoso (SURAMPALLI *et al.*, 1997).



A redução desassimilatória do nitrato a nitrogênio amoniacal, conhecida como RDNA (redução desassimilatória do nitrato a amônia), passa pelas seguintes etapas, conforme ilustrado nas reações a seguir.



A presença de um doador de elétrons é essencial para a redução do nitrato na desnitrificação. O doador de elétrons é o material orgânico biodegradável, pois as bactérias desnitrificantes, são em sua maioria heterotróficas.

Segundo Her e Huang (1995), os fatores que influenciam na eficiência da desnitrificação são o tipo de fonte de carbono (estrutura química), peso molecular e a relação C/N. Altas concentrações de substâncias tóxicas podem causar a inibição do processo. No entanto, como as bactérias nitrificantes são mais sensíveis às substâncias tóxicas que as desnitrificantes, se ocorrer a nitrificação, não ocorrerá problema com a desnitrificação (GARBOSSA, 2003).

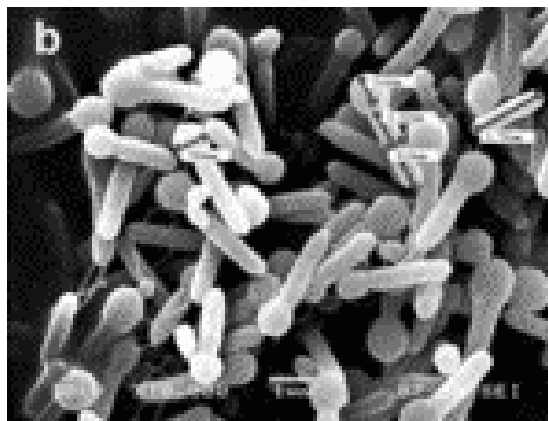
Diversos autores afirmam que a cinética de desnitrificação segue o modelo de Monod. Entretanto, como na maioria dos casos a concentração de nitrato é muito maior que a sua constante de saturação, a velocidade de desnitrificação independe da concentração de substrato. Por este motivo, terá dependência de ordem zero (ROS, 1995, HENZE *et al.*, 1997).

autores relatam que a melhor relação C/N encontra-se próxima a 1 e explicam que o uso de uma relação C/N abaixo do ideal leva ao acúmulo de nitrito, devido a falta de doador de elétrons implicar em impedimento da completa desnitrificação (HER & HUANG, 1995; SANTOS *et al.*, 2002).

### 2.6.1 CARACTERIZAÇÃO

As bactérias redutoras de nitrato estão completamente distribuídas em ambientes terrestres e aquáticos, sendo facilmente encontradas em ambientes marinhos e poços de petróleo. São bactérias facultativas anaeróbias autotróficas e heterotróficas, responsáveis pela desnitrificação utilizando matéria orgânica como fontes de carbono e energia. A desnitrificação ocorre principalmente com gêneros de organismos heterotróficos como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobaillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Spirillum*. Em ambiente anóxico, esses organismos promovem a desnitrificação produzindo  $N_2$  (METCALF & EDDY, 1991). As nitrificantes autotróficas mais conhecidas são as *Nitrobacter sp* e *Nitrossomonas sp*, que oxidam amônia a nitrito e nitrito a nitrato.

Atualmente, foram descobertos mais dois grupos de bactérias redutoras de nitrato, a *Petrobacter succinatimandens* com metabolismo aeróbio, extraída de um poço de petróleo situado no leste da Austrália e a *Garciella nitratreductens* (figura 2.9) com metabolismo anaeróbio, encontrada no Golfo do México. Como as demais bactérias redutoras de nitrato, receberam pouca atenção das pesquisas científicas a respeito de seu papel na biologia, não obstante algumas destas bactérias foram usadas também para oxidar sulfatos ([www.engineerlive.com](http://www.engineerlive.com):[acessado](#) em outubro de 2005).



**Figura 2.9** - *Garciella nitratreductens*, isolada de poços de petróleo no Golfo do México.

### 2.6.2 CRESCIMENTO

As bactérias redutoras de nitrato são microrganismos anaeróbios facultativos que usam nitrato comoceptor final de elétrons. São inibidas por substâncias tóxicas e crescem na presença de oxigênio dissolvido, mas nesta condição utilizam o oxigênio comoceptor final de elétrons e não reduzem o nitrito nem o nitrato (GARBOSSA, 2003).

Esses microrganismos são sensíveis às condições ambientais, assim como a outros fatores inibidores de crescimento. Para que o sistema biológico opere satisfatoriamente é necessário atender alguns requisitos relativos ao pH, ausência de Oxigênio dissolvido, temperatura, relação C/N adequada e baixas concentrações de substâncias tóxicas (GARBOSSA, 2003).

VAN ANDELL & MARAIS (1999) comentaram que a desnitrificação aumenta com a temperatura até um valor ótimo próximo a 40 °C. Contudo, SURAMPALLI *et al.* (1997), relataram que a faixa ótima se encontra no intervalo de 10 a 30°C.

Diversos autores citam uma faixa ótima de pH para a desnitrificação, HENZE *et al.* (1997) relatam que esse valor fica entre 7 e 9; para SURAMPALLI *et al.* (1997) o pH ideal se encontra entre 6,5 e 8; VAN HAANDELL & MARAIS (1999) indicaram que a faixa ótima, observada por diversos autores, está no intervalo de 7,0 a 7,5, e para pH menor que 6 e maior que 8,5, há grande redução de atividade de desnitrificação.

### 2.6.3 CULTIVO

O meio conhecido para o crescimento das BRN é um meio mineral com a seguinte composição (em g/L): 0,5 NH<sub>4</sub>Cl, 0,3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,5 KCl, 0,15 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,85 NaNO<sub>3</sub>, 1 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,1 extrato de lêvedo, 1mg/L resazurina e 10 mL/L de solução traço de metais (DAVIDOVA *et al.*, 2001)

### 2.6.4 CICLO DO NITROGÊNIO E DESNITRIFICAÇÃO DO NITRATO

Os animais obtêm nitrogênio para a elaboração das proteínas essenciais à vida a partir dos vegetais ou de outras proteínas animais presentes nos alimentos, enquanto as



plantas sintetizam suas proteínas a partir de compostos nitrogenados inorgânicos que retiram do solo e, até certo ponto, do nitrogênio livre na atmosfera.

O nitrogênio é um ametal do grupo V da tabela periódica, de símbolo químico N. É o elemento mais abundante na atmosfera terrestre e está presente em todos os seres vivos. Apresenta dois isótopos estáveis e forma o gás nitrogênio ( $N_2$ ), insípido, inodoro e incolor. Por sua alta energia de ligação, o nitrogênio molecular não reage facilmente com outras substâncias e, sob condições normais, é relativamente inerte à maioria dos reagentes ([www.tabelaperiodica.hpg.ig.com.br/n.htm](http://www.tabelaperiodica.hpg.ig.com.br/n.htm), acessado em 12/2005).

Atribui-se a Daniel Rutherford a descoberta do nitrogênio em 1772, porque o cientista foi o primeiro a publicar suas descobertas mas, na Grã-Bretanha, os químicos Joseph Priestley e Henry Cavendish e, na Suécia, Carl Wilhelm Scheele, também descobriram o elemento na mesma época. Lavoisier, o primeiro a reconhecer que se tratava de um elemento químico independente e a identificá-lo em certos compostos minerais, deu-lhe o nome de azoto (do grego *a*, “sem”, e *zoe*, “vida”) em razão de sua incapacidade para manter a vida e alimentar a combustão. O nome nitrogênio foi criado em 1790, por Jean-Antoine Chaptal, após a descoberta de sua relação com o ácido nítrico ([www.tabelaperiodica.hpg.ig.com.br/n.htm](http://www.tabelaperiodica.hpg.ig.com.br/n.htm)).

Entre os elementos, o nitrogênio é o sexto em abundância no universo. Constitui cerca de 78% do volume atmosférico. Encontra-se nitrogênio livre em muitos meteoritos, nos gases de vulcões, minas e em algumas fontes minerais, no Sol, em estrelas e nebulosas. Em combinação com outros elementos, ocorre nas proteínas; no salitre do Chile (nitrato de sódio,  $NaNO_3$ ), muito usado como fertilizante; na atmosfera, na chuva, no solo e no guano (adubo natural formado a partir da decomposição dos excrementos e cadáveres de aves marinhas), sob a forma de amônia e sais de amônio; e na água do mar, como íons de amônio ( $NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ).

Cerca de 10% do nitrogênio atmosférico que é trazido para o solo, sob a forma de  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ , foi convertido a tais formas iônicas através de três processos diferentes (Figura 2.8).

- Os resíduos da combustão industrial, a atividade vulcânica e a queima de florestas liberam compostos gasosos na atmosfera. Dentre eles está a amônia, que em contato com a água da chuva é convertida em íon  $NH_4^+$  e acaba por atingir o solo.

- Pode ocorrer a oxidação do  $N_2$ , tanto pelo  $O_2$  como pelo  $O_3$ , na presença de energia de raios ou radiação ultravioleta. Assim, alguns óxidos de nitrogênio são formados e originam o  $NO_3^-$  quando em contato com a chuva, sendo transportados para o solo.
- Os oceanos lançam aerossóis no ar. Quando a água desses aerossóis evapora, os sais permanecem em suspensão e são levados ao sabor dos ventos. Com as chuvas, alguns desses sais podem ser depositados na terra como ocorre com o  $NO_3^-$ . Esses processos recebem o nome de "sais cíclicos" porque, normalmente, os sais são depositados em terras da faixa costeira, retornando à sua origem, o mar ([www.ciagri.usp.br](http://www.ciagri.usp.br), 12/2005).

Além disso, o  $N_2$  pode ser fixado pela indústria (processo de Haber-Bosch) ou por organismos procariontes (fixação biológica). O processo industrial contribui com cerca de 15% do nitrogênio atmosférico colocado no solo, enquanto que o processo biológico se encarrega de obter os 75% restantes. Portanto, a fixação biológica é de suma importância para a nutrição nitrogenada dos solos ([www.ciagri.usp.br](http://www.ciagri.usp.br), 12/2005).

A matéria orgânica também é fonte de nitrogênio para o solo. Nela, o nitrogênio está insolúvel, mas graças a atuação de organismos decompositores (fungos e bactérias) ele é convertido em  $NH_4^+$ , no processo conhecido como *amonificação* (Figura 2.10) (<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm#topico2>).

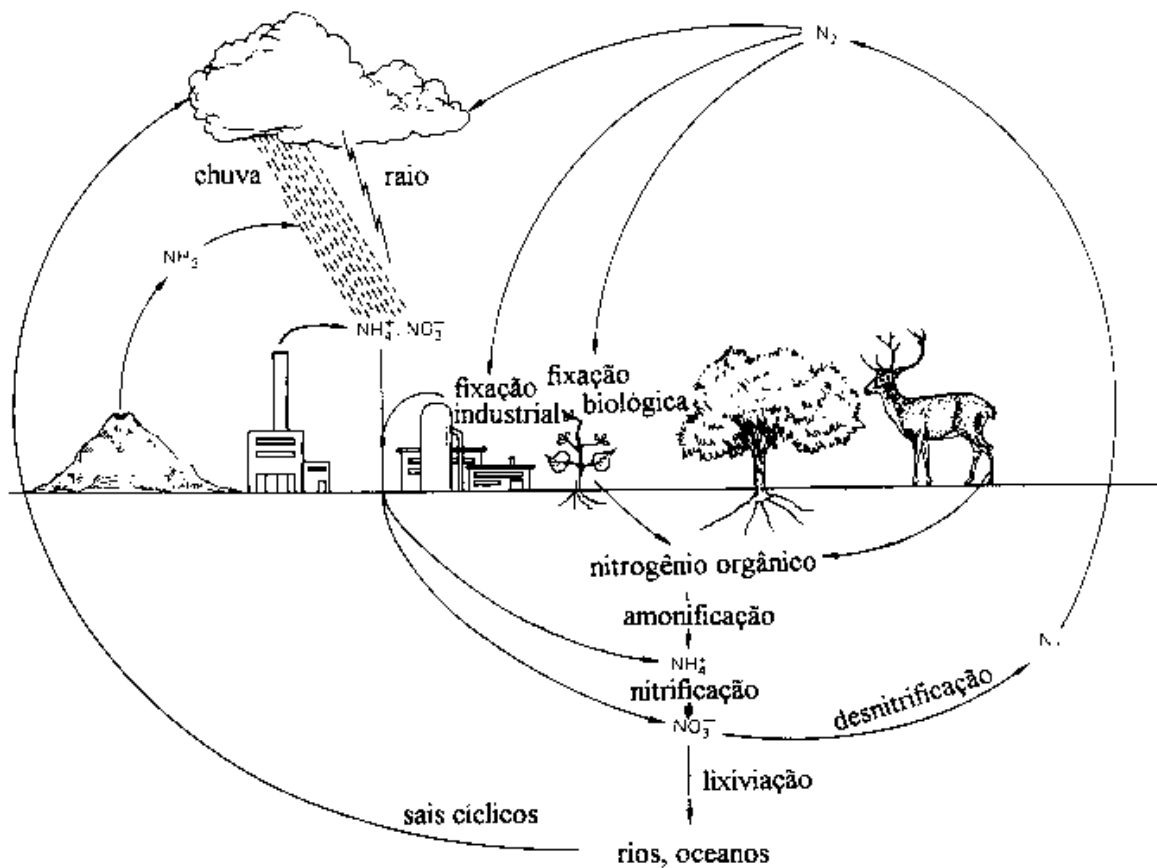


Figura 2.10 – Ciclo do Nitrogênio na Natureza

Ainda considerando o ciclo do nitrogênio, é importante lembrar que o  $NH_4^+$  presente nos solos é, frequentemente, convertido a  $NO_3^-$  (Figura 2.8). O processo, conhecido pelo nome de *nitrificação*, que ocorre em duas etapas e conta com a atuação de bactérias nitrificantes. Inicialmente, o  $NH_4^+$  é convertido a  $NO_2^-$  (nitrito) pela ação de bactérias do gênero *Nitrosomonas*. Em seguida, o  $NO_2^-$  é convertido a  $NO_3^-$  pelas bactérias do gênero *Nitrobacter*.

Fechando o ciclo do nitrogênio, observamos que o nutriente pode ser perdido do solo, conforme Figura 2.10, e estas perdas são devidas à *lixiviação* ou à *desnitrificação*.

## **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 – CULTURA MICROBIANA**

Foi utilizada uma cultura mista de bactérias anaeróbias enriquecida com BRS, proveniente da água de produção de Carmópolis, Sergipe. O enriquecimento da cultura foi obtido através de cultivos sucessivos em meio Postgate E (POSTGATE, 1984). A cultura mista utilizada apresentava concentração celular da ordem de  $10^6$  NMP/mL,  $10^5$  NMP/mL e  $10^2$  NMP/mL, respectivamente para BRS, bactérias anaeróbias heterotróficas (BHA) e bactérias redutoras de nitrato (BRN).

A cultura mista de bactérias anaeróbias enriquecida com BRS (cultura estoque) foi mantida através de repiques mensais em meio Postgate E (POSTGATE, 1984), incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **3.2 – MEIOS DE CULTIVO**

#### **3.2.1 – EFLUENTE SINTÉTICO**

O efluente foi desenvolvido a partir da modificação da composição do meio Postgate E (POSTGATE, 1984) pela substituição da fonte de carbono lactato de sódio por ácidos orgânicos (valérico, butírico, propiônico e acético) e supressão do agar-agar. A Tabela 3.1 apresenta a composição do efluente utilizado, apresentando as concentrações dos ácidos orgânicos correspondentes à concentração de lactato apresentada na formulação original do meio Postgate E.

O meio Postgate E (Tabela 3.2) foi utilizado como base no preparo do efluente sintético visto que sua composição atende as necessidades nutricionais das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), e ainda por conter vários minerais normalmente constituintes da água de produção, um efluente da indústria petrolífera.

Do mesmo modo, o lactato foi substituído pelos ácidos orgânicos de cadeia curta, uma vez que estas substâncias, normalmente presentes em águas residuais da indústria petrolífera, podem ser utilizadas como fonte de carbono pelas BRS (KLEIKEMPER *et al.*, 2002).

Tabela 3.1 – Composição Química do Efluente Sintético

<b>Compostos</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Ácido acético*	0,625
Ácido propiônico*	0,514
Ácido butírico*	0,458
Ácido valérico*	0,425
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,67
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,68
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Extrato de Lêvedo	1,0
Ácido Ascórbico	0,1

\*Concentração calculada com base na concentração de lactato existente na formulação original do meio Postgate E.

A concentração de cada um dos ácidos orgânicos foi calculada com base na relação molar do seu conteúdo em carbono, de tal modo a obter uma mistura contendo os quatro ácidos em iguais proporções de carbono. No planejamento experimental a concentração de ácido variava conforme a concentração de carbono adotada em cada experimento.

Exceto pelos ácidos orgânicos, os demais constituintes foram dissolvidos e avolumados em água destilada, sob purga de nitrogênio, a fim de estabelecer condição de anaerobiose. Após ajuste do pH a  $7,0 \pm 0,1$  com a adição de NaOH, a solução preparada foi distribuída em frascos do tipo penicilina, os quais foram vedados com tampas de borracha e lacrados e em seguida, foi feita a sua esterilização (121°C /20 min.).

A mistura de ácidos, após ajuste do pH em 7,0 com NaOH, foi adicionada a cada frasco de modo a estabelecer a concentração de carbono desejada.

### 3.2.2 – MEIO PARA O CULTIVO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)

O crescimento, a manutenção e a quantificação das BRS foram realizados em meio Postgate E (POSTGATE, 1984), cuja composição é apresentada na Tabela 3.2. Este meio, conforme descrito por Postgate (1984), é indicado para seleção e contagem de BRS. Vieira (2003) utilizou este meio para contagem de BRS, bem como alguns de seus constituintes no enriquecimento de água de produção, a fim de favorecer a biodegradação anaeróbia de contaminantes nela presentes por cultura mista de BRS.

O meio, após preparo e ajuste do pH a  $7,8 \pm 0,1$  com a adição de NaOH, foi distribuído em frascos do tipo penicilina. De modo a garantir condição de anaerobiose, o preparo do meio e a sua distribuição foram realizados sob purga de nitrogênio, e os frascos foram vedados com tampas de borracha e lacrados. Em seguida, os meios foram esterilizados a 1 atm por 20 minutos.

Tabela 3.2 – Composição Química do Meio Postgate E

<b>Compostos</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,67
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,68
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Ágar-agar	1,9
Extrato de Lêvedo	1,0
Ácido Ascórbico	0,1
Solução de Lactato de Sódio (50%)	3,5 mL/L
Solução de Resazurina (0,025%)	4,0 mL/L

Fonte: POSTGATE, 1984.

No momento do uso, a cada frasco foi adicionada alíquota de solução estéril de tioglicolato de sódio (12,4 g/L), na proporção de 0,1 mL para cada 10 mL de meio. Na composição original do meio Postgate E consta 0,1 g de ácido tioglicólico. A substituição do

ácido tioglicólico por tioglicolato de sódio, a ser adicionado no meio estéril, foi proposta pela PETROBRAS. A adição destas substâncias de caráter redutor tem por finalidade estabelecer no meio potencial redox de 0 a -150 mV, necessário para o desenvolvimento das BRS (NEVIUS et al., 2005). A resazurina, presente na composição do meio, é usada como um indicador para evidenciar se o meio está adequadamente reduzido. Uma coloração ligeiramente rósea a incolor do meio indica seu estado de anaerobiose, enquanto o estado oxidado é indicado pela cor roxa, tão mais intensa quanto maior a concentração de oxigênio dissolvido.

### 3.2.3 – MEIO PARA O CULTIVO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS ANAERÓBIAS (BHA)

O meio fluido ao tioglicolato (MERCK) foi usado para a contagem das culturas de BHA (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Composição Química do Meio Fluido ao Tioglicolato

<b>Compostos</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Peptona de Caseína	15,0
Extrato de Levedura	5,0
D(+)Glicose	5,5
L Cistina	0,5
Tioglicolato de Sódio	0,5
Resazurina	0,001

A condição de anaerobiose foi garantida pela purga de nitrogênio durante todo o preparo e distribuição do meio em frascos do tipo penicilina, vedados com tampas de borracha e lacrados. Os meios foram posteriormente esterilizados a 1 atm por 20 minutos, em autoclave.

### 3.2.4 – MEIO PARA O CULTIVO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO (BRN)

O meio nutritivo usado para a contagem de BRN foi o descrito por Davidova et al. (2001), cuja composição está apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição Química do Meio para Bactérias Redutoras de Nitrato

<b>Compostos</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
KCl	0,5
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3
NH <sub>4</sub> Cl	0,5
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,0
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,15
NaNO <sub>3</sub>	0,85
Extrato de levedura	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	5,0
Resazurina	0,001
Solução de elementos traço (Tabela 3.5)	10 mL

Fonte: DAVIDOVA et al., 2001.

Após ajuste do pH em 7,2 com solução de NaOH, o meio de cultura foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Conforme anteriormente descrito, a condição de anaerobiose do meio foi estabelecida através da purga com nitrogênio durante todo o seu preparo e distribuição.



Tabela 3.5 – Composição Química da Solução de Elementos Traço

Compostos	Concentração (g/L)
Acido nitriloacético (com pH ajustado para 6,0 com KOH)	2,0
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,0
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8
CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Ni <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,02
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,02
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	0,02

### 3.3 – ACLIMATAÇÃO DA CULTURA MICROBIANA AO CARBONO

A aclimação foi realizada através de subcultivos da cultura microbiana em meio Postgate E (Tabela 3.2), contendo concentrações crescentes de carbono orgânico (g/L): 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0, através da adição da mistura dos ácidos valérico, butírico, propiônico e acético. Como mencionado no item 3.2.1, os ácidos orgânicos foram adicionados em iguais proporções de carbono, e a concentração de cada um foi calculada com base na relação molar do seu conteúdo em carbono.

Os testes de aclimação foram conduzidos em frascos do tipo penicilina com 50 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio reacional. A relação volume de meio/capacidade do frasco foi estabelecida com o propósito de ocupar o máximo do espaço útil do frasco, minimizando a entrada de O<sub>2</sub> no sistema. A condição de anaerobiose foi ainda mais assegurada com a purga do meio durante seu preparo e sua distribuição nos frascos, e por fim, pela vedação dos frascos através de tampas de borracha e selos de alumínio.

Como inóculo foram utilizados 4 mL da cultura estoque (item 3.3), correspondendo a proporção de 10% (v/v) em relação ao volume de meio. Após inoculação, os cultivos foram incubados em estufa a 30 ± 1°C. Tão logo, era evidenciado o crescimento das BRS, 4 mL do cultivo eram novamente transferidos para outro frasco contendo o meio com a subsequente concentração de carbono (mistura de ácidos).

No final do teste, também foi avaliado o crescimento da cultura em efluente sintético (Tabela 3.1), ou seja, no meio Postgate E desprovido da principal fonte de carbono (lactato de sódio), e suprido por ácidos orgânicos, em igual conteúdo de carbono. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4. – PREPARO DO INÓCULO

As concentrações de bactérias redutoras de sulfato, heterotróficas anaeróbias e redutoras de nitrato foram determinadas na cultura estoque por contagem através da técnica de número mais provável (NMP) (HARRISON JR., 1982) nos meios Postgate E (Tabela 3.2), Fluido ao Tioglicolato (Tabela 3.3) e de Davidova et al (Tabela 3.4).

Para tanto, 4 mL da cultura aclimatada em efluente sintético contendo 1 g/L de carbono, representado pela mistura de ácidos orgânicos (item 3.2.1), foram inoculados em 40 mL de novo efluente. O cultivo foi incubado em estufa a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 4 dias.

Amostras de diferentes cultivos utilizados como inoculos foram microbiologicamente analisadas. Com tal propósito, as amostras foram primeiramente submetidas a diluições decimais sucessivas em solução redutora (Tabela 3.6) e, em seguida, semeadas nos meios apropriados para o crescimento de BRS (Tabela 3.2), BHA (Tabela 3.3) e BRN (Tabela 3.4). Após incubação a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 28 dias, o crescimento das BRS foi visto através da formação de precipitado preto, o das bactérias anaeróbias através da turvação e o das BRN pelo desenvolvimento de coloração vermelho acastanhada e consumo de nitrato, nos respectivos meios.

Tabela 3.6 – Composição Química da Solução Salina Redutora

<b>Compostos</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Tioglicolato de Sódio	0,124
Ácido Ascórbico	0,1
Resazurina (solução 0,025% p/v)	4,0 mL

### **3.5 – TESTES PRELIMINARES**

Alguns ensaios foram preliminarmente realizados para definir os valores das concentrações de nitrato, sulfato e carbono a serem adotadas no planejamento experimental, com a finalidade de minimizar a geração biogênica de sulfeto de hidrogênio.

#### **3.5.1 – TESTE DE SENSIBILIDADE DA CULTURA MICROBIANA AO NITRATO**

Este teste teve como propósito determinar o comportamento das BRS em diferentes concentrações de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), em relação à geração de  $\text{H}_2\text{S}$ . A sensibilidade da cultura microbiana foi avaliada para nitrato, em diferentes concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 g  $\text{NO}_3^-/\text{L}$ .

O crescimento das BRS foi visualizado através da formação do precipitado negro de  $\text{FeS}$ , após uma semana de incubação em estufa .

#### **3.5.2 – CONCENTRAÇÃO DE SULFATO**

O comportamento da cultura foi avaliado nas concentrações de sulfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) no nível inferior de 850 mg/L, central de 2000 mg/L e superior de 3150 mg/L. O nível inferior foi escolhido baseado na quantidade de sulfato presente no efluente sintético, por já estar a cultura aclimatada. A escolha do valor superior de 3150 mg/L foi feita tendo como premissa avaliar a atividade microbiana numa concentração de sulfato ligeiramente superior à da água do mar, de aproximadamente 2800 mg/L, estabelecendo uma concentração de número inteiro no ponto central.

#### **3.5.3 – CONCENTRAÇÃO DE CARBONO**

O crescimento da cultura foi avaliado para as concentrações de carbono de 1000 mg/L (nível inferior), de 3000 mg/L (nível central) e 5000 mg/L (nível superior). A concentração do nível inferior de carbono contemplou a quantidade de carbono existente no meio Postgate E, utilizado como base para o preparo do efluente sintético. O nível superior foi fixado com o intuito de analisar a atuação das BRS e demais bactérias heterotróficas anaeróbias em maiores

concentrações de carbono, visto que a geração de H<sub>2</sub>S está diretamente relacionada com a quantidade de carbono disponível.

Como fonte de carbono foi empregada uma mistura de ácidos orgânicos (acético, butírico, propiônico e valérico), sendo as quantidades fixadas para cada experimento calculadas de modo a obter iguais proporções de carbono para cada ácido, conforme anteriormente descrito (item 3.2).

Neste estudo foi avaliado o crescimento das BRS nas diferentes condições, através de observação visual dos cultivos após uma semana de incubação à temperatura de 30±1°C.

### 3.6 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização de experimentos que permitam obter dados significativos e confiáveis, deve-se utilizar um método científico de planejamento. Além disso, quando o problema envolve dados que podem conter erros experimentais, um modo adequado de análise é por métodos estatísticos. Em qualquer análise experimental devem-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última dependente do tipo de planejamento realizado (OLIVEIRA, 2004)

As vantagens do uso do planejamento experimental são (BARROS NETO *et al.*, 1995 *apud* OLIVEIRA, 2004):

- Redução do tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- Redução dos custos relativos à execução dos ensaios, fato que está relacionado à redução da quantidade de experimentos;
- Permite a avaliação e minimização do erro experimental;
- Permite uma otimização multivariada, e
- Não requer conhecimentos elevados em estatística.

O processo de produção de sulfeto envolve diversas variáveis, assim a análise e planejamento dos experimentos são mais confiáveis utilizando técnicas estatísticas para esse fim. A técnica de superfície de resposta, que tem como base o planejamento fatorial dos experimentos, é de fundamental importância neste trabalho, pois permite verificar os efeitos individuais e as interações entre as variáveis, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e o equacionamento empírico dos resultados em função das variáveis escolhidas (BOX *et al.*, 1978).

O número de variáveis a serem estudadas aliadas à necessidade de obter uma

estimativa de parâmetros de uma superfície de segunda ordem e ainda, a redução do esforço experimental, levaram à utilização do Planejamento Composto Central (**PCC**). O PCC é um planejamento fatorial de 1ª ordem aumentado por pontos adicionais para permitir a estimação dos parâmetros de uma superfície de 2ª ordem. Portanto, foi realizado um PCC composto por um planejamento fatorial a dois níveis com três variáveis acrescido de duas réplicas no ponto central e ainda 6 experimentos nos pontos axiais ( $\alpha$ ), totalizando 16 experimentos.

-1	-1	-1	}	Planejamento Fatorial $2^k$
-1	-1	+1		
-1	+1	-1		
-1	+1	+1		
+1	-1	-1		
+1	-1	+1		
+1	+1	-1		
+1	+1	+1		
$-\alpha$	0	0	}	Pontos Axiais 2.K
$+\alpha$	0	0		
0	$-\alpha$	0		
0	$+\alpha$	0		
0	0	$-\alpha$		
0	0	$+\alpha$		
0	0	0	}	Pontos Centrais
0	0	0		

**Figura 3.1** – Esquema do planejamento composto central.

Neste planejamento experimental foram realizados experimentos para verificar a influência de três variáveis no processo de redução na produção de sulfeto de hidrogênio por uma cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS). As variáveis mais significativas neste processo foram:

- $X_1$  – Concentração de sulfato ( $SO_4^{2-}$  em mg/L);
- $X_2$  – Concentração de carbono (C em mg/L) e,
- $X_3$  – Concentração de nitrato ( $NO_3^-$  em mg/L).

Como já mencionado, os valores destas variáveis foram obtidos através de testes preliminares apresentados na seção 3.6 e por concentrações existentes na água do mar e meio Postagate.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando as seguintes equações de codificação:

$$\text{Equação geral: } X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.1)$$

sendo:  $X_n$  é o valor da variável no experimento na forma codificada;

$X$  é o valor real da variável a ser calculado;

$X_0$  é o valor real da variável no ponto central;

$X_{+1}$  é o valor real da variável no nível superior;

$X_{-1}$  é o valor real da variável no nível inferior.

$$\text{- Concentração de } SO_4^- \quad X_1 = \frac{SO_4^{2-}(g/L) - 2,0(g/L)}{1,15(g/L)} \quad (3.2)$$

$$\text{- Concentração de C: } X_2 = \frac{C(g/L) - 3,0(g/L)}{2,0(g/L)} \quad (3.3)$$

$$\text{- Concentração de } NO_3^- : \quad X_3 = \frac{NO_3^-(g/L) - 1,5(g/L)}{1,0(g/L)} \quad (3.4)$$

O valor de  $\alpha = 1,287$  foi calculado para que o PCC fosse ortogonal, isto é, um planejamento onde a matriz de variância e covariância são diagonais e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX *et al.*, 1978).

O valor de  $\alpha$ , foi calculado através da seguinte equação:

$$\alpha = \left( \frac{Q \cdot G}{4} \right)^{1/4} \quad (3.5)$$

sendo,  $Q = \left[ (G + T)^{1/2} - G^{1/2} \right]^2$

$G$  = número de pontos fatoriais ( $G = 2^k$ , se completo);

$T$  = número de pontos adicionais no PCC;  $T = 2k +$  número de réplicas centrais.

Abaixo, na Tabela 3.7, estão relacionadas as variáveis do processo e seus respectivos valores, de acordo com seus níveis: inferior, central e superior.

Tabela 3.7- Variáveis do processo.

Variáveis	Descrição	NÍVEIS				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
$X_1$	Sulfato – $SO_4^-$ (mg/L)	520	850	2000	3150	3480
$X_2$	Carbono- C (mg/L)	426	1000	3000	5000	5570
$X_3$	Nitrato – $NO_3^-$ (mg/L)	213	500	1500	2500	2730

Na Tabela 3.8, temos a matriz do planejamento apresentando os valores codificados e reais das variáveis.

Tabela 3.8 – Matriz do planejamento

VARIÁVEIS CODIFICADAS				VARIÁVEIS REAIS		
Experimento	$SO_4^-$	C	$NO_3^-$	$SO_4^-$ (mg/L)	C (mg/L)	$NO_3^-$ (mg/L)
1	-1	-1	-1	850	1000	500
2	-1	-1	+1	850	1000	2500
3	-1	+1	-1	850	5000	500
4	-1	+1	+1	850	5000	2500
5	+1	-1	-1	3150	1000	500
6	+1	-1	+1	3150	1000	2500
7	+1	+1	-1	3150	5000	500
8	+1	+1	+1	3150	5000	2500
9	- $\alpha$	0	0	520	3000	1500
10	+ $\alpha$	0	0	3480	3000	1500
11	0	- $\alpha$	0	2000	0426	1500
12	0	+ $\alpha$	0	2000	5570	1500
13	0	0	- $\alpha$	2000	3000	213
14	0	0	+ $\alpha$	2000	3000	2730
15	0	0	0	2000	3000	1500
16	0	0	0	2000	3000	1500

### 3.6.1 – AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $H_2S$

Os experimentos foram realizados em frascos de 50 mL de capacidade, contendo:

- 40 mL de meio com adição da concentração de nitrato e ajuste da concentração de sulfato de acordo com o experimento (Tabela 3.8);
- mistura de ácidos orgânicos, de modo a estabelecer a concentração de carbono definida em cada experimento (ITEM 3.2.1);



A fim de garantir condição de anaerobiose, os frascos foram vedados com tampas de borracha e selos metálicos e, em seguida, esterilizados.

Como inóculo foi usada a cultura aclimatada (10% v/v), consistindo de um cultivo de 4 dias no efluente sintético contendo a mistura de ácidos orgânicos, na concentração total de carbono de 1 g/L (item 3.4). Após inoculação os frascos foram incubados a temperatura ambiente (28°C), sob agitação de 150 rpm. Decorridos 28 dias, foram realizadas análises químicas (sulfeto, nitrito, sulfato e nitrato) e microbiológicas (BRS e BHA). As metodologias analíticas utilizadas neste trabalho estão descritas no final deste capítulo (item 3.14)

Visando uma maior confiabilidade nos resultados obtidos, foram realizadas réplicas para cada experimento, e também foi feito o controle abiótico nos experimentos centrais, de modo a estimar e, caso necessário, desprezar as perdas naturais.

### 3.6.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS RESPOSTAS

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa *Statistica 5.1*<sup>®</sup> a partir da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros os termos isolados, de interação e quadráticos das três variáveis estudadas. A equação empírica de 2ª ordem proposta para representar cada uma das respostas segue a seguinte forma:

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1^2 + iX_2^2 + jX_3^2 \quad (3.6)$$

Sendo:

Y = resposta estudada;

$\beta_0$  = valor médio da resposta;

a, b, c,...j = constantes ou parâmetros da equação;

X<sub>1</sub> = Concentração de sulfato (mg/L);

X<sub>2</sub> = Concentração de carbono (mg/L);

X<sub>3</sub> = Concentração de nitrato (mg/L).

A esta equação foram aplicados os resultados obtidos e feita uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros através dos valores de t de Student para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância (p) superior a 10%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes são consideradas não relevantes quando p superior a 10%. Os parâmetros

não significativos foram eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa os efeitos das variáveis na resposta que está sendo analisada e que determina qual das variáveis mais afeta tal resposta. Pode-se, ainda, prever qual a melhor condição para o processo. O valor do  $R^2$  e a comparação entre F calculado e F tabelado foram utilizados para constatação da significância ou não do modelo (FELIPE, 1999).

Com o objetivo de verificar o comportamento da resposta estudada, isto é, se ela apresenta ponto de máximo, de mínimo ou não apresenta nem ponto de máximo e nem de mínimo (ponto de sela) é necessário descobrir o ponto estacionário.

Os pontos estacionários são obtidos através da derivada da equação da resposta Y pela variável  $X_k$ , isto é:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (3.7)$$

sendo,  $Y = b_0 + x'b + x'Bx$

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (3.8)$$

sendo  $b_0$  o termo independente;

$x'b$  são os termos de 1ª. ordem na função de resposta;

$x'Bx$  é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário será dado por:  $x_0 = - (1/2) B^{-1}b$ , onde B é a matriz (k x k), onde a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex:  $a_{12}$  e  $a_{21}$  correspondem ao coeficiente da interação  $X_1X_2$ ). A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares).

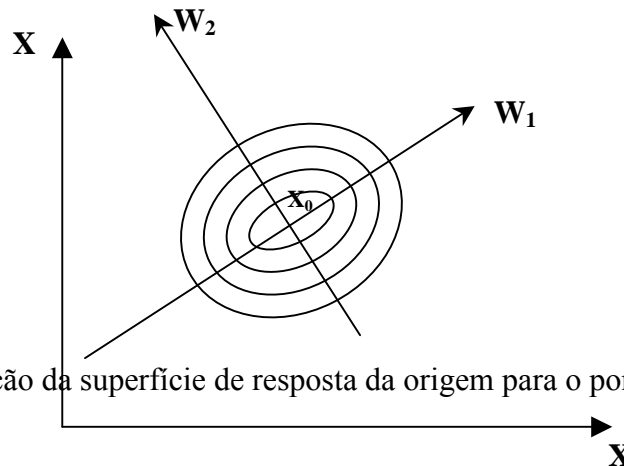
O ponto estacionário ( $x_0$ ) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um **máximo**;
- Um ponto onde a superfície atinge um **mínimo**, ou
- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo  $\Rightarrow$  **Ponto de sela** (“saddle point”).

Porém, podem existir problemas relacionados a estes pontos estacionários:

- Pode existir uma região de máximo e não um ponto de máximo;
- Pode ser que o ponto estacionário esteja fora da região experimental.

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem  $(X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, \dots, 0)$  para o ponto estacionário  $x_0$  (Figura – 3.2). Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis,  $w_1, w_2, \dots, w_k$ .



**Figura 3.2** – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtém-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.9)$$

sendo:

$y_0$ : é a resposta estimada no ponto estacionário e,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  são constantes.

Os sinais dos coeficientes de  $\lambda$  e a grandeza dos mesmos ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário. A relação entre os valores de  $w$  e  $x$  também é importante, pois indicam ao pesquisador quais são as regiões úteis para exploração.

Se  $\lambda_i < 0$ , com  $i = 1, 2, \dots, k$ , quando os movimentamos em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de  $Y$ , isto é, o ponto estacionário  $x_0$  é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se  $\lambda_i > 0$ , o ponto estacionário  $x_0$  é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os  $\lambda$ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário  $x_0$  não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

Para obtenção dos pontos estacionários bem como a análise canônica dos dados para cálculo dos pontos de maximização das respostas foi utilizado um algoritmo implementado no *software Maple V Release 4*<sup>®</sup> (ver Apêndice A).

### 3.7 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO NA GERAÇÃO DE H<sub>2</sub>S

Este estudo foi realizado em duas condições bastante distintas: o nível inferior correspondendo ao valor otimizado pelo PCC e, para o nível superior, uma concentração bem maior de modo a estimar a produção microbiana de sulfeto em efluentes contendo alta concentração de carbono.

Os experimentos foram realizados em frascos de 50 mL de capacidade, contendo 40 mL do efluente sintético, constituído pelo meio Postgate sem lactato de sódio e agar-agar, acrescido da mistura de ácidos orgânicos como fonte de carbono, nas concentrações em carbono de 444 mg/L e 10.000 mg/L, e também adicionado de sulfato (1616 mg/L) e de nitrato (2262 mg/L), ambos nas concentrações otimizadas no item anterior (3.6.2).

O inóculo, as condições operacionais e as quantificações químicas e microbiológicas realizadas foram as mesmas descritas no item 3.6.1.

### 3.8 – EFEITO DA ADIÇÃO INTERMITENTE DE NITRATO NA BIOGÊNESE DE H<sub>2</sub>S

Neste estudo foram utilizados 41 frascos de 50 mL de capacidade, contendo 40 mL do efluente sintético (item 3.2.1). O preparo do inóculo e os procedimentos de inoculação e de cultivo foram idênticos aos experimentos anteriormente realizados (item 3.4). Os experimentos foram divididos em quatro etapas, num tempo total de 34 dias. Periodicamente, amostras dos cultivos eram analisadas química e microbiologicamente, para quantificação de nitrato, nitrito, sulfato, sulfeto, BRS, BHA e BRN. A descrição detalhada de cada etapa é dada a seguir:

- **Primeira etapa** - Duração de 10 dias. Do dia de partida até o 10º dia foram adicionados 500 mg/L de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato de sódio) nos 41 frascos, a cada dois dias. Nesta fase, foram sacrificados 10 frascos, 2 a cada 2 dias, antes da adição de nitrato, para a realização das análises químicas e microbiológicas.
- **Segunda etapa** – Duração de 20 dias. Teve início no 10º dia de operação (fim da primeira etapa) com a adição da mistura de ácidos orgânicos, na concentração de 1000 mg/L de carbono, nos 31 frascos remanescentes da etapa anterior, de tal modo a restabelecer a

condição inicial em termos de conteúdo de carbono. Nesta fase, foi sacrificado um total de 10 frascos, dois a dois em dias pré-determinados, finalizando 30 dias após o início do processo.

- **Terceira etapa** – Duração de 10 dias. Teve início na metade da segunda etapa (20º dia), 20 dias a partir do início do processo. Esta etapa consistiu em adicionar nutrientes nos 21 frascos provenientes da segunda etapa, através da retirada de parte do seu conteúdo (50% v/v) e injeção de igual volume do meio Postgate (Tabela 3.2), a fim de favorecer a atividade da cultura microbiana. Foram sacrificados 11 frascos, dos quais um no primeiro dia, logo após a adição dos nutrientes, para avaliar a nova condição reacional, as concentrações iniciais de nitrato, nitrito, sulfato, sulfeto e de microrganismos, considerando a diluição do meio e a entrada de impurezas advindas da adição do meio Postgate.
- **Quarta etapa** - Duração de 10 dias. Esta etapa teve início na metade da terceira etapa, mais precisamente no 24º dia de operação total. Foram utilizados 10 frascos nas condições da etapa anterior, onde foi feita nova adição de 500 mg/L  $\text{NO}_3^-$  a cada dois dias, de modo a estabelecer procedimento idêntico ao efetuado na primeira etapa. Analogamente, os frascos foram sacrificados dois a dois, para o estudo do comportamento da cultura microbiana, que foi feito através da análise das mesmas determinações quantitativas realizadas nas etapas anteriores.

A Figura 3.3 apresenta o cronograma das etapas, que permite observar que no decorrer de uma etapa, outra já tinha início.

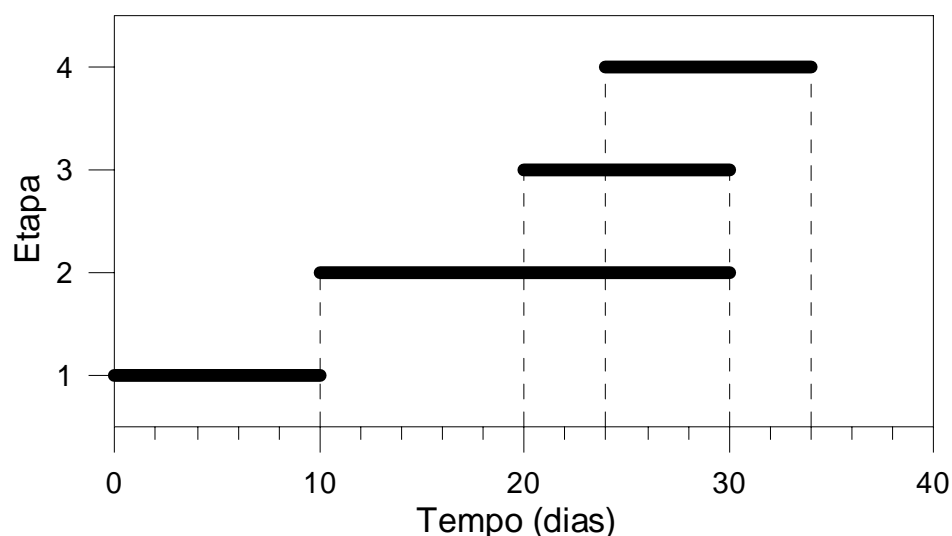


Figura 3.3 – Distribuição das etapas com o tempo de operação.

### **3.9. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SULFETO EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITRATO**

O estudo estatístico do planejamento experimental permitiu otimizar alguns parâmetros para minimizar a geração de  $H_2S$ . Com os valores estatisticamente definidos foi realizada a cinética para avaliar a acidificação biogênica na presença de nitrato. Para tanto, o experimento foi conduzido em frascos lacrados de 50 mL de capacidade, contendo o efluente sintético, constituído do meio Postgate, desprovido de lactato e agar-agar, e enriquecido com 1616 mg/L de sulfato, 444 mg/L de carbono (mistura de ácidos orgânicos) e com 2262 mg/L de nitrato ( $NaNO_3$ ).

Foi utilizado um total de 24 frascos, que foram inoculados simultaneamente com 10% (v/v) de um cultivo de quatro dias de cultura microbiana previamente aclimatada, conforme descrição dada no item 3.4. Logo após a inoculação, um dos frascos foi sacrificado para determinação dos valores iniciais dos seguintes parâmetros: sulfeto, nitrato, nitrito, BRS, BHA e BRN. Posteriormente, em períodos pré-determinados, dois a dois, os frascos foram sendo sacrificados para a coleta de amostras para análises químicas e microbiológicas. O processo foi monitorado ao longo de 28 dias.

Um estudo cinético também foi realizado nas mesmas condições operacionais acima descritas, mas sem adição de nitrato, a fim de obter dados experimentais para uma apreciação abalizada da tecnologia adotada.

### **3.10. – METODOLOGIA ANALÍTICA**

Os métodos analíticos empregados para quantificação de determinados grupos bacterianos na cultura microbiana utilizada e, durante o monitoramento dos experimentos do planejamento experimental, do teste de produção de sulfeto com adição intermitente de nitrato e da cinética de produção de sulfeto de hidrogênio na presença e ausência de nitrato estão descritos a seguir.

### 3.10.1 – SULFETO TOTAL

A concentração de sulfetos totais foi determinada através da adaptação do método colorimétrico para dosagem de gás sulfídrico (JACOBS *et al.*, 1957; APHA, 1992).

Com o auxílio de uma seringa, 1 mL de amostra era introduzida em um frasco do tipo penicilina vedado com tampa de borracha e lacre metálico. Em seguida, era adicionado igual volume de ácido clorídrico concentrado com o intuito de solubilizar os compostos de sulfeto insolúveis. O frasco era então aquecido em banho a 70°C por 10 minutos.

O gás sulfídrico formado, pela reação do sulfeto presente com o ácido clorídrico, era coletado através de purga de gás inerte (nitrogênio) em dois lavadores de gás acoplados em série, cada um contendo 10 mL de solução de hidróxido de cádmio. Neste caso, se evidencia a formação de sulfeto de cádmio pelo aparecimento de precipitado amarelo, cuja intensidade da coloração está relacionada à concentração de sulfeto presente na amostra.

Para a dosagem do sulfeto, ao conteúdo combinado dos dois borbulhadores, adicionava-se 0,6 mL de ácido aminosulfúrico e transferia-se para balão volumétrico de 25 mL. Após a adição de 2 gotas de indicador cloreto férrico, completava-se o volume com água destilada e deixava-se em repouso por 30 minutos.

As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro da marca Genesys, no comprimento de onda de 670 nm. Determinava-se a concentração de sulfeto através da curva de calibração anteriormente preparada com diluições de uma solução-mãe preparada com Na<sub>2</sub>S. 9H<sub>2</sub>O p.a., da marca Vetec. A curva de calibração encontra-se no Apêndice B deste trabalho.

### 3.10.2 – SULFATO

A determinação do sulfato foi feita utilizando-se o kit de dosagem *Sulfaver* da marca HACH, conforme sugerido por Vieira (2003).

Os íons sulfato reagem com o bário contido no kit de dosagem, formando um precipitado de sulfato de bário. A turbidez do meio é proporcional à quantidade de sulfato presente na amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro da marca Genesys, no

comprimento de onda de 450 nm. A curva de calibração encontra-se no Apêndice C deste trabalho.

### 3.10.3 - NITRATO

A concentração de nitrato foi determinada através da adaptação do método colorimétrico descrito nas normas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

Para tanto, um volume de 50 mL da amostra distribuído em uma cápsula de porcelana de 150 mL de capacidade deveria ser evaporado até a secura, em estufa a 100°C. Em seguida, adicionava-se 1mL da solução de ácido fenoldissulfônico, preparada pela fusão de 25 g de fenol, 150 mL de ácido sulfúrico p.a. e 75 mL de ácido sulfúrico fumegante (15% de SO<sub>3</sub>) em capela. Misturava-se, com auxílio de um bastão de vidro, o ácido e o resíduo aderido a parede interna da cápsula. Lavava-se com pequena porção (10 mL) de água destilada e adicionava-se, sob agitação, 5 mL da solução de hidróxido de sódio 12 N até desenvolvimento de uma cor amarela estável. Transferia-se para um balão volumétrico de 50 mL, lavando-se a cápsula. Nos casos em que a coloração amarela era muito intensa, fazia-se diluições maiores. A leitura da coloração amarela em espectrofotômetro a 400 nm era utilizada para determinar a quantidade de nitrogênio nítrico correspondente, usando uma curva padrão estabelecida. A curva padrão encontra-se no **Apêndice D** deste trabalho. Para cada ensaio era feito um branco para zerar o espectrofotômetro, usando o mesmo procedimento com água destilada no lugar da amostra.

### 3.10.4 - NITRITO

A concentração de nitrito foi determinada através do método colorimétrico descrito nas normas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

Transferia-se 50 mL da amostra para balão volumétrico, adicionava-se 1 mL da solução de ácido sulfanílico (8g de ácido sulfanílico, 750mL de água e 250 mL de ácido acético glacial, os reagentes devem ser colocados nesta ordem, e a solução deve ser preparada em capela) e 1 mL de solução de  $\alpha$  - naftilamina ( 5 g de  $\alpha$  - naftilamina dissolvida em 150mL de água quente, adiciona-se 250 mL de ácido acético glacial e completa-se o volume para 1L, e filtra-se através de uma camada de algodão). Agitava-se e deixava-se em repouso na ausência de luz por 15 minutos. Media-se a coloração vermelha desenvolvida em



espectrofotômetro a 520 nm e determinava a quantidade de nitrogênio nitroso correspondente usando a curva padrão previamente estabelecida. A curva d padrão encontra-se no **Apêndice E** deste trabalho. Ema cada ensaio era feito um branco para zerar o espectrofotômetro, usando o mesmo procedimento com água destilada no lugar da amostra.

### **3.10.5 – QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

#### **3.10.5.1 – BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO (BRS)**

A quantificação das bactérias redutoras de sulfato foi feita pela técnica do número mais provável (NMP) (HARRISON JR., 1982) utilizando meio Postgate.

A quantificação foi feita após incubação a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 28 dias. O crescimento das BRS foi visto através da formação de precipitado negro de FeS, que resulta da reação de  $\text{H}_2\text{S}$  gerado através do seu metabolismo com o  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  presente no meio Postgate.

#### **3.10.5.2 – BACTÉRIAS ANAERÓBIAS**

Este grupo de bactérias foi quantificado pela técnica do número mais provável (NMP) (HARRISON JR., 1982) utilizando meio fluido ao tioglicolato (MERK), após diluições decimais sucessivas em solução redutora. O procedimento de inoculação foi o mesmo utilizado para as bactérias redutoras de sulfato.

Após inoculação, os frascos foram incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 28 dias. O crescimento dessas bactérias foi observado através da turvação do meio.

#### **3.10.5.3 – BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO**

Este grupo de bactérias foi quantificado pela técnica do número mais provável (NMP) (HARRISON JR., 1982) utilizando meio mineral ( Tabela 3.4) e o pH ajustado para 7.2. A determinação do crescimento celular foi feito após incubação a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob luz fria,

por 28 dias, através da formação de uma coloração vermelho acastanhado, coloração característica de algumas espécies de BRN, e através do monitoramento do consumo de nitrato em alguns frascos.

## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 – ACLIMATAÇÃO DA CULTURA MICROBIANA**

A cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato utilizada neste trabalho foi inicialmente aclimatada, conforme descrito na seção 3.3. Este procedimento foi feito com o intuito de adaptar as espécies presentes às concentrações crescentes de ácidos orgânicos (acético, propiônico, butírico e valérico), e assim selecionar os microrganismos potencialmente capazes de produzir sulfeto a partir de ácidos orgânicos de cadeia curta, como os presentes nas águas de formação (MYRH, 2003).

A Tabela 4.1 apresenta o crescimento de BRS em efluente sintético (item 3.2.1), composto do meio Postgate E (POSTGATE, 1984) e diferentes concentrações iniciais de carbono. O critério estabelecido para aumento da concentração de carbono foi o crescimento intenso da cultura, portanto, em caso positivo transferia-se a cultura para novo meio com conteúdo maior de carbono. O crescimento foi observado pelo escurecimento do meio reacional, como consequência da formação de precipitado negro de FeS, em geral, uma semana após incubação a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

A presença de ácidos orgânicos não teve efeito inibitório a atividade metabólica das BRS até a concentração de 5,0 g de carbono/L, durante todo o período de aclimação. Adicionalmente, o rápido e intenso crescimento evidenciado pode ser atribuído a presença de um número considerável de espécies de BRS capazes de utilizar um ou mais ácidos como fonte de carbono e/ou a transformação destes compostos em substâncias prontamente assimiláveis por outros microrganismos existentes na cultura.

Tabela 4.1 – Aclimação da cultura microbiana a diferentes concentrações de carbono

Concentração de carbono (g/L)	Crescimento
0,1	+++
0,5	+++
1,0	+++
2,0	+++
3,0	+++
4,0	+++
5,0	+++

+ crescimento positivo – observado pela formação de precipitado negro de FeS.

Cada experimento foi realizado em triplicata.

Terminada a fase de adaptação da cultura aos ácidos orgânicos, foi feita a total supressão da fonte de carbono do meio Postgate E mais facilmente assimilável (lactato de sódio). Neste caso, foi observado que a cultura não só suportou a total ausência do lactato mas, sobretudo, foi capaz de crescer utilizando apenas o carbono proveniente dos ácidos como principal fonte de carbono. As BRS têm a capacidade de consumir ácidos orgânicos (fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico, pirúvico, graxos), hidrocarbonetos, glicerol, etanol, fenóis e benzoatos (POSTGATE, 1984).

Considerando que a adição de ácidos orgânicos não foi prejudicial ao crescimento das BRS, o qual normalmente era máximo em menos de 5 dias, e ainda que 1 g/L de carbono é uma concentração satisfatória para favorecer a produção de H<sub>2</sub>S, foi definido para inóculo o cultivo de 4 dias da cultura aclimatada em efluente sintético contendo exclusivamente a mistura de ácidos orgânicos de cadeia curta. Muitos destes cultivos foram analisados para quantificação das populações de bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias heterotróficas anaeróbias (BHA) e bactérias redutoras de nitrato (BRN). Estes grupos microbianos prevalecem nas condições ensaiadas, e são referendados como responsáveis pelo aumento/decréscimo do *souring* em reservatórios (ENERGY INSTITUTE, 2003). Os valores médios da quantificação celular do inóculo foram  $1,8 \times 10^6$  NMP/mL,  $9,5 \times 10^5$  NMP/mL e  $1,1 \times 10^2$  para BRS, BHA e BRN respectivamente.

Esses resultados são procedentes, pois a população de BRS apresenta espécies estritamente anaeróbias, enquanto no grupo das BHA podem coexistir espécies facultativas e

anaeróbias, ambas com capacidade de se desenvolver em condição de anaerobiose. Ressalta-se que o meio Postgate é um meio específico para BRS, que na maioria das vezes não encontram as condições nutricionais mínimas para crescimento em outros meios de cultura, como por exemplo no meio fluido ao tioglicolato, que é indicado para o cultivo de BHA. Tem-se ainda que as BRS apresentam metabolismo mais lento comparativamente às outras bactérias heterotróficas anaeróbias. Em consequência, a presença de um consórcio microbiano anaeróbio em meio não específico para BRS, ocasionará o esgotamento rápido da fonte de carbono pelas outras bactérias presentes, impedindo a proliferação das BRS.

## **4.2– TESTE PRELIMINARES**

### **4.2.1 – TESTE DE SENSIBILIDADE DA CULTURA MICROBIANA AO NITRATO**

Para verificar o efeito do nitrato no crescimento da cultura microbiana, esta foi cultivada na presença de diferentes concentrações de nitrato (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 g/L).

A Tabela 4.2 mostra a resposta da cultura microbiana às diferentes concentrações de nitrato, após uma semana de incubação a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Pode-se observar que aparentemente não houve alteração do metabolismo das BRS pela adição de nitrato até a concentração de 1,0g/L. E não houve crescimento de BRS nas concentrações a partir de 1,5 g/L , sendo que nas concentrações de 2,0 e 3,0 g/L, o cultivo apresentou, ao final do período de incubação, coloração vermelho acastanhado indicando crescimento das BRN presentes no consórcio microbiano.

A fim de determinar a ação do nitrato nas concentrações de 1,5; 2,0 e 3,0 g/L, alíquotas de 1 mL de cada um dos três cultivos foram transferidas para 10 mL de meio utilizado para repique de BRN. Após 15 dias de incubação sob luz fria, foi observado um intenso avermelhamento dos novos cultivos, indicativo da atividade metabólica das BRN. Por conseguinte, pode-se concluir que o nitrato estimula o desenvolvimento de BRN em concentrações iguais ou superiores a 1,5g/L.

Tabela 4.2– Teste de Sensibilidade da Cultura Microbiana ao Nitrato.

<b>Concentração de Nitrato (g/L)</b>	<b>Crescimento</b>
0,1	+++
0,5	+++
1,0	+++
1,5	---
2,0	---*
3,0	---*

\* observou-se que o meio ficou castanho avermelhado, coloração característica das BRN

#### 4.2.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO

A fim de avaliar o comportamento da cultura em diferentes concentrações de sulfato, cultivou-se a mesma em diferentes concentrações, iniciando com uma concentração de 850 mg/L, que é a concentração do meio Postgate, concentração a qual os microrganismos já estavam adaptados. Esta concentração foi aumentada, de forma a observar a máxima concentração de sulfato que permitiria o crescimento das BRS. Com este teste comprovou-se que o sulfato estimulava o crescimento das BRS, havendo precipitação de FeS em todas as concentrações estudadas. A diferença observada foi em relação ao tempo para crescimento da cultura. Notou-se que o tempo de incubação era menor para maiores concentrações de sulfato.

Tabela 4.3– Efeito da Concentração de Sulfato no crescimento das BRS..

<b>Concentração de Sulfato (g/L)</b>	<b>Crescimento</b>	<b>Tempo (dias)</b>
0,5	+++	4
0,85	+++	4
1,0	+++	2
2,0	+++	2
3,0	+++	1
4,0	+++	1

### **4.3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

Conforme descrito no Capítulo 3, uma vez definidos os valores das concentrações de nitrato, sulfato e carbono, foram realizados os 16 experimentos propostos pela matriz do planejamento adotada (Tabela 3.8).

#### **4.3.1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS RESPOSTAS**

A otimização do processo visando controlar a produção de sulfeto foi realizada em relação às variáveis: concentração de Sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), concentração de Carbono (C) e concentração de Nitrato ( $NO_3^-$ ), e pela análise das variáveis resposta: concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias e de bactérias redutoras de sulfato, consumo de sulfato e nitrato, e geração de  $H_2S$  e nitrito.

A partir dos resultados obtidos para as respostas analisadas, efetuou-se, para cada uma das respostas, uma regressão múltipla, tendo como fatores os termos isolados, as interações e os quadráticos das três variáveis estudadas.

Nos testes controles realizados para avaliação das perdas abióticas, não foram detectados microrganismos e, por conseguinte, não houve consumo de sulfato e/ou nitrato e nem produção de sulfeto e/ou nitrito.

##### **4.3.1.1 – PRODUÇÃO DE $H_2S$**

A Tabela 4.4 apresenta os valores médios da produção de sulfeto nas diferentes condições propostas no planejamento experimental.

Tabela 4.4 – Resultados da produção de sulfeto, em diferentes condições experimentais.

Exp.	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ( mg/L)	C ( mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( mg/L)	Produção de H <sub>2</sub> S (mg/L)
1	850	1000	500	44,3 ± 4,4
2	850	1000	2500	15,3 ± 1,5
3	850	5000	500	50,1 ± 5,0
4	850	5000	2500	18,7 ± 1,9
5	3150	1000	500	56,3 ± 5,6
6	3150	1000	2500	33,4 ± 3,3
7	3150	5000	500	85,6 ± 8,6
8	3150	5000	2500	53,2 ± 5,3
9	520	3000	1500	27,2 ± 2,7
10	3480	3000	1500	<b>57,0 ± 5,7</b>
11	2000	426	1500	<b>22,8 ± 2,3</b>
12	2000	5570	1500	<b>26,3 ± 2,6</b>
13	2000	3000	213	<b>74,0 ± 7,4</b>
14	2000	3000	2730	<b>10,3 ± 1,0</b>
15	2000	3000	1500	<b>23,8 ± 2,4</b>
16	2000	3000	1500	<b>22,4 ± 2,2</b>

Foi observado que a variação das concentrações de Sulfato (X<sub>1</sub>), Carbono (X<sub>2</sub>) e Nitrato (X<sub>3</sub>) resultou em cerca de 10 a 86 mg/L de sulfeto produzido (Tabela 4.4). Comparando os resultados verifica-se que mantendo constantes as concentrações de sulfato e carbono (experimentos 13 e 14) e aumentando a concentração de nitrato (2730 mg/L) se obtém um expressivo decréscimo (7,2 vezes) da quantidade de sulfeto formado, equivalente a um percentual de redução de 86,1%. A redução da quantidade de gás sulfídrico produzido relacionada com o aumento da concentração de nitrato também foi comprovada nos demais experimentos (1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8). Evidentemente, a geração de H<sub>2</sub>S teve correspondência direta com a quantidade de sulfato presente e, em menor grau, com a concentração de carbono.



Nos experimentos realizados com a concentração de nitrato constante (9 e 10; 11 e 12) pode ser evidenciado que a geração de gás sulfídrico foi muito mais influenciada pela variação de sulfato do que de carbono. Através destas comparações nota-se que a concentração de carbono tem pouca influencia no sulfeto produzido e que sua inibição está diretamente relacionada com a quantidade de nitrato adicionado.

Após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 5.1*, obteve-se a seguinte equação:

$$H_2S = 24,0370 + 12,227X_1 + 5,5596X_2 - 17,47X_3 + 10,481X_1^2 - 0,111X_2^2 + 10,493X_3^2 + 4,988X_1X_2 + 0,648X_1X_3 - 1,498X_2X_3 \quad (4.1)$$

A Tabela 4.5 apresenta os resultados obtidos para a regressão múltipla da produção de sulfeto

Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla para a produção de sulfeto

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante ( $\beta_0$ )	23,96	0,000033
$X_1$ ( $SO_4^-$ )	12,23	0,000118
$X_2$ (C)	5,55	0,016698
$X_3$ ( $NO_3^-$ )	- 17,47	0,000007
$X_1^2$ ( $SO_4^-$ ) <sup>2</sup>	10,48	0,003905
$X_3^2$ ( $NO_3^-$ ) <sup>2</sup>	1049	0,003878
$X_1 X_2$ ( $SO_4^-$ .C)	4,99	0,054217
$R^2 = 0,95$	$F_C = 28,28$	$F_T (0,01) = 5,80$

Nesta regressão foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 10%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. Assim, foram desprezados o termo quadrático da concentração de carbono ( $X_2^2$ ) e as interações concentração de sulfato/concentração de nitrato ( $X_1X_3$ ) e concentração de carbono /concentração de nitrato ( $X_2X_3$ ).