

Analisando a Tabela 4.5, constatam-se as variáveis que influenciam na produção de H₂S. Esta tabela mostra que altas concentrações de nitrato proporcionam menores concentrações de H₂S.

O coeficiente de correlação (R²) de 0,95 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta produção de H₂S frente à equação empírica proposta, ou seja, 95% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação.

O resultado de F calculado (F_c) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 1%. Esta comparação pode ser interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade (H₀) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa (H₁) afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar H₀ no nível de significância de 1%, ou seja, tem-se uma confiança de 99% de que o modelo é significativo.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, obteve-se a seguinte equação:

$$\text{H}_2\text{S} = 23,583 + 12,227X_1 + 5,559X_2 - 17,470X_3 + 10,481X_1^2 + 10,493X_3^2 + 4,988X_1X_2 \quad (4.2)$$

Analisando esta equação, pode-se observar pelos coeficientes das variáveis X₁, X₂ e X₃ que a concentração de nitrato (X₃) é a única que influencia significativamente na redução da produção de H₂S, pois apresenta sinal negativo. Logo, um aumento da concentração de nitrato, acarretará no decréscimo da produção de sulfeto. Por outro lado, as variáveis que representam as concentrações de sulfato (X₁) e carbono (X₂) possuem sinal positivo, de forma que seu aumento sempre favorecerá a produção de sulfeto; porém o maior valor encontrado para X₁ indica que a concentração de sulfato será preponderante.

A partir da equação completa (Eq. 4.1) foi utilizado um algoritmo obtido no software *Maple V release4*, para calcular as coordenadas do ponto estacionário para a produção de H₂S. Sendo elas:

$$x_1 = -0,8034;$$

$$x_2 = 0,8060;$$

$$x_3 = 0,9148.$$

Este ponto estacionário está dentro da região experimental.

As coordenadas do ponto estacionário e os respectivos λ's (λ₁ = - 0,7267; λ₂ = 10,5069; λ₃ = 11,0828) referentes à produção de H₂S indicam que esta resposta possui um ponto de sela.

Ainda usando o algoritmo no *software Maple V release 4*, foram calculados os X's correspondentes à minimização da resposta para a produção de H₂S, utilizando a forma canônica $Y = Y_0 - \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \lambda_3 w_3^2$. Para minimizar a resposta os termos $\lambda_2 w_2^2$ e $\lambda_3 w_3^2$ devem ser zerados e, então, deve-se buscar valores para w_1 tal que Y seja o menor possível. Sendo o λ_1 próximo de zero, pode-se dizer que se determinou uma região quase estacionária na direção do eixo da concentração de SO₄⁼. Sendo os valores λ_2 e λ_3 positivos, ao movimentar-se em qualquer direção no eixo correspondente a partir do ponto estacionário, ocorrerá um acréscimo na concentração. Feito isto, tem-se a Equação 4.1 na forma canônica e as seguintes variáveis codificadas para o ponto de otimização:

$$\text{H}_2\text{S} = 68,84 - 0,7267W_1^2 + 10,51 W_2^2 + 11,08 W_3^2 \quad (4.3)$$

$$X_1 = -0,335;$$

$$X_2 = -1,280;$$

$$X_3 = 0,7615.$$

Utilizando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis:

$$X_1 = 1616 \text{ mg/L de SO}_4^=;$$

$$X_2 = 444 \text{ mg/L de C};$$

$$X_3 = 2262 \text{ mg/L de NO}_3^-.$$

Como forma de ilustrar os efeitos das variáveis na produção de H₂S pela cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato pela adição de nitrato, estão apresentadas abaixo as superfícies de resposta relacionando as variáveis duas a duas com a resposta.

A Figura 4.1 mostra que baixos valores da concentração de carbono na região próxima ou abaixo do ponto central para a concentração de sulfato resultam em pequena produção de sulfeto.

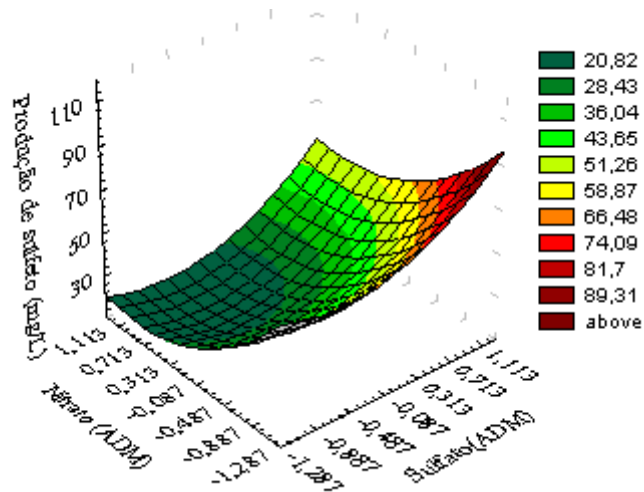


Figura 4.1 – Superfície de resposta para produção de sulfeto em função das concentrações de nitrato e sulfato.

A Figura 4.2 apresenta as variáveis que mais influenciaram na minimização da produção de H_2S . Nota-se que o efetivo controle da geração de H_2S é estabelecido para altos valores de nitrato e valores de sulfato abaixo do ponto central.

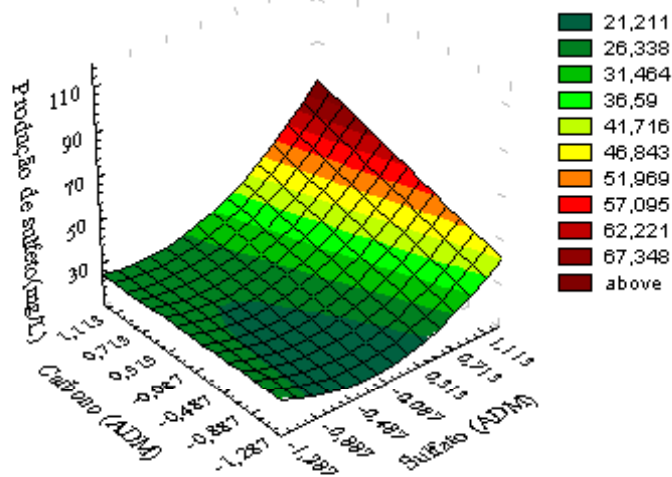


Figura 4.2 – Superfície de resposta para a produção de sulfeto em função das concentrações de carbono e sulfato

Analisando a Figura 4.3 observa-se que para valores da concentração de carbono próximos à menor concentração empregada (próximo ao $-\alpha$) e para maiores concentrações de nitrato (acima do ponto central) a produção de H_2S é menor. Os resultados das tendências de

minimização da produção de H_2S estão de acordo com o ponto de mínimo obtido pela otimização.

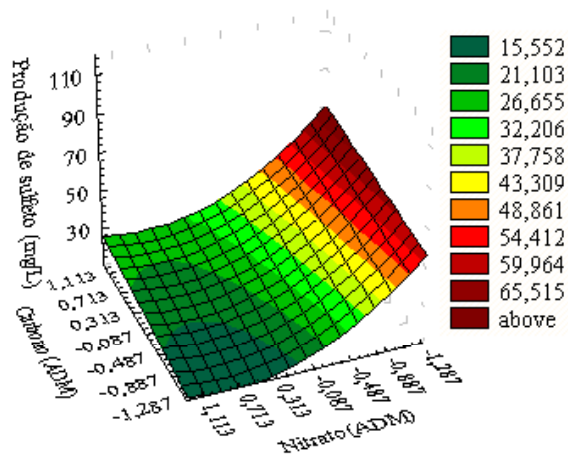


Figura 4.3 – Superfície de resposta para a produção de sulfeto em função das concentrações de carbono e nitrato.

A partir dos valores codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 no ponto de mínimo e utilizando a Equação 4.2, determinou-se que a concentração de H_2S neste ponto foi de 8,83 mg/L. Comparando este valor com a concentração de H_2S no experimento 14 do PCC, no qual obteve-se 10,28 mg/L, verifica-se que os resultados foram bem próximos. Este fato era esperado, devido aos valores das concentrações das variáveis do processo no ponto de otimização estarem próximos aos valores correspondentes ao experimento 14, com relação às concentrações de sulfato e nitrato, apesar de estar distante do valor de concentração de carbono. Porém, analisando-se os experimentos 11 e 12 verifica-se que um aumento da concentração de carbono superior a 13 vezes (de 426 para 5570 mg/L) promove um aumento de apenas 15,3% na produção de H_2S e, conforme indicado pela Equação 4.2, este parâmetro é o que menos contribui para a variação da produção de H_2S .

Analisando os resultados experimentais, as superfícies de resposta e a Equação 4.2, é notório que a variável X_3 é a que influencia mais significativamente na minimização da produção de H_2S . A fim de comprovar a importância da adição de nitrato na inibição da geração de H_2S , foi realizado o teste 14 do PCC na ausência de nitrato, sem alterar as demais concentrações e nas mesmas condições. Após 28 dias de incubação, observou-se uma maior produção de sulfeto (224 mg/L) comparativamente ao experimento com nitrato (10,3 mg/L), ressaltando a ação efetiva do nitrato na prevenção ou controle da produção de sulfeto.

4.3.1.2 – BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

A Tabela 4.6 mostra os resultados, em valores médios, da concentração de BRS para os experimentos definidos pelo planejamento experimental (item 3.6).

Pela Tabela 4.6 pode se observar que em todas as condições testadas houve diminuição da população de BRS. Porém, nenhuma das condições testadas levou à inativação total deste grupo microbiano.

Conforme previsto, o crescimento das BRS apresentou relação com a quantidade de carbono e, sobretudo, com a quantidade de sulfato. Além disso, de modo análogo à geração de sulfeto, o aumento da concentração de nitrato resultou no decréscimo da concentração de BRS (experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8); o maior percentual de redução (90%) também sendo determinado para o par de experimentos 13 e 14.

Tabela 4.6 – Concentração de bactérias redutoras de sulfato para cada condição experimental

Exp.	SO_4^- (mg/L)	C (mg/L)	NO_3^- (mg/L)	BRS (NMP/mL)
1	850	1000	500	$4,0 \times 10^2 \pm 0$
2	850	1000	2500	$9,0 \times 10 \pm 0$
3	850	5000	500	$5,0 \times 10^2 \pm 2,0 \times 10$
4	850	5000	2500	$1,0 \times 10^2 \pm 1 \times 10$
5	3150	1000	500	$6,4 \times 10^2 \pm 0$
6	3150	1000	2500	$3,3 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10$
7	3150	5000	500	$8,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10$
8	3150	5000	2500	$4,3 \times 10^2 \pm 0$
9	520	3000	1500	$2,4 \times 10^2 \pm 0$
10	3480	3000	1500	$5,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10$
11	2000	426	1500	$2,2 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10$
12	2000	5570	1500	$3,0 \times 10^2 \pm 0$
13	2000	3000	213	$7,0 \times 10^2 \pm 0$
14	2000	3000	2730	$7,0 \times 10 \pm 0$
15	2000	3000	1500	$2,0 \times 10^2 \pm 0$
16	2000	3000	1500	$1,8 \times 10^2 \pm 4,0 \times 10$

Na repetição do experimento 14, sem adição de nitrato, a concentração final de BRS foi de $2,3 \times 10^9$ NMP/mL. Nesta condição, também foi máxima a concentração de gás sulfídrico, produto resultante do metabolismo desassimilativo do sulfato, realizado pelas BRS.

Os resultados obtidos demonstram a capacidade do nitrato em inibir o metabolismo de algumas espécies de BRS, já que conforme anteriormente citado, na presença de nitrato, algumas espécies de BRS passam a obter energia através da respiração anaeróbica do nitrato, isto é, usando como aceptor final de elétrons o nitrato ao invés do sulfato (BARTON, 1995; DALSGAARD, 1994).

De acordo com a literatura, a inibição da geração de H_2S e do crescimento das BRS, pela adição de nitrato, depende de uma combinação de fatores (ENERGY INSTITUTE, 2003). Alguns pesquisadores, inclusive, sugerem que o efeito de inibição de crescimento das BRS, pela aplicação de íons nitrato, de fato resulta da formação de íons nitrito, um agente oxidante, através da elevação do potencial redox do meio/ambiente.

Pelo tratamento dos dados por regressão múltipla no programa *Statistica 5.1* foi obtida a equação a seguir:

$$\text{BRS} = 209,01 + 127,34X_1 + 42,161X_2 - 194,189X_3 + 88,651X_1^2 + 22,24X_2^2 + 97,71X_3^2 + 18,250X_1X_2 + 3,250X_1X_3 - 18,250X_2X_3 \quad (4.4)$$

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos para a regressão múltipla da quantificação de bactérias redutoras de sulfato, onde foram eliminados os parâmetros não significativos. Assim, foi desprezado o termo quadrático da concentração de carbono (X_2^2), e as interações concentração de sulfato/concentração de carbono (X_1X_2), concentração de sulfato/concentração de nitrato (X_1X_3) e concentração de carbono/concentração de nitrato (X_2X_3).

Tabela 4.7 – Resultados da regressão múltipla para a quantificação de BRS.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	224,729	0,000005
X_1 (SO_4^-)	127,345	0,000008
X_2 (C)	42,161	0,020157
X_3 (NO_3^-)	-194,189	0,000000
X_1^2 (SO_4^-)	88,656	0,002356
X_3^2 (NO_3^-)	97,712	0,001227
$R^2 = 0,96$	$F_C = 54,95$	$F_T(0,01) = 5,64$

A Tabela 4.7 mostra que a concentração de nitrato é a variável de maior relevância na redução das BRS, sendo que altas concentrações de nitrato proporcionam menores números de BRS.

O coeficiente de correlação de 0,96 indica que foi feito um bom ajuste dos dados ao modelo. Além disso, o resultado de F calculado (F_C) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 1% comprovando que o modelo é significativo.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos e o reajuste dos dados, obteve-se pelo *software Statistica 5*, a seguinte equação do modelo ajustado:

$$\text{BRS} = 224,729 + 127,34X_1 + 42,161X_2 - 194,189X_3 + 88,656X_1^2 + 97,712X_3^2 \quad (4.5)$$

A partir da equação completa (Eq. 4.4) e utilizando um algoritmo do *software Maple V release 4*, foram calculadas as coordenadas do ponto estacionário para contagem de BRS:

$$x_1(\text{SO}_4^-) = -0,710;$$

$$x_2(\text{C}) = -0,254;$$

$$x_3(\text{NO}_3^-) = 0,982.$$

O ponto estacionário e os respectivos valores de λ ($\lambda_1 = 19,9067$; $\lambda_2 = 89,8652$ e $\lambda_3 = 89,8652$), referentes à concentração de BRS, indicam que esta resposta possui um ponto de mínimo.

Ainda utilizando o algoritmo do *software Maple V release 4*, foi possível identificar as seguintes coordenadas deste ponto de mínimo:

$$X_1(\text{SO}_4^-) = -0,710;$$

$$X_2(\text{C}) = -1,280;$$

$$X_3(\text{NO}_3^-) = 0,982.$$

Empregando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis:

$$X_1 = 1180 \text{ mg/L de } \text{SO}_4^{2-};$$

$$X_2 = 444 \text{ mg/L de C};$$

$$X_3 = 2482 \text{ mg/L de } \text{NO}_3^-.$$

Para ilustrar os efeitos das variáveis na quantificação das BRS, estão apresentadas abaixo as superfícies de resposta relacionando as variáveis duas a duas com a resposta.

As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam as superfícies de resposta mostrando a influência das variáveis duas a duas com a resposta de quantificação de BRS.

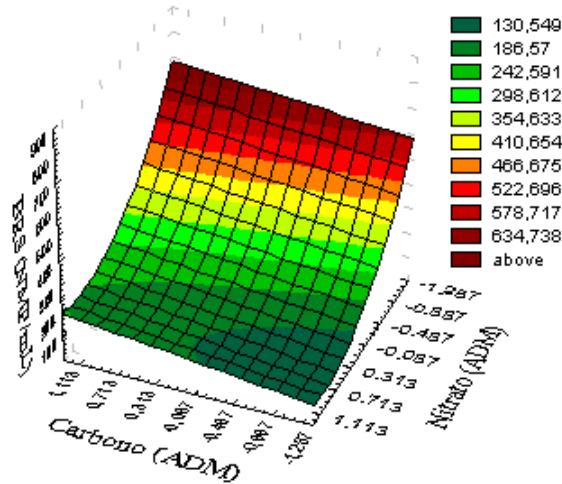


Figura 4.4 - Superfície de resposta para número de BRS em função das concentrações de nitrito e carbono.

Analisando a Figura 4.4, observa-se que para baixas concentrações de carbono, abaixo do ponto central e concentrações de nitrito próximas a 2500 mg/L (ponto +1) o número de BRS é mínimo.

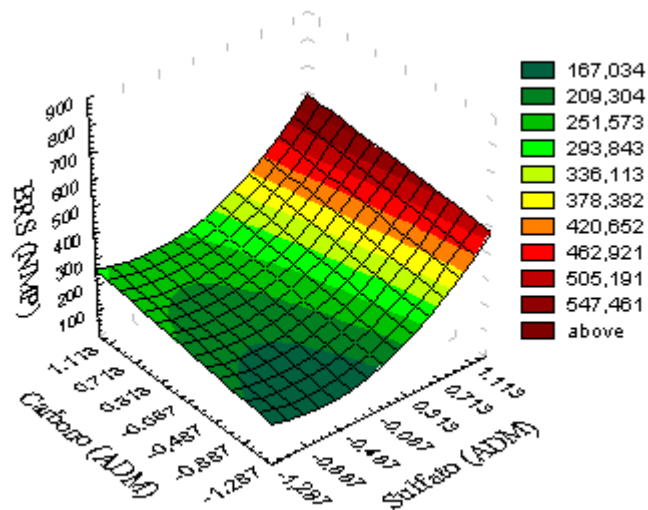


Figura 4.5 - Superfície de resposta para número de BRS em função das concentrações de sulfato e carbono.

Analisando a Figura 4.5, observa-se que o número de BRS diminui para concentrações de sulfato entre o ponto de 1000 e 200 mg/L (-1 e -0,487) e para baixas concentrações de carbono.

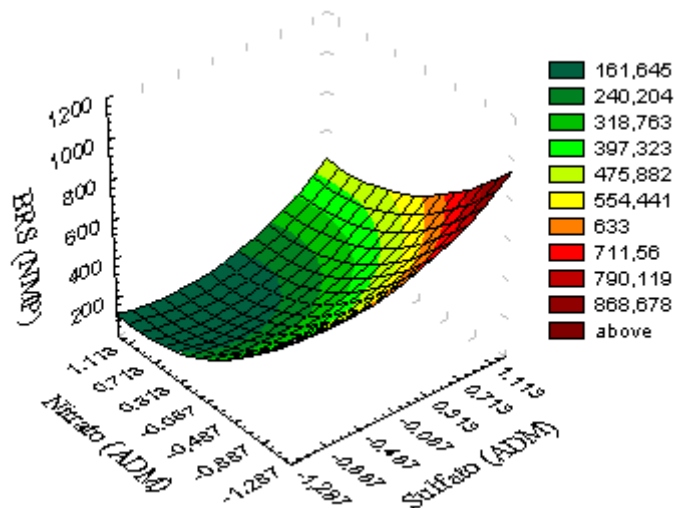


Figura 4.6 - Superfície de resposta para número de BRS em função das concentrações de nitrato e sulfato.

Analisando a Figura 4.6, observa-se que o número de BRS diminui para concentrações de nitrato próximas a 2500 mg/L (ponto +1) e concentrações de sulfato um pouco abaixo do ponto central.

Este trabalho visa reduzir a produção de H_2S , assim, faz-se necessário também avaliar a redução no número de BRS na cultura utilizada. Analisando a Equação 4.5 e as superfícies de resposta, nota-se que a variável que mais influenciou no número de BRS foi a concentração de nitrato. Este resultado também pode ser afirmado nos testes preliminares, em que altas concentrações de nitrato inibiram o crescimento das BRS, favorecendo o desenvolvimento das BRN. Por outro lado, observou-se que a variável que menos contribuiu para a quantificação de BRS foi a concentração de carbono.

Resolvendo numericamente a Equação 4.5, com os valores das variáveis codificadas X_1 , X_2 , e X_3 determinados pela otimização para redução da produção de H_2S , determinou-se o número de BRS igual a 47 NMP/mL, valor inferior aos obtidos experimentalmente (Tabela 4.5). As menores concentrações de BRS foram detectadas nos experimentos (2, 4 e 14), realizados com os valores máximos de nitrato (2500-2750 mg/L), mesmo havendo uma grande variação das concentrações de carbono (1000 a 5000 mg/L) e de sulfato (850 a 2000 mg/L).

Nos experimentos (13, 14 e 15/16) conduzidos sem variação das concentrações de sulfato (2000 mg/L) e carbono (3000 mg/L), a concentração de BRS foi inversamente proporcional ao aumento de nitrato (213 a 2730 mg/L), ou seja, quanto maior a concentração de nitrato adicionada menor o número de BRS. Comportamento idêntico é evidente para os pares 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8, sendo a quantidade de nitrato necessária para redução da carga microbiana dependente das concentrações de carbono e sulfato e da relação entre ambos; mas, em especial, da concentração de sulfato.

Por fim, quando não houve variação das concentrações de carbono (3000 mg/L) e nitrato (1500 mg/L), experimentos 9 e 10, o aumento da concentração de sulfato de 520 para 3480 mg/L favoreceu o crescimento microbiano. O mesmo pode ser observado para os pares 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8, mostrando que a quantidade de nitrato para obtenção das maiores reduções da concentração de BRS esteja condicionada principalmente à concentração de sulfato.

Esses resultados mostram que a concentração de NO_3^- é a variável de maior relevância na inibição do crescimento das BRS, enquanto o teor de carbono pouco interfere, em concordância com a equação ajustada do modelo (Equação 4.5).

4.3.1.3 – BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS ANAERÓBIAS (BHA)

A Tabela 4.8 apresenta a matriz do planejamento (item 3.6) mostrando como resposta a concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias para diferentes concentrações de nitrato, sulfato e carbono.

Tabela 4.8 – Concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias (BHA) em diferentes condições experimentais

Exp.	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	C (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	BHA (NMP/mL)
1	850	1000	500	2,1 x 10 ⁷ ± 0,1 x 10 ⁶
2	850	1000	2500	3,0 x 10 ⁹ ± 0
3	850	5000	500	6,4 x 10 ⁹ ± 0
4	850	5000	2500	9,0 x 10 ⁹ ± 0
5	3150	1000	500	1,1 x 10 ⁷ ± 0
6	3150	1000	2500	2,1 x 10 ⁹ ± 1,0 x 10 ⁸
7	3150	5000	500	4,0 x 10 ⁸ ± 0
8	3150	5000	2500	7,0 x 10 ⁹ ± 0
9	520	3000	1500	7,5 x 10 ⁸ ± 0
10	3480	3000	1500	4,0 x 10 ⁸ ± 0
11	2000	426	1500	2,4 x 10 ⁷ ± 0,5 x 10 ⁶
12	2000	5570	1500	3,3 x 10 ⁹ ± 5,0 x 10 ⁷
13	2000	3000	213	2,1 x 10 ⁷ ± 0,1 x 10 ⁶
14	2000	3000	2730	1,1 x 10 ¹⁰ ± 0
15	2000	3000	1500	5,0 x 10 ⁹ ± 2,0 x 10 ⁸
16	2000	3000	1500	4,0 x 10 ⁹ ± 0

No que concerne às bactérias heterotróficas anaeróbias (BHA) pode-se observar um comportamento distinto comparativamente as BRS. Em todos os experimentos ocorreu aumento do número de BHA, em geral, prevalecendo nas maiores concentrações de nitrato. Esses resultados indicam ser o nitrato favorável ao crescimento das BHA, possivelmente devido à presença das bactérias redutoras de nitrato (BRN). Este grupo bacteriano apresenta espécies facultativas e que, portanto, são capazes de crescer em condição de anaerobiose. Neste caso, estas bactérias realizam a oxidação da matéria orgânica utilizando o nitrato como acceptor final de elétrons, com excreção de nitrito. Em determinadas condições, algumas espécies podem também reduzir o nitrito via hidroxilamina a íon amônio. Existem ainda as bactérias que convertem o nitrato em nitrogênio gasoso (JENNEMAN, 1999).

Segundo Stott (2005), em ambientes onde são encontrados tanto sulfato quanto nitrato, e ambos os grupos de bactérias (BRS e BRN) estão presentes, as BRN serão predominantes. Isto decorre das diferenças de cada metabolismo. Para as BRS, cerca de 10% da matéria orgânica consumida, simultaneamente a redução desassimilativa do sulfato, é transformada em biomassa, enquanto que aproximadamente 35% da matéria orgânica consumida pelas BRN, acoplada a redução do nitrato, gera biomassa (ENERGY INSTITUTE, 2003). Por sua vez, o crescimento mais rápido das BRN acarretará em consumo mais rápido das fontes de carbono por estas, reduzindo a sua disponibilidade para as BRS. Assim sendo, haverá maior produção de biomassa de BRN, desde que não haja limitação de nutriente.

As BRN também podem concorrer para inibição do metabolismo das BRS através da geração de nitrito. Este anion possui a capacidade de elevar o potencial redox (Eh) do meio/ambiente, estabelecendo condição desfavorável para a atividade metabólica das BRS (MADIGAN, 1988). Outra possibilidade pode decorrer da reação do nitrito com o gás sulfídrico, que resulta na oxidação química do sulfeto e, por conseguinte, na elevação do Eh do ambiente (HITZMAN, 1994).

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

$$\text{BHA} = 3,798 \times 10^9 - 3,270 \times 10^8 X_1 + 1,434 \times 10^9 X_2 + 3,010 \times 10^9 X_3 - 1,630 \times 10^9 X_1^2 - 9,741 \times 10^8 X_2^2 + 1,349 \times 10^9 X_3^2 - 1,539 \times 10^8 X_1 X_2 - 3,439 \times 10^8 X_1 X_3 + 1,249 \times 10^9 X_2 X_3 \quad (4.6)$$

A Tabela 4.9 a seguir apresenta os resultados obtidos para a regressão múltipla da quantificação de bactérias heterotróficas anaeróbias.

Nesta regressão foram eliminados os parâmetros com nível de significância superior a 10%. Assim, foram desprezados os termos: concentração de carbono (X_1) e as interações sulfato/carbono ($X_1 X_2$) e sulfato/nitrato ($X_1 X_3$).

Tabela 4.9 - Resultados da regressão múltipla da quantificação de bactérias heterotróficas anaeróbias.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	$3,798 \times 10^9$	0,000471
X_2 (C)	$1,434 \times 10^9$	0,003479
X_3 (NO_3^-)	$3,011 \times 10^9$	0,000017
X_1^2 (SO_4^{2-}) ²	$-1,630 \times 10^9$	0,012548
X_2^2 (C) ²	$-9,741 \times 10^9$	0,096225
X_3^2 (NO_3^-) ²	$1,349 \times 10^9$	0,030082
X_2X_3 (C. NO_3^-)	$1,249 \times 10^9$	0,018333
$R^2 = 0,92$	$F_C = 18,554$	$F_T(0,01) = 5,80$

A Tabela 4.9 apresenta as variáveis que influenciam na concentração de BHA. O coeficiente de correlação (R^2) determinado (0,92) indica que 92% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação.

O resultado de F calculado (F_C) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 1%. O resultado do teste F mostrou que o modelo apresenta 99% de confiança.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, obtém-se a seguinte equação:

$$\text{BHA}10^{-9} = 3,798 + 1,434X_2 + 3,0X_3 - 1,630X_1^2 - 0,9741X_2^2 + 1,349X_3^2 + 1,249X_2X_3 \quad (4.7)$$

Empregando a equação completa (Eq. 4.6) e utilizando um algoritmo (*software Maple V release 4*), foram calculadas as coordenadas do ponto estacionário para a concentração de BHA:

$$x_1 = 0,0168;$$

$$x_2 = 0,0164;$$

$$x_3 = -1,1214.$$

Estes pontos estacionários estão dentro da região experimental e, junto com os respectivos valores de λ ($-1,643 \times 10^9$; $-1,129 \times 10^9$ e $1,517 \times 10^9$), referentes à concentração de BHA, indicaram que esta resposta possui um ponto de sela.

Ainda usando o algoritmo do *software Maple V release 4*, calculou-se os valores de X correspondentes à maximização da resposta para o crescimento de BHA, utilizando a forma canônica $Y = Y_0 - \lambda_1 w_1^2 - \lambda_2 w_2^2 + \lambda_3 w_3^2$. Para maximizar a resposta os termos $\lambda_1 w_1^2$ e $\lambda_2 w_2^2$ foram zerados e, atribuiu-se um valor para w_3 tal que Y fosse o maior possível. Substituindo os valores de λ na equação canônica, obtém-se:

$$Y = 65,77 - 1,64 \cdot 10^9 W_1^2 - 1,13 \cdot 10^9 W_2^2 + 1,52 \cdot 10^9 W_3^2 \quad (4.8)$$

As variáveis codificadas no ponto de otimização, consideradas as premissas acima delineadas, são:

$$X_1 = -0,013;$$

$$X_2 = 1,13;$$

$$X_3 = 1,279.$$

Utilizando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtém-se os valores reais das concentrações para cada uma das variáveis:

$$X_1 = 1993 \text{ mg/L de } \text{SO}_4^{2-};$$

$$X_2 = 5260 \text{ mg/L de C};$$

$$X_3 = 2779 \text{ mg/L de } \text{NO}_3^-.$$

Para ilustrar os efeitos das variáveis com relação ao número de BHA, estão apresentadas nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 as superfícies de resposta relacionando as três variáveis, duas a duas, com a resposta.

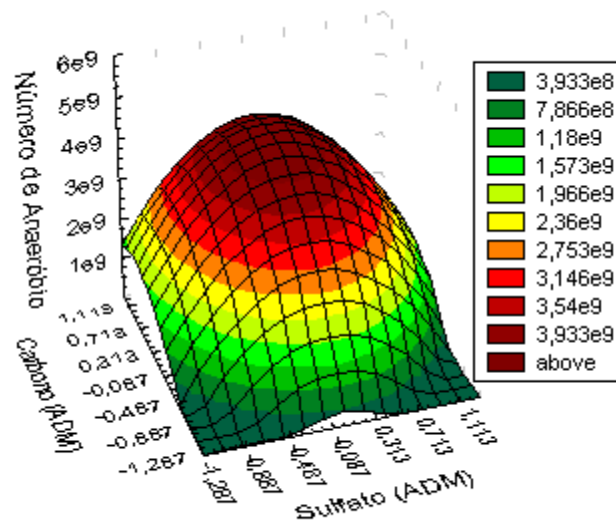


Figura 4.7- Superfície de resposta para número de bactérias heterotróficas anaeróbias em função das concentrações de sulfato e carbono.

Observa-se que para concentrações de carbono próximas de 5000 mg/L (ponto + 1) e concentrações de sulfato próximas do ponto central, o número de BHA aumenta.

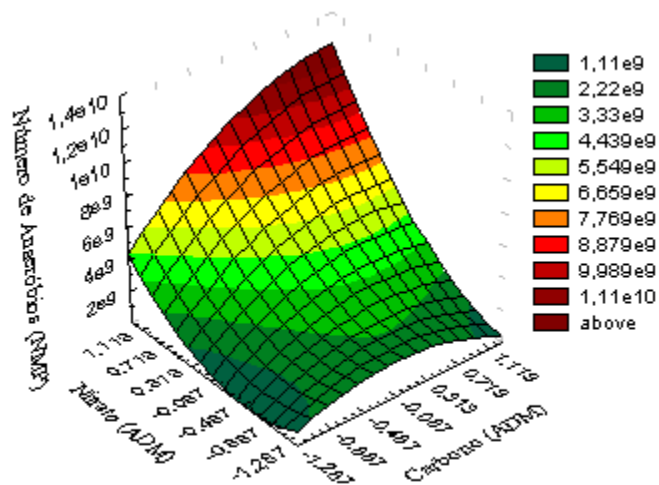


Figura 4.8: Superfície de resposta para número de bactérias heterotróficas anaeróbias em função das concentrações de carbono e nitrato.

Analisando a Figura 4.9, observa-se que altas concentrações de nitrato e concentrações próximas ao ponto central de sulfato aumentam o número de BHA.

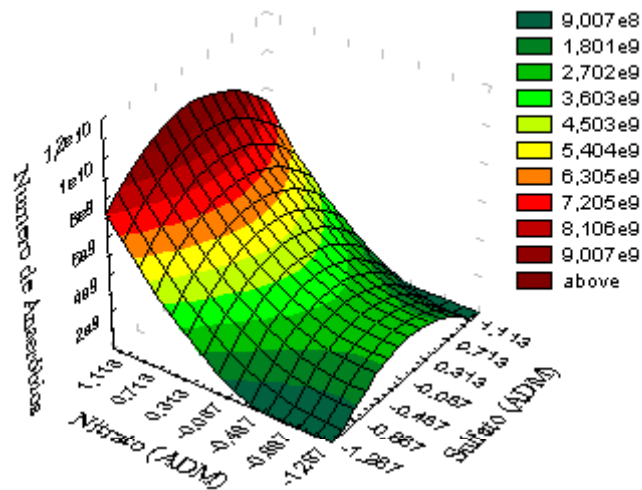


Figura 4.9 - Superfície de resposta para número de bactérias heterotróficas anaeróbicas em função das concentrações de sulfato e nitrato.

A Tabela 4.8 mostra que a condição do experimento 14 foi a mais favorável ao crescimento de BHA. Em contrapartida, neste experimento foi detectado o menor número de BRS (Tabela 4.6). Conforme previsto, altas concentrações de nitrato induziram o maior crescimento de BRN, causando a inibição das BRS.

Nas condições experimentais (1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14) onde as concentrações de sulfato e carbono foram mantidas constantes, constata-se que o aumento da concentração de BHA foi diretamente proporcional ao aumento de nitrato.

Nos experimentos onde apenas a concentração de carbono foi variada, as respostas foram muito diferenciadas em função da concentração de nitrato. Em baixos valores de nitrato (500 mg/L) e sulfato (850 mg/L), o crescimento de BHA foi estimulado pelo aumento da quantidade de carbono (par 1 e 3), mas na concentração de sulfato de 3150 mg/L (par 5 e 7), um aumento substancial da concentração de carbono promoveu menor elevação do número de células. Para altos valores de nitrato (2500 mg/L), a concentração celular foi tanto maior quanto maior a adição de carbono, não sendo afetada pelo aumento da quantidade de sulfato de 850 para 3150 mg/L (pares 2 e 4; 6 e 7). Comparando as concentrações de BHA correspondentes aos experimentos (9 e 10; 11 e 12) fica patente a relevância das concentrações de carbono e nitrato para o crescimento deste grupo, enquanto a quantidade de sulfato é pouco representativa. Esses resultados estão em consonância com a Equação 4.7.

4.3.1.4 – CONSUMO DE SULFATO

A Tabela 4.10 apresenta as concentrações de sulfato consumido nas condições do planejamento experimental.

Tabela 4.10 – Consumo de sulfato nas condições experimentais estudadas

Exp.	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	C (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	Sulfato consumido (mg/L)
1	850	1000	500	126,1
2	850	1000	2500	45,2
3	850	5000	500	142,6
4	850	5000	2500	53,2
5	3150	1000	500	159,2
6	3150	1000	2500	93,9
7	3150	5000	500	242,7
8	3150	5000	2500	152,4
9	520	3000	1500	79,7
10	3480	3000	1500	162,1
11	2000	426	1500	65,4
12	2000	5570	1500	75,5
13	2000	3000	213	210,8
14	2000	3000	2730	28,9
15	2000	3000	1500	69,2
16	2000	3000	1500	65,4

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

$$\begin{aligned}
 \text{SO}_4^{2-}{}_{\text{cons.}} = & 69,884 + 34,222X_1 + 15,867X_2 - 49,502X_3 + 29,639X_1^2 - 0,8192X_2^2 + 29,005X_3^2 \\
 & - 14,6875X_1X_2 + 1,8375X_1X_3 - 4,1875X_2X_3
 \end{aligned}
 \quad (4.9)$$

A Tabela 4.11 apresenta os resultados obtidos para a regressão múltipla da concentração de sulfato, na qual foram eliminados os parâmetros com nível de significância

superior a 10%. Assim, foram desprezados o termo quadrático da concentração de carbono e as interações concentração de sulfato/concentração de nitrato e concentração de carbono /concentração de nitrato.

Tabela 4.11 – Resultados da regressão múltipla para a concentração de sulfato consumido

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	69,3049	0,000033
X_1 (SO_4^-)	34,224	0,000148
X_2 (C)	15,8670	0,017523
X_3 (NO_3^-)	-49,5022	0,000008
X_1^2 (SO_4^-) ²	29,6388	0,0504373
X_3^2 (NO_3^-) ²	29,0049	0,004953
$X_1 X_2$ ($\text{SO}_4^- \cdot \text{C}$)	14,6875	0,502226
$R^2 = 0,95$	$F_C = 27,108$	$F_T(0,01) = 5,80$

A Tabela 4.11 mostra as variáveis que influenciam no consumo de sulfato e o valor do coeficiente de correlação (R^2), que indica que 95% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, obtém-se a seguinte equação:

$$\text{SO}_4^-_{\text{cons}} = 69,884 + 34,222X_1 + 15,867X_2 - 49,502X_3 + 29,639X_1^2 + 29,005X_3^2 - 14,6875X_1X_2 \quad (4.10)$$

As coordenadas do ponto estacionário para o consumo de sulfato, calculadas a partir da equação completa (Eq. 4.9) e pelo uso do algoritmo do *software Maple realese 4*, são:

$$x_1 = -1,118;$$

$$x_2 = 1,630;$$

$$x_3 = 0,771.$$

As coordenadas do ponto estacionário e os respectivos valores de λ (-2,762; 27,361 e 30,227), referentes ao consumo de SO_4^- , indicam que esta resposta possui um **ponto de Sela**. Substituindo os valores dos λ na equação canônica, tem-se:

$$Y = 70,80 - 2,763 W_1^2 + 27,36W_2^2 + 30,226W_3^2 \quad (4.11)$$

Utilizando o algoritmo do *software Maple realese 4*, foram calculadas as coordenadas deste ponto de mínimo, sendo elas:

$$X_1(\text{SO}_4^{\bar{}}) = -0,322;$$

$$X_2(\text{C}) = -1,280;$$

$$X_3(\text{NO}_3^{\bar{}}) = 0,783.$$

Aplicando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtém-se os valores reais das concentrações das variáveis:

$$X_1 = 1629 \text{ mg/L de SO}_4^{\bar{}};$$

$$X_2 = 444 \text{ mg/L de C};$$

$$X_3 = 2283 \text{ mg/L de NO}_3^{\bar{}}.$$

As Figuras 4.10, 4.11 e 4.12 ilustram através das superfícies de resposta os efeitos das variáveis no consumo de sulfato.

Analisando a Figura 4.10, observa-se que o consumo de sulfato é mínimo para baixas concentrações de carbono e de sulfato um pouco abaixo do ponto central do planejamento.

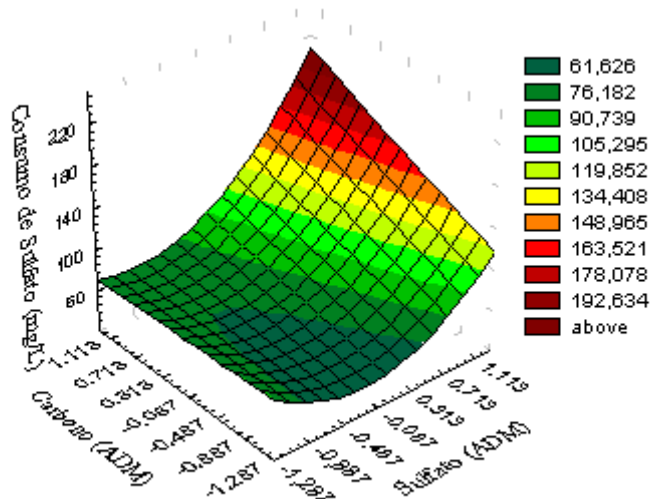


Figura 4.10 - Superfície de resposta para o consumo de sulfato em função das concentrações de carbono e sulfato.

De acordo com as Figuras 4.11 e 4.12, houve um baixo consumo de sulfato para concentrações de sulfato abaixo do ponto central e altas concentrações de nitrato.

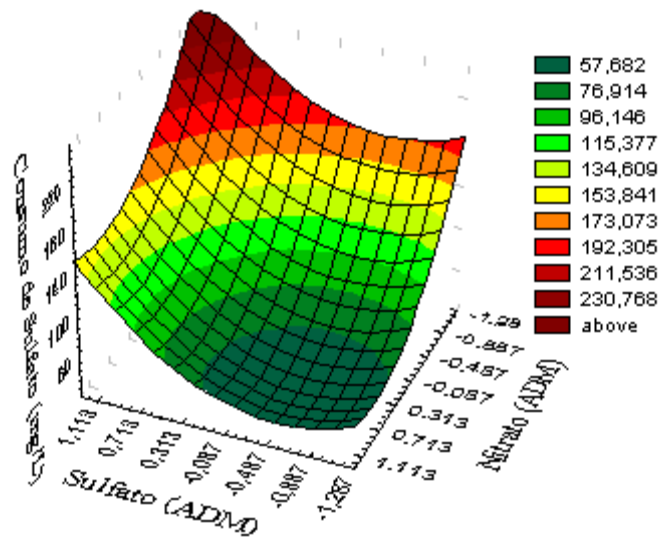


Figura 4.11 – Superfície de resposta para o consumo de sulfato em função das concentrações de nitrato e sulfato.

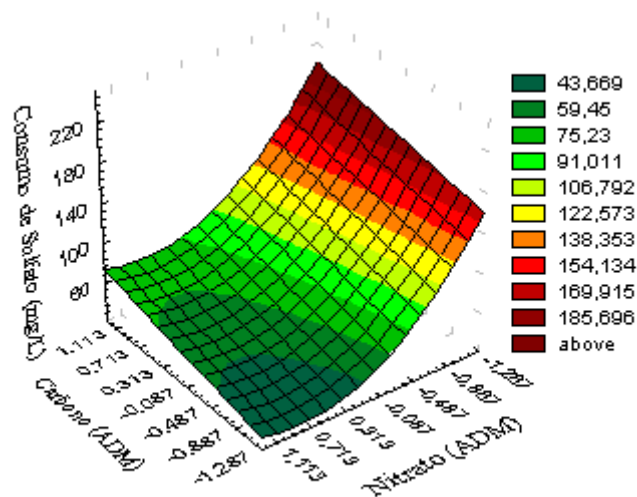


Figura 4.12 – Superfície de resposta para o consumo de sulfato em função das concentrações de nitrato e carbono.

O maior efeito da concentração de nitrato, mostrado na Equação 4.10 do modelo ajustado, pode ser explicado pelo favorecimento da atividade das BRN, visto ser o seu

metabolismo energeticamente mais favorável do que o consumo de sulfato pelas BRS. A redução microbiana anaeróbica do nitrato fornece 3 vezes mais energia que a redução desassimilativa do sulfato. Mesmo havendo presença de sulfato, o nitrato será preferencialmente consumido, propiciando o domínio das BRN e, conseqüentemente, inibindo o metabolismo das BRS, impedindo assim a geração de H_2S a partir da redução de sulfato.(POSTGATE, 1984 MOURA et al., 1997; MAXWELL, 2003; www.bio.ulcagary.ca.2004)

O menor consumo de sulfato foi observado no experimento 14, no qual verificou-se também a menor produção de H_2S (Tabela 4.3), menor quantidade de BRS (Tabela 4.5) e maior número de BHA (Tabela 4.7). Esse comportamento comprova que a produção de H_2S e o consumo de sulfato estão relacionados com a atividade das BRS. Neste experimento verifica-se também uma alta concentração de nitrato para valores de concentração de sulfato e de carbono no ponto central.

Analisando os pares de experimentos, onde os valores de duas variáveis foram mantidos constantes, no ponto central, e a outra variável teve seu valor alterado nos seus limites, nota-se que para:

- par 11 e 12 (aumento da concentração de carbono) - consumo de sulfato aumenta cerca de 15%;
- par 14 e 13 (redução da concentração de nitrato) - aumento de 629%;
- par 9 e 10 (aumento da concentração de sulfato) - aumento superior a 100%.

Estes resultados confirmam as indicações dadas pelos gráficos das superfícies de resposta, bem como os resultados da Tabela 4.10 e os da Equação 4.10 do modelo ajustado, o qual define ser principalmente a variável X_3 relacionada com o maior consumo de sulfato.

Substituindo as variáveis codificadas no ponto de otimização de mínima produção de H_2S no modelo ajustado da equação de consumo de sulfato (Equação 4.10), obtém-se o valor de 22,48 mg/L. O consumo de sulfato no experimento 14 foi de 28,9 mg/L, que está muito próximo ao valor da otimização para minimização do consumo de sulfato. Na reprodução do experimento 14 na ausência de nitrato houve o consumo de 630 mg/L de sulfato, um valor bem superior ao determinado no teste original, provando assim que as BRS não consomem sulfato na presença de nitrato, quer seja por consumirem preferencialmente nitrato, quer seja pela indisponibilidade da fonte de carbono em virtude do metabolismo mais intenso das BRN.

4.3.1.5 – CONSUMO DE NITRATO

A Tabela 4.12 apresenta os resultados do consumo de nitrato nas condições de cada experimento do planejamento.

Tabela 4.12 – Resultados do consumo de nitrato, nas condições de cada experimento.

Exp.	$SO_4^{=}$ (mg/L)	C (mg/L)	NO_3^- (mg/L)	Nitrato consumido (mg/L)
1	850	1000	500	484,8
2	850	1000	2500	1964,2
3	850	5000	500	481,5
4	850	5000	2500	2105,9
5	3150	1000	500	475,9
6	3150	1000	2500	2038,6
7	3150	5000	500	487
8	3150	5000	2500	2209,9
9	520	3000	1500	1094,2
10	3480	3000	1500	1103,2
11	2000	426	1500	932,4
12	2000	5570	1500	1307,7
13	2000	3000	213	192,8
14	2000	3000	2730	2010,9
15	2000	3000	1500	1023,7
16	2000	3000	1500	1077,7

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

$$NO_3^- \text{ cons} = 998,97 + 16,83X_1 + 71,05X_2 + 771,63X_3 + 84,36X_1^2 + 96,34X_2^2 + 85,36X_3^2 + 5,50X_1X_2 + 22,72X_1X_3 + 38,15X_2X_3 \quad (4.12)$$

Na Tabela 4.13, encontram-se os resultados da regressão múltipla para as variáveis que influenciam no consumo de nitrato. Analisando esta tabela, constata-se que altas

concentrações de nitrato influenciam sensivelmente o consumo deste ânion pelos microrganismos. O coeficiente de correlação (R^2) obtido (98%) indica que a variabilidade dos dados foi explicada pela equação.

Tabela 4.13 – Resultados da regressão múltipla para o consumo de nitrato

Fatores	Parâmetros	Nível de Significância (p)
Constante (β_0)	998,9683	0,000000
X_2 (C)	71,0536	0,026036
X_3 (NO_3^-)	771,6341	0,000000
X_1^2 (SO_4^{2-}) ²	84,3611	0,056250
X_2^2 (C) ²	96,3452	0,03381
X_3^2 (NO_3^-) ²	85,3573	0,05388
$R^2 = 0,98$	$F_C = 165,16$	$F_T(0,01) = 5,64$

De modo a eliminar as variáveis com nível de significância do teste t de Student superior a 10%, foram desprezadas a variável linear X_1 , a variável quadrática X_3^2 e todas as interações. A equação ajustada pode ser definida como segue:

$$\text{NO}_3^- \text{ cons} = 998,97 + 71,05X_2 + 771,63X_3 - 84,36X_1^2 - 96,34X_2^2 + 85,36X_3^2 \quad (4.13)$$

Utilizando a equação completa (Eq. 4.12) e aplicando o *software Maple V release 4*, foram calculadas as coordenadas do ponto estacionário para o consumo de NO_3^- :

$$x_1 = 0,5169;$$

$$x_2 = 0,5493;$$

$$x_3 = -4,711.$$

O ponto estacionário e os respectivos valores de λ ($\lambda_1 = 67,355$; $\lambda_2 = 85,090$ e $\lambda_3 = 113,617$), referentes ao consumo de NO_3^- , indicam que esta resposta possui um ponto de mínimo.

Ainda utilizando o algoritmo do software *Maple V release 4*, foi possível identificar as coordenadas do ponto de mínimo, sendo elas:

$$X_1(\text{SO}_4^{2-}) = 0,013;$$

$$X_2(\text{C}) = -0,387;$$

$$X_3(\text{NO}_3^-) = -1,280.$$

Os valores reais das concentrações das variáveis obtidos a partir das equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4) são:

$$X_1 = 2015 \text{ mg/L de SO}_4^{2-};$$

$$X_2 = 2226 \text{ mg/L de C};$$

$$X_3 = 220 \text{ mg/L de NO}_3^-.$$

As Figuras 4.13, 4.14 e 4.15 mostram as superfícies de resposta relacionando as variáveis ao consumo de nitrato.

Analisando a Figura 4.13, observa-se que para concentrações de carbono e sulfato próximas do ponto central do planejamento, o consumo de nitrato é mínimo. Para obter altos consumos de nitrato devem ser utilizadas altas concentrações de nitrato ($+\alpha$), independente da concentrações de sulfato e carbono (Figuras 4.14 e 4.15)

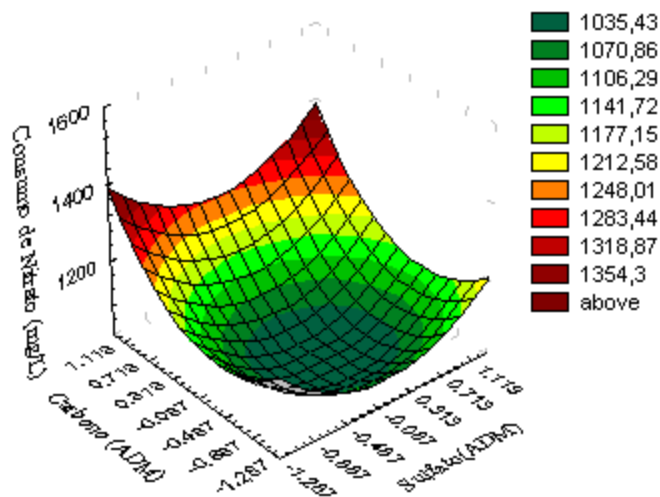


Figura 4.13- Superfície de resposta para o consumo de nitrato em função das concentrações de sulfato e carbono.

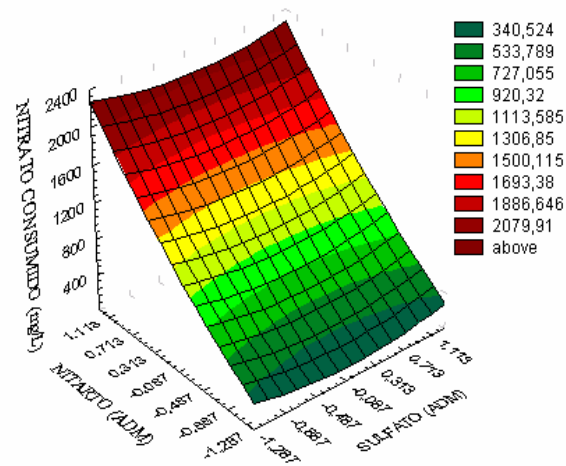


Figura 4.14- Superfície de resposta para o consumo de nitrato em função das concentrações de nitrato e sulfato.

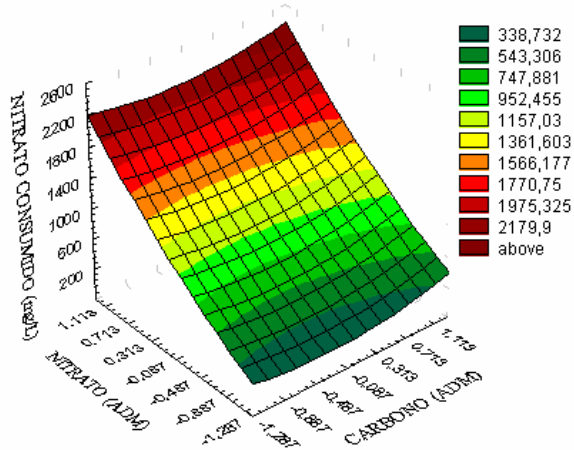


Figura 4.15- Superfície de resposta para o consumo de nitrato em função das concentrações carbono e nitrato.

O nitrato foi usado neste planejamento para inibir o crescimento das BRS e, desta forma, minimizar a produção de H_2S . Apesar do ponto encontrado pelo algoritmo ser ponto de mínimo, o interessante seria a condição de maior consumo de nitrato, a fim de garantir a premissa deste estudo.

Os maiores consumos de nitrato (2010-2200 mg/L) foram obtidos nas condições dos experimentos 4, 6, 8 e 14, onde foram usadas altas concentrações de nitrato (2500-2700 mg/L) e variadas concentrações de sulfato (850-3400 mg/L) e carbono (1000-5500 mg/L). Considerando o consumo de nitrato superior a 80% e, que nestas condições, a concentração de BRS foi baixa enquanto a de BRN foi alta, pode-se presumir que a redução do nitrato foi decorrente da atividade metabólica de BRN.

A análise dos experimentos aos pares, de modo a contemplar a alteração de apenas uma das três variáveis, entre os seus valores limites, enquanto as demais são mantidas constantes, permite fazer as seguintes considerações:

- par 9 e 10 (aumento da concentração de sulfato) – pequena variação do consumo de nitrato;
- par 11 e 12 (aumento da concentração de carbono) – aumento de 40% no consumo de nitrato;
- par 13 e 14 - (aumento da concentração de nitrato)

Esses resultados vem confirmar as observações das superfícies de resposta (Figuras 4.13, 4.14 e 4.15), bem como os resultados da Tabela 4.12 e da equação do modelo ajustado (Equação 4.13), que indica ser o consumo de nitrato diretamente dependente da variável X_3 (concentração de nitrato), seguido de um pequeno efeito da variável X_2 (concentração de carbono), e que a variação na concentração de sulfato, dentro da faixa experimental estudada, não foi significativa.

4.3.1.6 – RESUMO DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO

Na Tabela 4.14 estão relacionados os pontos de minimização e maximização das respostas: produção de H_2S , concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias (BHA), concentração de bactérias redutoras de sulfato (BRS), consumo de nitrato e consumo de sulfato.

Pode-se observar que altas concentrações de nitrato favoreceram a atividade das BHA, inibindo o crescimento das BRS e, conseqüentemente, diminuindo o consumo de sulfato e a produção de sulfeto. Os pontos de otimização para a minimização de produção de H_2S , de consumo de sulfato e de número de BRS, estão bastante próximos, indicando que o crescimento de BRS está relacionado com a redução do sulfato e conseqüente produção de

H₂S. Nota-se também que a seqüência de eventos é característica da atividade de BRN, fazendo crer que grande parte da população de BHA é formada por BRN.

Tabela 4.14 – Resumo dos pontos de maximização e minimização das respostas

Variável	X ₁ Concentração de SO ₄ ²⁻ (mg/L)	X ₂ Concentração de C (mg/L)	X ₃ Concentração de NO ₃ ⁻ (mg/L)
Produção de H ₂ S (mínimo)	1616	444	2262
Concentração de BRS (mínimo)	1180	444	2482
Concentração de BHA (máximo)	1993	5260	2779
Consumo de nitrato (mínimo)	2015	2226	220
Consumo de sulfato (mínimo)	1629	444	2283

As Equações 4.2, 4.5, 4.10 e 4.13 dos modelos ajustados mostram que a concentração de carbono, pelo menos dentro dos limites considerados, não tem efeito expressivo nas respostas, de modo que, tanto em altas como em baixas quantidades de carbono, o consumo de nitrato foi alto, ainda que a produção de sulfeto, o crescimento de BRS e o consumo de sulfato tenham sido baixos.

As Equações 4.2, 4.5 e 4.10 mostram que altas concentrações de sulfato favorecem o crescimento das BRS, o consumo de sulfato e, portanto, a produção de sulfeto, o que é contra-indicado quando o propósito é a redução da geração de sulfeto. Atualmente, este é um problema crucial da indústria petrolífera já que o *souring* biogênico é a causa de uma série de fenômenos, podendo-se citar: a redução da produtividade dos poço; o aumento do custo de produção, em função da necessidade do uso de materiais mais nobres e resistentes nas operações; a redução da qualidade dos hidrocarbonetos produzidos; entre outros (KANE, 1997).

A reprodução do teste 14, na ausência de nitrato, conduziu a um aumento do crescimento das BRS, consumo de sulfato e produção de sulfeto.. A escolha do teste 14 para

reprodução teve como critério selecionar a condição de menor produção de H₂S, e que ainda fosse próxima da condição de otimização encontrada pelo software para a redução na produção de sulfeto.

4.4. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE H₂S.

Este experimento foi realizado visando verificar a influência da concentração de carbono em duas condições bastante distintas: valor otimizado no PCC (444 mg/L) e um valor bem superior (10000 mg/L), de forma a simular uma condição com alta concentração de carbono. As concentrações de sulfato e nitrato foram estabelecidas de acordo com a otimização realizada para a minimização da produção de sulfeto, sendo 1616 mg/L e 2262 mg/L, respectivamente.

A Tabela 4.15 mostra as determinações químicas e microbiológicas dos testes realizados nas duas diferentes concentrações de carbono, após 28 dias de incubação.

Tabela 4.15 – Valores finais dos testes realizados em distintas concentrações de carbono

Carbono (mg/L)	NO₃⁻ residual (mg/L)	NO₂⁻ (mg/L)	SO₄⁼ (mg/L)	H₂S (mg/L)	BRS (NMP/mL)	BHA (NMP/mL)
444	377,1	196	1570	8,2	30	9,5 x 10 ⁸
10000	40,3	40	1600	0,0	0,0	1,1 x 10 ¹⁰

Conforme observado no planejamento experimental, a concentração de carbono pouco influenciou na produção de H₂S, isto significa que efluentes com cargas orgânicas bem distintas podem ser tratados com as mesmas condições de concentração de nitrato visando obter menor produção de sulfeto.

O consumo de nitrato, diretamente proporcional à quantidade de carbono, em conformidade com o aumento da população de BHA, e a detecção de nitrito são um indício da presença de BRN. Experimentos realizados com água de formação mostraram que só houve redução dos níveis de sulfeto quando a aplicação de nitrato foi realizada na presença de uma população de BRN (DAVIDOVA *et al.*, 2001). Segundo os autores, o controle da geração de H₂S biogênico através da aplicação do nitrato depende principalmente da presença de uma

população ativa de BRN. Esta observação dá respaldo à suposta presença de uma população de BRN no consorcio microbiano utilizado neste trabalho.

A quantidade de nitrato adicionada foi suficiente para controlar a geração de H₂S nas duas condições testadas. Inclusive, foi capaz de praticamente eliminar a população de BRS.

Como já mencionado, algumas espécies de BRS podem alterar respiração desassimilativa do sulfato pela do nitrato quando concentrações ilimitadas tanto de sulfato quanto de nitrato estão presentes (DUNSMORE, *et al.* 2004). Neste trabalho, tal fato não ocorreu visto que aliada à ausência de crescimento, não houve consumo de sulfato e, logicamente, também não ocorreu geração de H₂S.

4.5. EFEITO DA ADIÇÃO INTERMITENTE DE NITRATO NA BIOGÊNESE DE H₂S

Neste estudo foi avaliado o comportamento da cultura microbiana em cultivos conduzidos com adições intermitentes de nitrato. Os experimentos foram realizados em quatro etapas, num período total de 34 dias, conforme descrito no Capítulo 3 (item 3.8).

A Tabela 4.16e a Figura 4.17 mostram os resultados obtidos para concentração residual de nitrato durante a primeira etapa do teste, com duração de 10 dias.

Tabela 4.16 - Resultados obtidos na primeira etapa após cinco adições de 500 mg/L de nitrato, a cada 2 dias

Tempo (dias)	NO ₃ ⁻ residual (mg/L)*	NO ₃ ⁻ consumido (mg/L)	NO ₂ ⁻ (mg/L)	SO ₄ ⁼ residual (mg/L)	H ₂ S (mg/L)	Taxa de consumo de NO ₃ ⁻ (mg/L.dia)
0	---	0	0	1600 ± 20	0	----
2	0 ± 0	500	90 ± 10	1590 ± 23	0	250
4	50 ± 2	450	86 ± 8	1585 ± 25	0	238
6	140 ± 3	410	100 ± 10	1603 ± 10	0	227
8	270 ± 5	370	88 ± 15	1593 ± 15	0	216
10	480 ± 15	290	95 ± 7	1607 ± 5	0	202

* A determinação da concentração de nitrato residual foi feita antes da adição de nova carga.

O consumo de nitrato foi total nos primeiros dois dias, seguido de um gradual decréscimo que refletiu em acúmulo de nitrato nos reatores, ao longo do tempo de operação.

Este comportamento pode estar relacionado à formação de algum intermediário metabólico capaz de inibir a atividade das BRN.

Não houve equivalência entre as concentrações de nitrato consumido e de nitrito formado. A menor quantidade de nitrito residual pode ser atribuída à sua posterior redução com formação de amônia, ou ainda à conversão do nitrato em gás nitrogênio ou em óxido nitroso, por atividade das bactérias desnitrificantes (ENERGY INSTITUTE, 2003). A desnitrificação ocorre por ação microbiana, na presença de matéria orgânica e em ambientes desprovidos de oxigênio, havendo formação de nitrito, óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N₂O), como metabólitos intermediários. A proporção dos produtos da desnitrificação depende dos microrganismos desnitrificantes e das condições ambientais. Na verdade, o nitrato pode estar presente indefinidamente em um sistema, caso a redução do nitrato ou a desnitrificação não ocorra.

Ao longo do período experimental, o nitrito sempre foi detectado e em quantidades semelhantes, em torno de 90 mg/L, possivelmente devido à redução do nitrito a N₂. Por outro lado, o acúmulo de nitrato no meio pode ser atribuído à inibição da enzima *nitrato redutase* (NR) pela presença de nitrito e de compostos nitrogenados reduzidos como a amônia. A enzima NR está envolvida na redução de nitrato em nitrito que, em seguida, pode ser reduzido à amônia pela enzima *nitrito redutase* (NiR).

Analogamente ao sucedido nos experimentos anteriormente realizados, não foi detectada a presença de BRS ao final da primeira etapa, apesar da sua concentração inicial de $1,8 \times 10^6$ NMP/mL. Estes resultados, aliados à ausência de consumo de sulfato e produção de H₂S, demonstram a inibição das BRS pela aplicação de 500 mg/L nitrato, em pulsos. Por outro lado, a concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias, inicialmente de $9,5 \times 10^5$ NMP/mL, atingiu $2,7 \times 10^{11}$ NMP/mL. Provavelmente, o aumento do número de BHA foi decorrente do desenvolvimento das BRN. O crescimento das BHA em detrimento das BRS denota a competição das duas populações microbianas pelo substrato, conforme referido por alguns autores (GARBOSSA, 2003) Neste caso, as bactérias continuam ativas apesar de haver a prevenção da produção de H₂S.

De acordo com Reinsel *et al.* (1996), 0,71 mg de nitrato foram rapidamente reduzidos por população microbiana nativa, suprimindo a redução do sulfato. O nitrito foi percebido em concentrações proporcionais às adicionadas de nitrato. A adição de nitrito foi mais efetiva no controle do *souring* do que glutaraldeído, se bem que o tratamento por aplicações em pulsos tenha sido melhor do que de forma contínua. A partir destes resultados, os autores concluíram que o nitrito foi o principal agente responsável pela inibição das BRS.

A inibição do crescimento de BRS pela formação de nitrito também é descrita pela empresa norueguesa Statoil que faz uso da aplicação de nitrato em poços de produção há vários anos

A taxa de consumo de nitrato sofreu gradativamente pequenos decréscimos durante os dez dias de operação, conforme mostra a Tabela 4.16. A taxa média de consumo de nitrato nos dez dias de operação foi de 216 mg/L.dia.

Observa-se na Figura 4.16 que as concentrações de nitrato, consumido e residual, apresentaram variação exponencial com o tempo de operação. De modo que, visando estudar as causas da redução no consumo de nitrato, foi dado prosseguimento ao experimento.

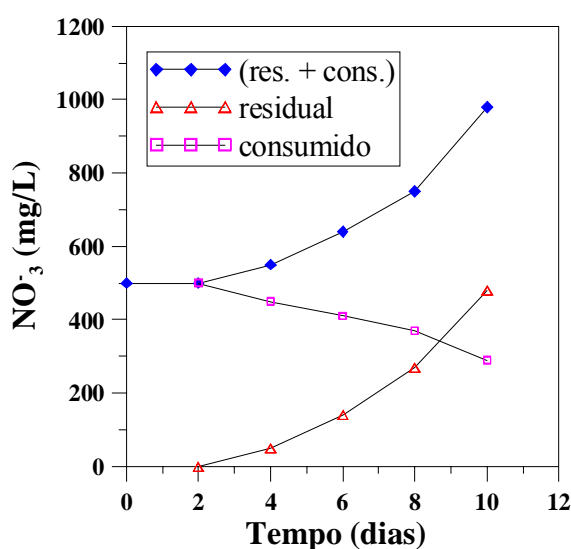


Figura 4.16. **Variação da concentração de nitrato durante a primeira etapa experimental.**

A etapa seguinte teve como finalidade avaliar se o consumo de nitrato, ou seja, o crescimento das BRN, foi limitado pela eventual depleção da fonte de carbono. Assim, após o décimo dia de operação, teve início a segunda etapa com a adição 1000 mg/L de carbono aos sistemas, voltando desta maneira o meio reacional à condição inicial em termos de concentração de carbono. A Tabela 4.17 mostra os resultados obtidos após a correção da concentração de carbono.

Observa-se que do décimo ao décimo quinto dia, isto é, decorridos 5 dias da adição de carbono, o consumo de nitrato se manteve inalterado. Porém, ocorreu uma brusca redução no número de bactérias heterotróficas anaeróbicas de $2,7 \times 10^{11}$ para $2,1 \times 10^8$ NMP/mL (Figura 4.17). Este comportamento pode estar relacionado à readaptação dos microrganismos às novas condições de cultivo visto que, logo a seguir, houve um aumento gradual do consumo de nitrato. A concentração de bactérias heterotróficas anaeróbicas condiz com o valor

definido pelo planejamento experimental, da ordem de 10^9 NMP/mL (Tabela:4.8). Observando a Figura 4.17, verifica-se a tendência do crescimento das BHA, em conformidade com o aumento do consumo de nitrato (Tabela 4.17), apesar do aumento do teor de nitrito.

A redução da concentração de nitrito entre o décimo e o décimo sétimo dia, sem consumo de nitrato, provavelmente está relacionada à redução parcial do nitrito a NH_3 ou sua desnitrificação, com geração de N_2 , que continua ocorrendo devido a instabilidade do mesmo

Tabela 4.17 – Resultados obtidos na segunda etapa, com adição de 1000 mg/L de carbono.

Tempo (dias)	NO_3^- residual (mg/L)	NO_3^- consumido (mg/L)	NO_2^- (mg/L)	SO_4^- (mg/L)	H_2S (mg/L)	Taxa de consumo de NO_3^- (mg/L.dia)
10	480*± 15	----	95*±7	1607*±5	0	----
15	500 ± 10	0 ± 10	50±10	1600 ± 20	0	0
17	450 ± 8	30 ± 8	53 ± 10	1590 ± 23	0	3,5
20	390 ± 8	60 ± 8	97 ± 12	1585 ± 25	0	8,5
25	302 ± 5	88 ± 5	96 ± 10	1603 ± 10	0	13
30	112 ± 3	101 ± 5	190 ± 5	1593 ±14	0	19

Valores referentes ao último dia da primeira etapa, e iniciais da segunda etapa.

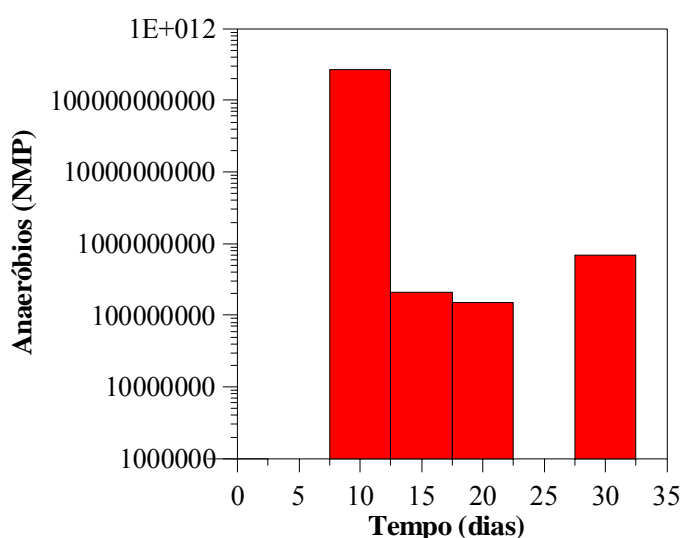


Figura 4.17- Número de bactérias heterotróficas anaeróbias com o tempo de operação.

Nesta etapa também não houve consumo de sulfato e produção de sulfeto. Estes resultados em associação à ausência de crescimento de BRS, confirmam a intoxicação destas bactérias pelo nitrito. Neste caso, não se confirma a possibilidade das BRS em sobreviver mesmo em ambientes com aplicação do nitrato, já que algumas apresentam a capacidade de realizar a respiração do nitrato (DUNSMORE, 2004). Sturman (2001) estudou os íons nitrito para controlar o H_2S em poços de óleo e gás, pois este produto é mais reativo do que o nitrato e, portanto, apresenta eficácia superior na inibição das BRS e da geração de H_2S . Seu mecanismo de ação não se baseia na competição microbiana como o nitrato, mas sim em mudanças químicas como, por exemplo, pela elevação do Eh do meio, estabelecendo um ambiente desfavorável para as BRS.

A Figura 4.18 apresenta a concentração de nitrato e respectivo consumo com o tempo de operação, do décimo quinto ao trigésimo dia, quando foi realizada adição de 1000 mg/L de carbono. Observa-se comportamento distinto ao da primeira etapa, já que o consumo de nitrato ocorre numa velocidade inferior (Figuras 4.16 e 4.18). Após o vigésimo quinto dia de operação, a taxa de consumo de nitrato apresenta um aumento, provavelmente em função da readaptação dos microrganismos às novas condições reacionais. No entanto, os valores de taxa de consumo de nitrato foram sempre muito inferiores aos determinados na primeira etapa (Tabelas 4.16 e 4.17).

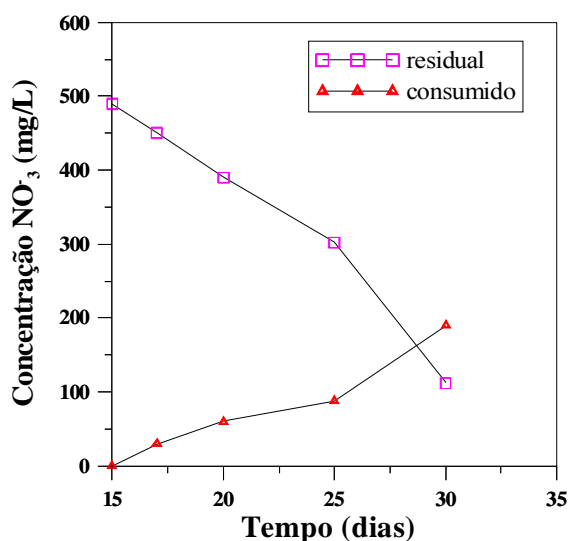


Figura 4.18: Concentração e consumo de nitrato em função do tempo de operação, após adição de 1000 mg/L

Considerando que o baixo consumo de nitrato e aumento da concentração de nitrito poderia estar relacionado à limitação de nutrientes e não da fonte de carbono, no vigésimo dia de operação, ainda na segunda etapa, foi feita a substituição em alguns dos reatores de 50% do volume do meio reacional por igual volume do meio Postgate, a fim de promover o enriquecimento do cultivo. A Tabela 4.18 mostra os resultados após adição de nutrientes.

Tabela 4.18 – Resultados experimentais após adição de nutrientes

Tempo (dias)	NO₃⁻ residual (mg/L)	NO₃⁻ consumido (mg/L)	NO₂⁻ (mg/L)	SO₄⁼ (mg/L)	H₂S (mg/L)
20	294* ± 15	----	79* ± 8	1230* ± 12	0
22	54 ± 5	240 ± 20	101 ± 10	1200 ± 10	0
24	40 ± 3	14 ± 5	105 ± 12	1235 ± 12	0
26	42 ± 4	0	102 ± 10	1230 ± 12	0
28	43 ± 4	0	100 ± 12	1233 ± 10	0
30	40 ± 2	0	100 ± 10	1229 ± 12	0

*Valores obtidos após adição do meio Postgate, estabelecendo o início da terceira etapa.

Pode-se observar que, após adição de nutrientes, o consumo de nitrato aumentou sensivelmente em dois dias de operação. Concomitantemente, foi verificado o crescimento das bactérias heterotróficas anaeróbias, sua concentração variando de $1,1 \times 10^6$ NMP/mL, referente ao vigésimo dia, a $2,4 \times 10^9$ NMP/mL no vigésimo quarto dia. Por sua vez, as BRS não apresentaram crescimento e não houve consumo de sulfato, nem produção de sulfeto, apesar da adição de nutrientes e da conseqüente diluição dos constituintes do meio reacional. As BRS não foram detectadas nem mesmo ao final do período operacional.

A partir do vigésimo quarto dia não ocorreu mais consumo de nitrato e sua concentração final estabilizou em torno de 40 mg/L. A concentração de nitrito se manteve também estável em torno de 100 mg/L até o trigésimo dia, e o número de BHA diminuiu para $4,7 \times 10^8$ NMP/mL. Este comportamento deve estar relacionado à formação de intermediários metabólicos de efeito tóxico para o metabolismo das bactérias redutoras de nitrato (GARBOSSA, 2003). Provavelmente, a continuação dessa etapa pode finalizar com a morte da biomassa.

A Figura 4.19 apresenta a concentração de nitrato e respectivo consumo com o tempo de operação após a adição de nutrientes. A taxa de consumo de nitrato foi acentuada nos dois primeiros dias, isto é, logo após a adição de nutrientes, mostrando que o meio reacional apresentava limitação de sais minerais e/ou vitaminas.

Alguns metais são componentes de enzimas, portanto, para atividade metabólica dos microrganismos são necessários em pequenas concentrações, por isso sendo denominados oligoelementos. Estes metais participam diretamente do processo catalítico ou podem ajudar a manter a conformação estrutural nativa da enzima.

A adição de extrato de lêvedo aos meios de cultura é realizada com o intuito de permitir ou estimular o crescimento microbiano, pois este contém vitaminas, principalmente do complexo B, que são necessárias como constituintes ou precursores de enzimas e coenzimas, além de aminoácidos e outras substâncias estimulantes.

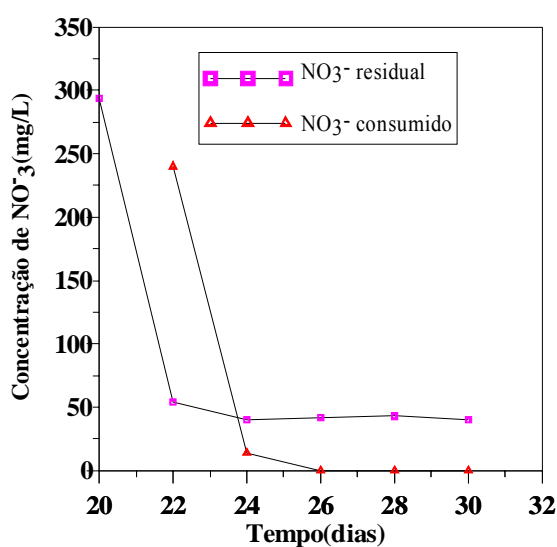


Figura 4.19 - Concentração e consumo de nitrato em função do tempo de operação na terceira etapa.

A quarta e última etapa deste teste foi realizada para avaliar o comportamento da cultura microbiana frente a uma nova injeção de nitrato, visto a baixa concentração deste ânion no meio reacional. Deste modo, a partir do vigésimo quarto dia de operação foi reiniciada a adição intermitente de nitrato, a cada dois dias, durante 10 dias. A Tabela 4.18 mostra os resultados desta última etapa do estudo.

A adição de nitrato promoveu o aumento do seu consumo, e a conseqüente elevação da concentração de nitrito, não obstante a taxa de consumo de nitrato tenha sido praticamente constante no decorrer do processo. Além disso, a concentração inicial de bactérias heterotróficas anaeróbias de $2,4 \times 10^9$ NMP/mL, no vigésimo quarto dia, aumentou para $2,7 \times 10^{11}$ NMP/mL no trigésimo quarto dia. Logo, o aumento do número de BHA pode ser atribuído ao crescimento das BRN devido ao consumo de nitrato e a geração de nitrito, produto resultante do metabolismo de algumas espécies deste grupo microbiano. Este fato pode ser confirmado pela redução da concentração de bactérias anaeróbias observada na terceira etapa, quando os experimentos foram conduzidos em condições semelhantes exceto pela não adição de nitrato.

Nesta etapa também não houve crescimento de BRS e, evidentemente, não foram determinadas alterações no consumo de sulfato e na produção de sulfeto.

Tabela 4.19- Resultados experimentais da quarta etapa, com adição intermitente de nitrato de 500 mg/L a cada dois dias

Tabela 4.19- Resultados experimentais da quarta etapa

Tempo (dias)	NO₃⁻ residual (mg/L)	NO₃⁻ consumido (mg/L)	NO₂⁻ (mg/L)	SO₄⁼ (mg/L)	H₂S (mg/L)	Taxa de consumo de NO₃⁻ (mg/L.dia)
24	*40 ± 5	0	*105 ± 5	*1235 ± 12	0	----
26	212 ± 15	328 ±	127 ± 10	1220 ± 10	0	164
28	266 ± 20	446 ±	134 ± 8	1210 ± 15	0	193
30	374 ± 25	392 ±	140 ± 12	1200 ± 12	0	197
32	395 ± 21	479 ±	142 ± 10	1220 ± 10	0	206
34	495 ± 38	400 ±	153 ± 7	1200 ± 10	0	208

* Valores referentes ao vigésimo quarto dia da terceira etapa, e correspondentes ao início da quarta etapa.

A Figura 4.20 mostra a variação do consumo de nitrato e a respectiva concentração residual após adição única de nutrientes e intermitente de nitrato em função do tempo de operação, do vigésimo quarto ao trigésimo quarto dia.

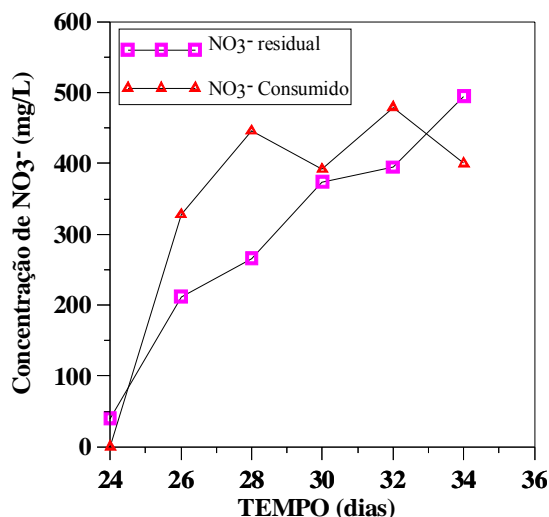


Figura 4.20 - Concentração e consumo de nitrato em função do tempo de operação após adição de nutrientes e nitrato.

A concentração residual de nitrato aumentou durante todo o tempo de operação enquanto o consumo de nitrato se manteve praticamente constante, em torno de 400 mg/L, a partir do segundo dia de operação (Tabela 4.19 e Figura 4.20). Um comportamento distinto foi observado na primeira etapa, quando o sistema também foi conduzido com injeção intermitente de nitrato (Tabela 4.16 e Figura 4.16). Naquela condição, o consumo de nitrato foi decrescendo ao longo do tempo. As taxas de consumo de nitrato destas etapas também foram diferenciadas, isto é, na primeira etapa a taxa diminui com o tempo e na quarta etapa se manteve praticamente constante. Este fato pode estar relacionado à adaptação das bactérias a altas concentrações de nitrato e às condições do meio reacional. Por outro lado, o valor médio das taxas de consumo de nitrato foi igualmente de 200 mg/L.dia, para as duas etapas realizadas com adição intermitente de nitrato. Vale ressaltar que o número de bactérias heterotróficas anaeróbias ao final da primeira etapa (10º dia) e da quarta etapa (34º dia) apresentaram a mesma ordem de grandeza (10^{11} NMP/mL), indicando que o crescimento celular possa ter atingido seu ponto de máximo.

A Figura 4.21 mostra a evolução da concentração de nitrato no meio reacional para as 4 etapas desenvolvidas. Nota-se que a adição de nutrientes (terceira etapa) foi mais importante para o aumento do consumo de nitrato do que a adição de carbono (segunda etapa). Verifica-se também que houve consumo de nitrato nas etapas em que o nitrato foi adicionado (primeira e quarta etapas), mostrando que as BRN mantiveram-se ativas durante toda a operação.

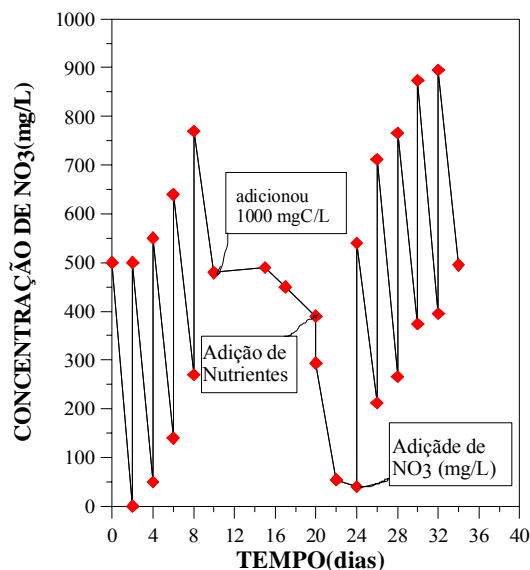


Figura 4.21 - Evolução da concentração de nitrato durante as quatro etapas.

A Figura 4.22 mostra a concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias em função do tempo para as quatro etapas deste estudo. Observa-se que durante os dez primeiros dias de operação (primeira etapa), em que ocorreu a adição intermitente de nitrato a cada dois dias, houve um crescimento significativo de BHA. Provavelmente, as periódicas adições de elevadas quantidades de nitrato tenham concorrido na aceleração do metabolismo das BRN. Depois da adição de carbono no décimo dia, houve considerável morte celular, o número de BHA permanecendo constante até o décimo quinto dia (segunda etapa). A adição de nutrientes, através da substituição do meio reacional por igual volume de meio novo, resultou na redução do número de microrganismos (20º dia); o suprimento de nutrientes estimulando o crescimento celular (terceira etapa). Com a retomada da adição intermitente de nitrato, a atividade metabólica das BHA foi favorecida, atingindo concentração celular semelhante à obtida ao final da primeira etapa. Assim pode se observar que nas etapas em que havia nutriente e entrada intermitente de nitrato, o crescimento celular foi praticamente o mesmo. A concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias, inicialmente de $9,5 \times 10^5$ NMP/mL e $1,1 \times 10^6$ NMP/mL na primeira e terceira etapas, respectivamente, atingiu $2,7 \times 10^{11}$ NMP/mL ao final da quarta etapa.

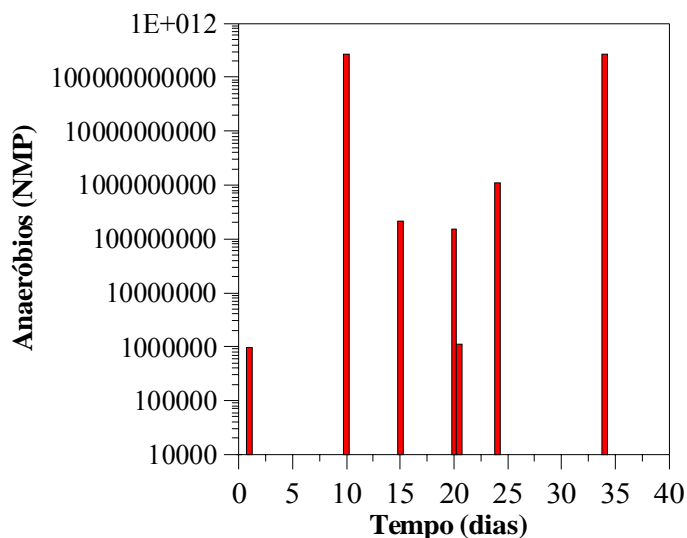


Figura 4.22 – Variação da concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias para as quatro etapas.

A Tabela 4.20 mostra os valores da taxa de consumo de nitrato e da concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias em cada etapa executada. Nota-se que a taxa de consumo de nitrato foi maior quando o número de BHA era elevado, correspondendo às etapas onde foi maior a concentração de nitrato ou houve suplementação de nutrientes e de carbono. De fato, o consumo de nitrato deve ser atribuído mais especificamente às BRN, que são microrganismos heterotróficos facultativos.

Os baixos valores de taxa de consumo de nitrato determinados para concentrações de BHA da ordem de 10^8 NMP/mL, no vigésimo e trigésimo dia de operação da segunda etapa, provavelmente foram ocasionados pelas altas concentrações de nitrato presentes no meio reacional.

Tabela 4.20- Taxa de consumo de nitrato em função do tempo em cada etapa do experimento

Etapa	Tempo (dias)	Concentração de Taxa de Consumo	
		BHA (NMP/mL)	Nitrato (mg/Ldia)
Primeira	0	$9,5 \times 10^5$	0,0
	10	$2,7 \times 10^{11}$	203,0
Segunda	15	$2,1 \times 10^8$	0,0
	20	$1,5 \times 10^8$	8,5
	30	$7,0 \times 10^8$	19,0

	20	$1,1 \times 10^6$	0,0
Terceira	24	$2,4 \times 10^9$	63,5
	30	$4,7 \times 10^8$	0,0
Quarta	24	$2,4 \times 10^9$	0,0
	34	$2,7 \times 10^{11}$	208,0

4.6 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SULFETO COM OU SEM ADIÇÃO DE NITRATO

A cinética de produção de sulfeto de hidrogênio por uma cultura mista enriquecida com BRS em efluente sintético foi realizada nas condições de otimização de mínima produção de sulfeto, na presença ou ausência de nitrato, conforme descrito nas seções 3.12 e 3.13.

O estudo cinético teve como intuito comprovar a eficácia do uso do íon nitrato no controle da geração de sulfeto através da indução seletiva das populações microbianas.

4.6.1 – CONSUMO DE NITRATO

A Tabela 4.21 mostra os dados referentes ao monitoramento do consumo de nitrato e geração de nitrito após uma única injeção de nitrato de sódio.

Tabela 4.21 - Resultados obtidos nas análises de monitoramento do consumo de nitrato durante a cinética com adição de nitrato

Tempo (dias)	NO ₃ ⁻ Residual (mg/L)	NO ₃ ⁻ Consumido (mg/L)	Taxa de Consumo de NO ₃ ⁻ (mg/Ldia)	Produção de NO ₂ ⁻ (mg/L)
0	2262 ± 25	0	---	0
1	1912 ± 20	350	350	206 ± 9
2	1513 ± 18	749	369,6	216 ± 10

3	1092 ± 15	1170	382,7	203 ± 7
4	842 ± 20	1420	367,9	201 ± 8
5	655 ± 15	1607	346,8	184 ± 5
6	507 ± 10	1755	325,3	175 ± 10
7	382 ± 9	1880	305,5	167 ± 6
9	217 ± 8	2045	276,8	153 ± 5
12	77 ± 7	2185	239,4	125 ± 4
15	31 ± 3	2231	204,8	102 ± 5
18	15 ± 2	2247	176,5	96 ± 3
21	2,5 ± 2	2259,5	154,6	88 ± 2
28	0	2262	127,2	72 ± 3

Ao longo de 28 dias, o nitrato adicionado foi gradativamente consumido, sendo determinadas reduções superiores a 50% e 80%, respectivamente com 3 e 7 dias de operação. Nos sete primeiros dias, as taxas de consumo de nitrato foram elevadas. Posteriormente, as taxas apresentaram quedas acentuadas, provavelmente em consequência da baixa disponibilidade de nitrato após o 9º dia. Fato que pode ser constatado na Figura 4.23. O gráfico revela uma cinética de consumo de nitrato do tipo exponencial, indicando uma reação de 1ª ordem em relação a sua concentração, ou seja:

$$\frac{d[\text{NO}_3^-]}{dt} = -k [\text{NO}_3^-] \quad \text{ou} \quad [\text{NO}_3^-] = [\text{NO}_3^-]_{\text{inicial}} e^{-kt}$$

Do ajuste dos pontos experimentais a esta equação, obtém-se uma constante de consumo de nitrato de 0,29 dia⁻¹.

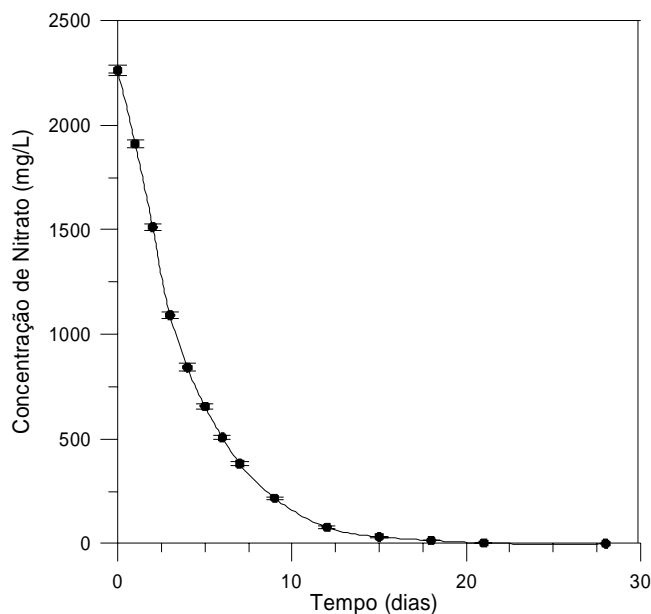


Figura 4.23 – Perfil do consumo de nitrato.

4.6.2 – CRESCIMENTO MICROBIANO

As Figuras 4.24 e 4.25 apresentam o monitoramento das populações de bactérias heterotróficas anaeróbias, redutoras de sulfato e redutoras de nitrato durante os estudos cinéticos realizados sem e com adição de nitrato, respectivamente.

No consórcio microbiano empregado foi detectado um número inicial de BRN menor que o das outras populações microbianas (BRS e BHA), cujas concentrações apresentavam a mesma ordem de grandeza (Figura 4.24). Uma alta concentração de BRS era previsível por ter sido o consórcio microbiano foi obtido a partir de vários subcultivos de amostra de água de produção, onde já havia sido constatada a presença de BRS, em meio apropriado para o crescimento destas espécies. Além disso, a composição do meio e a condição de anaerobiose adotados nos subcultivos também eram próprias para atender às exigências necessárias ao desenvolvimento das BHA.

A injeção de água do mar nos reservatórios situados em áreas *offshore*, bem como as condições nesses reservatórios permitem a existência de diferentes espécies microbianas na água produzida, dentre elas, as pertencentes aos grupos das BRS, BHA e, inclusive, das BRN (DAVIDOVA *et al.*, 2001; ECKFORD & FEDORAK, 2002, DUNSMORE *et al.*, 2004). Contudo, o baixo número de BRN, provavelmente, se deveu as condições pouco favoráveis ao seu cultivo, já que o meio usado não continha sal de nitrato, ou ainda a inibição pelas

concentrações de H_2S formado durante o enriquecimento do consorcio microbiano. Ademais, as BRS são comumente encontradas em poços de petróleo, águas do mar e de produção, em baixas quantidades quando comparadas às outras espécies, o que dificulta desta maneira sua proliferação.

Na ausência de nitrato, não houve crescimento das BRN visto que a atividade metabólica destas depende de nitrato/nitrito como acceptor de elétrons quando cultivadas em condição de anaerobiose (Figura 4.24). Ao contrário, rapidamente foi notada a sua inativação, provavelmente pela presença de H_2S , produzido pelas BRS, e/ou outros produtos do metabolismo das espécies ali presentes. No entanto, o crescimento, tanto das BRS quanto das BHA, foi satisfatório, verificando-se um aumento significativo do número de ambas, logo nas primeiras 24 h. Isto era previsível, já que a cultura tinha sido aclimatada de modo a estimular o crescimento das BRS, que conforme anteriormente mencionado, também favorecem as exigências nutricionais de outras bactérias heterotróficas anaeróbias. Estas duas populações microbianas atingiram o máximo de crescimento ao redor de 8 horas, sendo o número das BHA superior ao das BRS em 3 ordens de grandeza. Seguida à fase exponencial de crescimento, nota-se uma rápida perda de viabilidade pelas células de BHA, enquanto as BRS apresentam uma fase estacionária prolongada. Vários trabalhos fazem referência à sobrevivência das células de BRS, mesmo das espécies que não são capazes de esporular, por longos períodos (POSTGATE, 1984; BARTON, 1995; SERVULO, 2005).

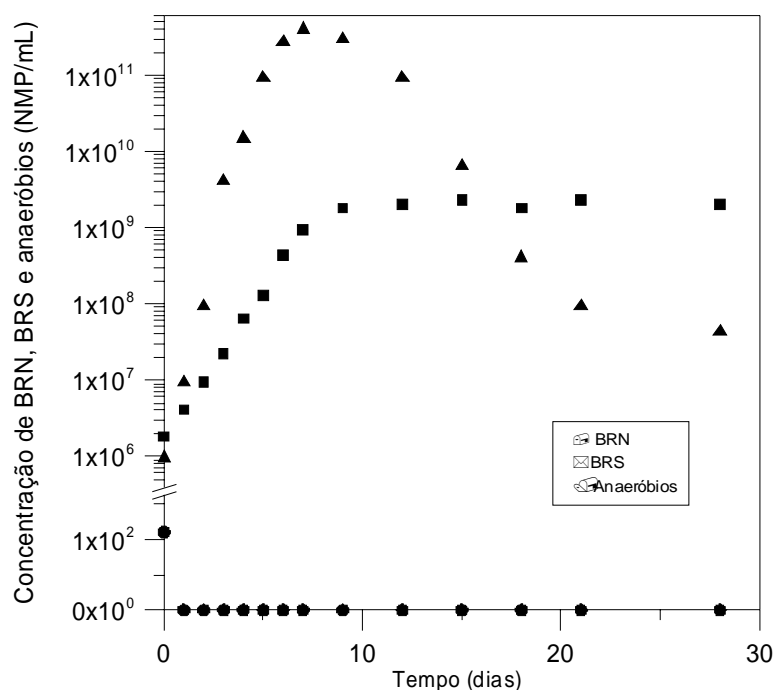


Figura 4.24 - Cinética do crescimento do consórcio microbiano em efluente sintético na ausência de nitrato.

A adição de nitrato revelou comportamentos muito diferenciados das bactérias presentes no consórcio microbiano (Figura 4.25). Conforme era de se prever, nas condições de cultivo anteriormente otimizadas, ou seja, para redução da geração biogênica de H_2S , as células de BRN e BHA cresceram satisfatoriamente já nas primeiras 24 h. Não houve morte de BRN, nem mesmo fase lag, comprovando que a composição do meio estava adequada para atender suas exigências nutricionais básicas. O problema no experimento anterior foi apenas a carência do ânion necessário para o metabolismo energético.

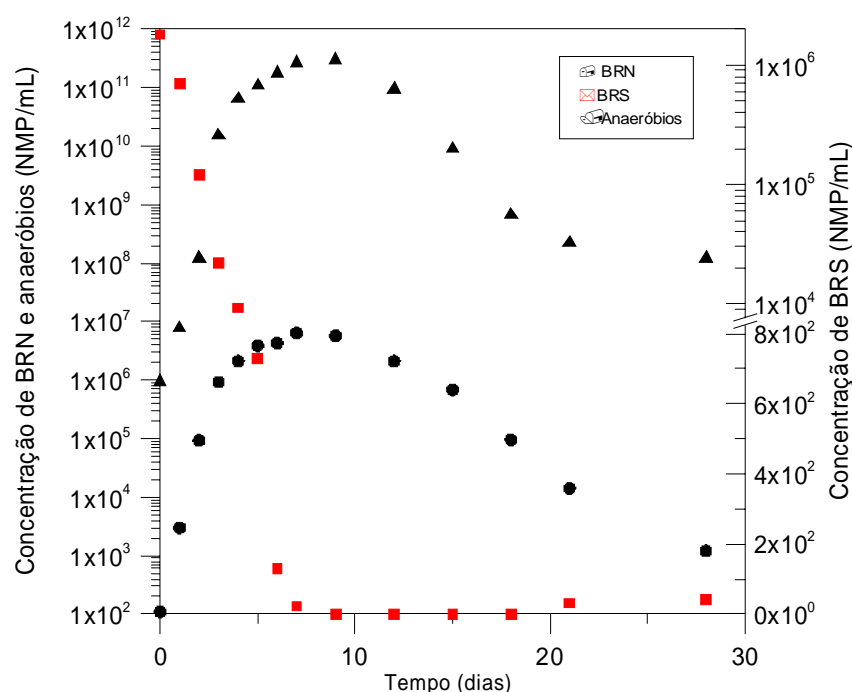


Figura 4.25 - Concentração de BRN, BRS e bactérias anaeróbias com o tempo de operação na cinética com adição de nitrato.

Nesta condição, os perfis cinéticos destas duas populações (BHA e BRN) microbianas foram semelhantes, com valores aproximados de velocidade específica de crescimento e duração da fase exponencial, e curta fase estacionária. Contudo, novamente houve uma prevalência do número de BHA.

No que tange às BRS, o nitrato teve efeito inibitório acentuado provocando acentuada morte celular nas primeiras 24 h, e a sua inativação total em pouco tempo. Existem alguns relatos de que algumas espécies de BRS são capazes de sobreviver mesmo em ambientes com aplicação de nitrato. Segundo alguns autores, isto seria possível através da

adaptação da respiração do sulfato pela do nitrato (DZIERZEWICZ, 1997; DUNSMORE, 2004). Segundo Dannenberg *et al.* (1992), para algumas espécies de sulfato redutoras, a troca respiratória (nitrato por sulfato) pode ocorrer quando concentrações ilimitadas tanto de sulfato quanto de nitrato estão presentes, sugerindo haver uma competição pelo mesmo aceptor final de elétrons (nitrato) entre BRS e BRN, quando ambas as espécies químicas estiverem presentes no meio. Dunsmore (2004) obteve amônia a partir do cultivo da linhagem *Desulfovibrio* (OP102), na ausência de sulfato, utilizando nitrato como aceptor final de elétrons. A redução do nitrato ocorreu, mesmo na presença de sulfato, quando o nitrato estava numa concentração mais baixa do que o íon sulfato. A redução microbiana do nitrato fornece 3 vezes mais energia que a redução microbiana do sulfato, de modo que, em ambientes onde são encontrados tanto sulfato quanto nitrato, as BRN irão predominar (STOTT & RIZK, 2005). É neste contexto que se constata que o consumo do nitrato conduzirá a um crescimento mais acentuado das BRN e, conseqüentemente, promoverá a depleção das fontes de carbono, impedindo o desenvolvimento das BRS que apresentam metabolismo mais lento.

A aplicação de 0,5 mM de nitrato em coluna simulando um poço de petróleo com injeção de água de produção garantiu o controle do *souring* biogênico por cerca de 3 meses, que segundo os autores foi devido a presença de nitrito (MYRH *et al.*, 2002). De acordo com Reinsel *et al.* (1996) já é reconhecida a eficácia do íon nitrito como agente antimicrobiano, o que vem proporcionando seu uso, inclusive na indústria alimentícia.

Outra teoria, proposta por Sturman (2001), considera que a adição do nitrato promove mudanças químicas, tornando o ambiente oxidante e, portanto, desfavorável ao crescimento das BRS. Entretanto, já foi determinada a presença da enzima nitrito redutase em espécies de BRS, sendo a expressão do gene mediada pela exposição destes organismos a ambientes com nitrato (GREENE *et al.*, 2003). Esta é uma hipótese de mecanismo através do qual as BRS se protegeriam da presença do nitrito, através de um mecanismo de desintoxicação (DUNSMORE, 2004).

No experimento do planejamento composto central (PCC), realizado com adição de nitrato, pode ser observado no ponto de mínima produção de sulfeto que a população de BRS diminui e a de BHA aumenta, ratificando as observações feitas para a Figura 4.25. A análise das concentrações celulares mostra que o aumento do número de BHA está diretamente ligado ao aumento na concentração de BRN, e que neste mesmo período, a concentração das BRS diminui até a sua completa inibição. Este resultado demonstra a eficácia do nitrato no aceleramento do metabolismo das BRN, que inicialmente estavam em menor concentração do que as outras duas populações, e também a capacidade das BRN em inibir as BRS. Esta pode

ser a explicação para a alta concentração de bactérias heterotróficas anaeróbias encontradas no PCC, frente a grande concentração de nitrato e a baixa concentração de BRS. Ao final do experimento, pode ser constatado que o decréscimo da concentração de nitrato resulta na diminuição do número de BRN, por conseguinte, as bactérias anaeróbias diminuem e as BRS voltam a crescer. Tal fato indica que o nitrato apenas inibe as BRS, possibilitando que na ausência do mesmo retomem o crescimento, e ainda que as BRN só se apresentam em números significativos frente a altas concentrações de nitrato (Tabela 4.22).

Segundo McInerney *et al.* (1993), o suprimento de nitrato, na ausência de uma população de BRN, não foi capaz de reduzir os níveis de sulfeto, em experimentos realizados com água de formação. A concentração do sulfeto só foi reduzida quando uma cultura microbiana de BRN foi introduzida. Por isso, o sucesso da adição do nitrato para controle da geração de H₂S biogênico depende principalmente da presença de uma população ativa de BRN (DAVIDOVA, 2001).

Tabela 4.22 Concentração dos microrganismos presentes no consórcio microbiano durante a cinética de produção de sulfeto em presença e ausência de nitrato.

Tempo (dias)	BRS (NMP/mL)		BRN (NMP/mL)		BHA (NMP/mL)	
	sem NO ₃ ⁻ 10 ⁻⁷	com NO ₃ ⁻ 10 ⁻³	Sem NO ₃ ⁻	com NO ₃ ⁻ 10 ⁻³	sem NO ₃ ⁻ 10 ⁻⁷	com NO ₃ ⁻ 10 ⁻⁶
0	0,18 ± 0,02	1.800 ± 200	1,1.10 ²	0,11 ± 0	0,095 ± 0,0	0,95 ± 0
1	0,41 ± 0,02	700 ± 0	0	3 ± 0	0,93 ± 0,02	7,7 ± 0,7
2	0,95 ± 0,0	120 ± 20	0	93 ± 2	9,2 ± 0,2	120 ± 10
3	2,2 ± 0,1	22 ± 1	0	930 ± 20	410 ± 20	15.000 ± 500
4	6,4 ± 0,0	9,3 ± 0,2	0	2.100 ± 100	1.500 ± 500	64.000 ± 0
5	13 ± 2,0	0,73 ± 0,02	0	3.900 ± 0	9.300 ± 200	110.000 ± 0
6	43 ± 0,0	0,13 ± 0,02	0	4.300 ± 0	27.000 ± 700	180.000 ± 1000
7	93 ± 2,0	0,022 ± 0,001	0	6.400 ± 0	40.000 ± 200	270.000 ± 700
9	180 ± 20	0 ± 0	0	5.700 ± 700	30.000 ± 0	300.000 ± 0
12	200 ± 0,0	0 ± 0	0	2.100 ± 100	9.300 ± 200	95.000 ± 0

15	230 ± 20	0 ± 0	0	680 ± 20	640 ± 0	9.200 ± 200
18	180 ± 20	0 ± 0	0	95 ± 0	40 ± 2	670 ± 40
21	230 ± 10	0,030 ± 0	0	14 ± 1	9,3 ± 0,2	220 ± 20
28	200 ± 20	0,040 ± 0	0	1,2 ± 0,2	4,3 ± 0	120 ± 10

4.6.3 – PRODUÇÃO DE SULFETO

Nos dois estudos cinéticos, com e sem a adição de nitrato, concomitantemente foi realizado o monitoramento da produção de sulfeto de hidrogênio e do consumo de sulfato, cujos dados estão apresentados na Tabela 4.23

Na Tabela 4.23 pode se observar que o consumo de sulfato não foi inferior a 3% em 28 dias, e a concentração de sulfeto foi menor que a encontrada nas condições de otimização do PCC. Portanto, a adição de nitrato impediu o consumo de sulfato e, conseqüentemente, a geração de sulfeto. Na verdade, o nitrato promoveu a das BRS (Figura 4.26).

Tabela 4.23 – Monitoramento de sulfato e de sulfeto durante os estudos cinéticos com e sem adição de nitrato

Tempo (dias)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)		H ₂ S (mg/L)	
	sem NO ₃ ⁻	com NO ₃ ⁻	sem NO ₃ ⁻	com NO ₃ ⁻
0	1600 ± 25	1616 ± 15	0	0
1	1540 ± 20	1591 ± 20	18 ± 2	0
2	1475 ± 18	1595 ± 18	40 ± 5	0
3	1395 ± 15	1588 ± 15	66 ± 7	0
4	1310 ± 20	1593 ± 20	96 ± 9	0
5	1200 ± 15	1590 ± 15	131 ± 10	0

6	1080 ± 10	1588 ± 10	171 ± 10	0
7	980 ± 10	1587 ± 10	205 ± 12	0
9	940 ± 15	1582 ± 15	217 ± 13	0
12	920 ± 12	1593 ± 12	224 ± 10	0
15	900 ± 19	1597 ± 19	230 ± 15	0
18	895 ± 22	1590 ± 22	234 ± 10	0
21	888 ± 20	1585 ± 10	238 ± 12	3,5 ± 0,5
28	885 ± 25	1570 ± 10	240 ± 10	6,0 ± 0,6

Na ausência de nitrato, foram determinados valores bem superiores de sulfato consumido e de H₂S gerado comparativamente aos obtidos com adição deste ânion (Figura 4.26 e Tabela 4.23). Entretanto, considerados o crescimento e a relação molar sulfato reduzido Sulfeto produzido, tem-se que deveria ter havido consumo total do sulfato e a concentração de sulfeto formado deveria ser maior. Provavelmente, isto foi devido à inibição das BRS pelo sulfeto de hidrogênio. Dependendo da espécie e das condições operacionais, este gás dada a sua solubilidade, e tóxico. Vale ressaltar que, após o 9º dia, a concentração de BRS se manteve inalterada enquanto houve um declínio do número de células viáveis de BHA. Logo, o comportamento apontado para as BRS pode estar relacionado à falta de nutrientes ou da fonte de carbono, ao invés de ser pela toxicidade do gás sulfídrico.

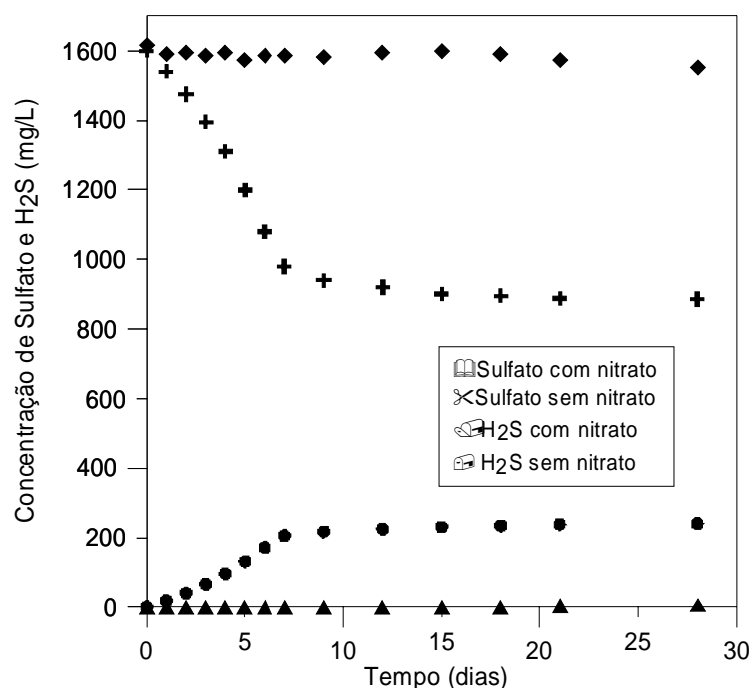


Figura 4.26 - Produção de sulfeto e consumo de sulfato para os cultivos do consórcio microbiano realizado com e sem adição de nitrato.

Os coeficientes angulares determinados a partir das curvas de consumo de sulfato e de produção de sulfeto (Figura 4.26) foram usados no cálculo das taxas de consumo, obtendo-se de 82,5 mg SO_4^{2-} /L.dia e 27,1 mg H_2S /L.dia respectivamente para os primeiros 7 dias. Os valores obtidos são coerentes, pois resulta num quociente entre ambas de 3,0, confirmando com o valor teórico esperado.

Considerando que a cinética de consumo de sulfato obedece a uma cinética de 1ª ordem se determina o valor de 0,055 dia^{-1} para a constante de consumo de sulfato, que é bem inferior ao valor obtido para a constante de consumo de nitrato pelas BRN (0,29 dia^{-1}). Este resultado mostra que sob condições semelhantes de cultivo, as BRN na presença de nitrato possuem um metabolismo mais rápido, comparativamente às BRS frente ao sulfato, corroborando outros trabalhos.

Comparando as Tabelas 4.22 e 4.23, nota-se claramente a eficácia do nitrato na inibição das BRS, desta forma inibindo o consumo de sulfato e também a produção de sulfeto.

Este trabalho demonstra que o nitrato apresenta potencialidade de uso no tratamento biológico anaeróbico de efluentes com alto teor de sulfato, permitindo a redução do número de BRS viáveis e, especialmente, da geração de H_2S . No que concerne à indústria de petróleo, o uso de nitrato é vantajoso pois, além de ser efetivo no controle do “souring” nos reservatórios

é menos tóxico do que os biocidas normalmente utilizados, facilitando o seu manuseio pelos operadores e não oferecendo riscos à saúde dos seres vivos.

4.6.3.1 MODELO PROPOSTO PARA A CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SULFETO SEM ADIÇÃO DE NITRATO.

Usando os dados obtidos de experimentos em batelada para a produção de sulfeto sem a adição de nitrato no meio – a concentração de sulfato, a cinética de crescimento das BRS e a produção de H₂S foram determinados. Para a modelagem trabalhou-se com as equações adimensionalizadas, pois as unidades de medidas para a concentração de BRS e de consumo de sulfato e formação de sulfeto eram diferentes e não foi possível a obtenção de uma equação de calibração para que se fizesse a conversão de unidades. Portanto, o modelo do tipo Monod utilizado para o crescimento torna-se:

$$\mu = \frac{\mu_{máx} S^*}{K_S + S^*} \quad (4.14)$$

Sendo:

μ = Velocidade específica de crescimento

K_S = Constante de Saturação.

Um balanço de massa foi realizado para estabelecer a formulação matemática do crescimento celular.

$$\gamma_x = \frac{dx^*}{dt} = \mu x^* - K_d x^* \quad (4.15)$$

O consumo do substrato destinado ao crescimento ou a reprodução é dado pela equação (4.16) desprezando o termo ara a manutenção celular introduzido por Pirt (1975).

$$\frac{dS^*}{dt} = -\beta \frac{dx^*}{dt} \quad (4.16)$$

$$\beta = \frac{1}{y} \quad (4.17)$$

e o modelo para a formação de H₂S dado pela expressão do tipo de Luedeking & Piret (Eq 4.18) que relaciona a velocidade específica de formação de H₂S com a velocidade específica de crescimento das BRS desprezando o termo independente do crescimento.:

$$\frac{dP^*}{dt} = m \frac{dx^*}{dt} \quad (4.18)$$

sendo:

$x^* = (\ln(x+x_0)/x_0)$ = adimensional do número mais provável de BRS [-]

$S^* = S/S_0$ = concentração adimensional de SO₄²⁻ consumido [-]

$P^* = P/P_0$ = concentração adimensional de H₂S formado [-]

x_0, P_0, S_0 – condições iniciais.

As equações (4.14 - 4.18) adimensionalizadas descrevem a modelagem matemática da produção de sulfeto via BRS e permitem simular condições para a formação de H₂S no efluente sintético (que simula água de produção), sem a adição de nitrato. Assim, pode se prever em outras condições a produção de sulfeto como, por exemplo, variando a concentração inicial de sulfeto ou de concentração da BRS.

A identificação paramétrica foi possível a partir dos resultados experimentais. Os valores dos parâmetros foram obtidos por uma técnica de regressão não-linear, usando um algoritmo de resposta múltipla (MARQUARDT, 1963). A integração do conjunto de equações diferenciais para o cálculo dos parâmetros por ajuste dos dados experimentais foi realizada com auxílio de um algoritmo de Runge-Kutta de quarta-ordem. A identificação paramétrica é ilustrada por uma boa correlação, entre os valores experimentais e aqueles fornecidos pelo modelo. O erro médio relativo dos parâmetros na regressão não-linear foi calculado, junto com a soma dos quadrados dos resíduos, definida pela Equação (4.19), referida ao número de dados:

$$SRS = \frac{\sum_{i=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{theor}})^2}{N} \quad (4.19)$$

Os resultados obtidos para os parâmetros da cinética do modelo de Monod e das equações de balanço para o consumo de sulfato, a produção de sulfeto e o crescimento celular estão apresentados na tabela 4.24.

TABELA 4.24- Parâmetros do modelo para a cinética de formação de BRS, decomposição de sulfato e produção de H₂S.

$\mu_{m\acute{a}x} (d^{-1})$	$K_s [-]$	$K_d [-]$	$\beta [-]$	$m [-]$
^a 0,531x10 ¹	0,294x10 ¹ ±0,354	0,854±0,121	0,682x10 ⁻¹ ±0,426x10 ⁻²	0,151±0,430x10 ⁻²
SRS = 2,030x10 ⁻¹				

^a – obtido pela aplicação da definição $\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$ aos dados experimentais.

A cinética da redução anaeróbia do sulfato nas condições do experimento é mostrada na Figura 4.27. A velocidade específica máxima de crescimento foi de $\mu_{m\acute{a}x} = 5,310 \text{ d}^{-1} = 0,221 \text{ h}^{-1}$, superior aos valores reportados na literatura. MOOSA *et al.* (2002) encontraram $\mu_{m\acute{a}x} = 0,061 \text{ h}^{-1}$ utilizando uma cinética de Contois, WIDDEL e PFENNING (1982) e O'FLAHERTY *et al.* (1998) encontraram valores de 0,063 e 0,068 h⁻¹, respectivamente, para velocidade de crescimento de *Dessulfotomaculum acetooxidans*. Valores baixos de $\mu_{m\acute{a}x}$ também foram reportados para BRS na literatura. Investigando a competição entre BRS e bactérias metanogênicas, VISSER (1995) encontrou que $\mu_{m\acute{a}x}$ variava entre 0,002 e 0,005 h⁻¹. Um valor de 0,013 h⁻¹ foi encontrado para a velocidade de crescimento de *Desulfobacter postgatei* por INGVORSEN *et al.* (1984). Estas variações podem ser atribuídas às diferentes espécies de bactérias utilizadas e as várias condições utilizadas nos diversos trabalhos. No caso deste trabalho em particular o crescimento celular foi realizado por contagem de bactérias e não por massa seca o que justifica a grande diferença existente entre os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ reportados na literatura e o encontrado pelo modelo utilizado neste trabalho.

A constante de saturação (K_s) foi de 2,940 em grandeza adimensional, que utilizando-se do valor da concentração inicial de sulfato assume o valor de 47,040 kg m⁻³. Valores de K_s reportados na literatura para a bio-redução do sulfato variam entre 0,018 e 0,033 kg m⁻³ (CHEN & HASHIMOTO, 1980). Estudando a redução do sulfato por uma cultura mista de BRS em um UASB contínuo VISSER (1995) encontrou K_s de 0,033 kg m⁻³ para um sistema de biomassa granular e 0,018 kg m⁻³ para um sistema de células suspensas. No crescimento de uma cultura pura de *Desulfobacter postgatei* em reator tanque agitado contínuo sobre limitação de sulfato INGVORSEN *et al.* (1984) encontrou valores de K_s de 0,024 kg m⁻³ enquanto MOOSA *et al.* (2002) encontrou valores de K_s variando de 0,027 a 0,125 kg m⁻³). Como no caso anterior, os valores obtidos neste trabalho e os relatados na

literatura são muito diferentes como esperado, devido às diferentes condições de realização dos experimentos.

Os valores de $Y_{x/\text{sulfato}}$ dados na literatura em (g biomassa/ g sulfato) não podem ser comparados aos valores deste trabalho, pois o crescimento celular foi realizado por contagem de bactérias.

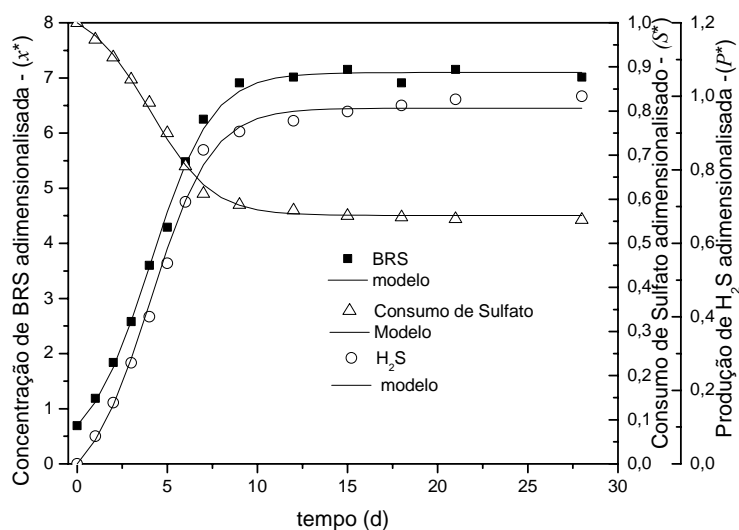


Figura 4.27- Evolução da concentração de BRS, consumo de sulfato e produção de H₂S

4.6.3.2 – MODELO PROPOSTO PARA A CINÉTICA COM ADIÇÃO DE NITRATO

Quando se tem a adição de nitrato ao meio simultaneamente das condições de matéria orgânica da água do mar têm-se a inibição das BRS e o crescimento das BRN. Os valores de crescimento de BRN e consumo de nitrato, obtidos experimentalmente para este ensaio foram utilizados para obtenção de um modelo que permite descrever o comportamento destas variáveis em outras situações.

Trabalhou-se com equações adimensionais, pois foi realizada a contagem de bactérias e não a medida de massa seca. Para este experimento a cinética que melhor conseguiu descrever o comportamento do crescimento das BRN segue um modelo de Contois (1959) (CHEN & HASHIMOTO, 1980).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S^*}{K_s x^* + S^*} \quad (4.20)$$

A equação utilizada para descrever o crescimento das BRS é dada pela equação do balanço de massa (4.20).

$$\frac{dx^*}{dt} = \mu x^* - K_d x^* \quad (4.21)$$

No caso da modelagem do consumo de Nitrato, como os dados obtidos experimentalmente apresentavam um comportamento exponencial, optou-se por uma modelagem mais simples para descrever este consumo. Neste caso, em particular trabalhou-se com uma equação de primeira ordem para descrever o balanço de massa do substrato (nitrato) no reator anaeróbio (4.21).

$$\frac{dS^*}{dt} = -\alpha S^* \quad (4.22)$$

com as variáveis adimensionalizadas dadas por:

$x^* = (\ln(x+x_0)/x_0)$ = adimensional do número mais provável de BRN [-]

$S^* = S/S_0$ = concentração adimensional de NO_3^- consumida [-]

x_0, S_0 – condições iniciais.

Os parâmetros para o crescimento celular foram obtidos pelo ajuste do modelo descrito aos dados experimentais pela técnica de regressão não-linear, usando um algoritmo de resposta múltipla de MARQUARDT (1963) e com o somatório dos quadrados dos resíduos dados pela equação (4.19). O parâmetro α foi ajustado independentemente por um ajuste não linear. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.24.

TABELA 4.25- Parâmetros do modelo para a cinética de formação de BRNe consumo de nitrato.

$\mu_{\max} (d^{-1})$	K_s [-]	K_d [-]	α [-]
$0,619 \times 10^1 \pm 0,181 \times 10^1$	$0,122 \times 10^1 \pm 0,417$	$0,820 \times 10^{-1} \pm 0,346 \times 10^{-2}$	$0,241 \pm 0,651 \times 10^{-2}$

SRS = 1,983			
-------------	--	--	--

Não foi possível uma comparação teórica entre os valores obtidos por esse modelo e valores da literatura, uma vez que neste trabalho em particular o acompanhamento do crescimento celular foi realizado por contagem celular. A Figura 4.28 apresenta o resultado da aplicação do modelo proposto com os respectivos parâmetros ajustados para o consumo de nitrato e o crescimento de BRN.

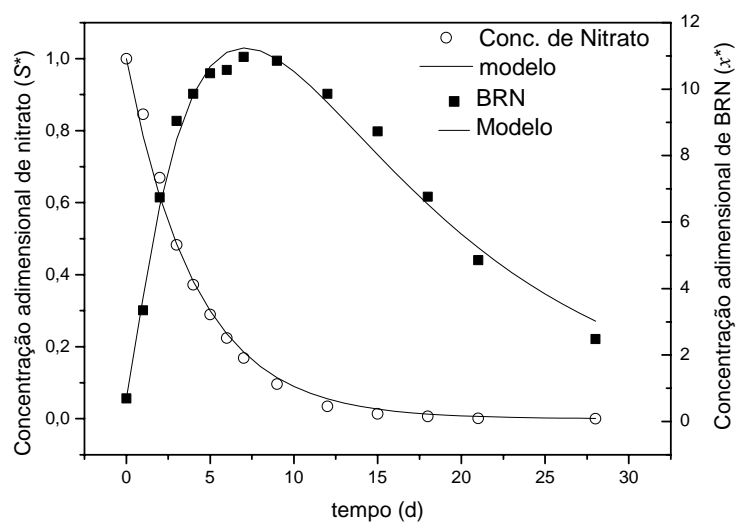


Figura 4.28- Evolução do comportamento do consumo de nitrato e crescimento de BRN.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se enunciar as seguintes conclusões:

- Na etapa de aclimatação, a cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato cresceu satisfatoriamente utilizando carbono como fonte de energia, em concentrações de até 5 g/L.
- No PCC, a menor produção de sulfeto foi de 10,3 mg/L, sendo as concentrações de nitrato e sulfato as variáveis que mais influenciaram na redução da produção do sulfeto.
- A otimização do processo de minimização da produção de sulfeto foi obtida para as seguintes condições: 1616 mg/L de sulfato, 444 mg/L de carbono e 2262 mg/L de nitrato, resultando em 8,2mg/L de produção de sulfeto e 30 NMP/mL de BRS.
- Na reprodução de um dos experimentais do PCC (ensaio14), na ausência de nitrato, obteve-se uma produção de 224mg/L de sulfeto e $2,3 \times 10^9$ NMP/mL de BRS, deixando claro a influência da concentração de nitrato no crescimento das BRS e, conseqüentemente, na produção de sulfeto.
- Os pontos de otimizações e as superfícies de resposta mostraram que altas concentrações de nitrato favoreceram a atividade das bactérias anaeróbias, inibiram o crescimento das BRS, e diminuíram o consumo de sulfato e a produção de sulfeto.
- Verificou-se que os pontos de otimização para a minimização de produção de H_2S , de consumo de sulfato e de número de BRS, são bastante próximos, significando que o crescimento de BRS está relacionado com o consumo de sulfato e conseqüente produção de H_2S .
- A concentração de carbono pouco influenciou na produção de H_2S , significando que efluentes com cargas orgânicas bem distintas podem ser tratados com as mesmas condições de concentração de nitrato visando obter menor produção de sulfeto.
- Para valores maiores da relação C/N (carbono/nitrato), obteve-se uma menor concentração de nitrito e nitrato residual, pois devido à presença do doador de elétrons (carbono) garantiu-se uma maior desnitrificação.
- No estudo do comportamento da cultura microbiana perante a entrada intermitente de nitrato no tempo pré-estabelecido de 48 horas pôde-se observar que:

- A taxa de consumo de nitrato só foi significativa quando havia um número maior de bactérias anaeróbias, acima de 1×10^9 NMP/mL, uma maior concentração de nitrato e no meio haviam sido adicionados nutrientes e fonte de carbono.
- Com a entrada intermitente de nitrato não houve crescimento de BRS e nem produção de sulfeto ao longo de todo o experimento, mesmo durante o período em que não havia entrada do mesmo.
- A adição de nutrientes foi mais importante para o aumento do consumo de nitrato do que a adição de carbono. Nas etapas em que adicionou-se nitrato houve consumo do mesmo, mostrando que as BRN mantiveram-se ativas durante toda a operação.
- Nas etapas em que havia nutriente e entrada intermitente de nitrato, o crescimento celular foi praticamente o mesmo.
- Na ausência de nitrato não houve crescimento das
- Na ausência de nitrato, não houve crescimento das BRN visto que a atividade metabólica destas depende de nitrato/nitrito como acceptor de elétrons quando cultivadas em condição de anaerobiose. E o crescimento tanto das BRS como das BHA foi satisfatório, tendo um aumento significativo nas primeiras 24h./
- No cultivo nas condições de otimização, as células de BRN e BHA cresceram satisfatoriamente nas primeiras 24h, não houve morte nem mesmo fase lag, comprovando que a composição do meio estava adequada para atender suas exigências nutricionais básicas. O nitrato teve efeito inibitório acentuado para as BRS provocando uma grande mortandade celular nas primeiras 24h
- O consumo de nitrato conduziu a um crescimento mais acentuado das BRN, promovendo uma depleção das fontes de carbono, impedindo o desenvolvimento das BRS que apresentam metabolismo mais lento.
- Frente as baixas concentrações de nitrato no final dos experimentos, as BRN e as BHA diminuem e as BRS voltam a crescer, indicando que o nitrato apenas inibe as BRS, possibilitando que na ausência do mesmo retomem o crescimento
- O nitrato apresenta potencialidade de uso no tratamento biológico de efluentes com alto teor de sulfato, permitindo a redução do número de BRS e da geração de sulfeto de hidrogênio.

5.2 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES

Após a conclusão deste trabalho, sugere-se para posteriores estudos:

- Estudar a redução da produção de sulfeto, na presença de nitrito.
- Testar a condição de otimização com outra cultura de microrganismos, por exemplo, cultura de BRN.
- Verificar se, após a entrada intermitente de nitrato, as BRS voltam a se desenvolver depois de um determinado tempo.
- Acompanhar o crescimento de BRN, durante um processo de entrada intermitente de nitrato.
- Testar o processo em outros tipos de reatores e em maior escala.
- Estudar detalhadamente a modelagem do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S.A.; DARLINGTON, L. W.; OCCAINTI, J. New Filtration Process Cuts Contaminants from *Offshore* Produced Water. *Oil & Gas Journal*, 1998.
- ALVAREZ, P.J.J; DA SILVA, M.L.B. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene – toluene – ethylbenzene – xylene – ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 4720-4726, 2004.
- APHA, AWWA, WPCF. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 18th edition, New York, 1992.
- B. V. KJELLERUP, R. H. VEEH, P. SUMITHRARATNE, T. R. THOMSEN, K. BUCKINGHAM-MEYER, B. FRØLUND AND P. STURMAN Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* Volume 32, Number 4 Pages: 163 - 170 April 2005
- BABOSA, R.A. 1998. Tratamento anaeróbico de esgoto sanitário em reator de fluxo ascendente com leito de lodo. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 242p. Tese de Mestrado em Engenharia Química.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 2^a. ed., Editora Unicamp, Campinas, 1995.
- BARTON, L. L., *Sulphate-reducing bacteria*. *Biotechnology Handbooks*, v. 8, New York, Plenum Express, 1995;
- BARTON, L. L. & TOMEI, F.A. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: *Sulphate-reducing bacteria*. *Biotechnology Handbooks*, v. 8, New York, Plenum Express, 1995;
- BOOPATHY, R. Use of anaerobic soil slurry reactor for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 52, p. 161-166, 2003a.
- BOX, G. E. P. HUNTER, W. G., HUNTER, T.S. *Statistics for Experimenters*. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc., 1978.
- BRAILE, P.M.; & CAVALCANTI, J.E.W.A. Manual de Tratamento de águas Residuárias Industriais, CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo 1993;
- BURKE, N.E.; CURTICE, S.; LITTLE, C.T. ET AL. REMOVAL OF Hydrocarbons from Oilfield Brines by flocculation with Carbon Dioxide. SPE 21046, 457-465, 1991.
- BURNS, K.A.; CODI, S.; FURNAS, M ET AL. Dispersion Rate of Produced Formation Water Constituents in an Australian Northwest Shelf Shallow Water Ecosystem, 1999.

- BURNS, K.A.; CODI, S.; LITTLE, CT. Rt al. Removal of Hydrocarbons from Oilfield Brines by Flocculation with Carbon Dioxide. SPE 21046, 1991.
- CASTRO, J.F.T.; BARROS, E.C. SHIOYA, N. H. Evolution of Produced Water Treatment in Campos Basin. SPE 46580, p1-5,1998.
- CHEN, Y. R., & HASHIMOTO, A. G. Substrate utilization kinetic model for biological treatment processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 2081–2095, (1980).
- CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. 1990. *Biofilms*, New York, John Wiley & Sons, INC. 796 p
- COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P., Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. Department of Microbiology, University College, Galway, Republic of Ireland, 1994.
- CRAVO Jr., W.B. Formação de Biofilme e Biocorrosão em superfícies metálica. Qualificação de doutorado - EQ/UFRJ, Rio de Janeiro., 2001.
- DALSGAARD, T.E.; THAMDRUP, B. Factors Controlling Anaerobic Ammonium Oxidation With Nitrite in Marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, V 68, N 8, p 3802-3808, 2002.
- DANNENBERG S, KRODER M, DILLING W, CYPIONKA, H (1992) Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 158:93–99
- DAVIDOVA, I.; HICXKS, M.S.; FEDORAK, P.M.; SUFLITA, J.M..The influence of nitrate on microbial process in oil industry productions waters. *Journal of industrial microbiology e biotechnology*, 2001.
- DUNSMORE, B. C.; WHITFIELD, T. B.; LAWSON, P. A. COLLINS M.D. Corrosion by Sulfate Reducing Bacteria that Utilize Nitrate - **Corrosion 2004**, Paper 04763, NACE International, 2004.
- DZIERZEWICZ, Z., B. CWALINA, E. CHODUREK, AND T. WILCZOK. 1997. The relationship between microbial metabolic activity and biocorrosion of carbon steel. *Research in Microbiology*, 148:785-793.
- ECKFORD, R. E., AND P. M. FEDORAK. 2002. Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29:83-92.
- Energy Institute*, 2003; www.bio.ucalgary.ca, 2004
- FANG, C. S.; LIN, J. H. Air Striping for Treatment of Produced Water. *J. Petr. Tech.*, v 40, n5, p.619-624, 1998.
- FELIPE, C.A.V. Influência das variáveis de processo na qualidade de sementes de soja submetidas a secagem em leito deslizante e escoamentos concorrentes. Dissertação de Mestrado – FEQUI/UFU, Uberlândia, 1999.

- FLANIGAN, D. A.; SKILBECK, F.; STOLHAND et al. Use of low-shear pumps in conjunction with hydrocyclones for improved performance in the cleanup of low-pressure produced water. Society of Petroleum engineers (SPE) 19743, p. 413-422,1989.
- FLEMMING, H.-C. 1996. Economical and technical overview. In: Microbially Influenced Corrosion of Materials. Heitz, E., Flemming, H.-C, and Sand, W. (eds), Berlin, Springer-Verlag.
- GARBOSSA, L.H.P. Desenvolvimento e avaliação de sistemas de leito fixo-reator misto radial seguido de reator anóxico horizontal- para remoção de matéria e de nitrogênio de esgoto sanitário. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos ,2003.
- GENTIL, V. Corrosão. 3^a.ed, Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1996, 345 p.
- GONZÁLEZ, J.E.G., SANTANA, F.J.H., MIRZA-ROSCA, J.C. 1998. Effect of bacterial biofilm on 316SS corrosion in natural seawater by eis. Corrosion Science, 40(12): 2141-2154.
- GREENE, E. A.; HUBERT, C; NEMATIM.;JENNEMAN, G.E., AND G. VOORDOUW. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. Environmental Microbiology, 5: 607-2003
- GUIDA, J.W.; FROGE, D.E. Improved Wastewater Treatment. Hydrocarbon Processing, p.55-60,1995.
- HAEGH, T. Fertilisers are increasing productivity not only on the farm, but also on offshore oil reservoirs. Royal Society of Chemistry, chembytes e-zine, 2000.
- HANG, J.S.; VARADARAJ, R. Colloid and Interface Science in the Oil Industry. J. Colloid and Interface Sci., v.1, p.535-539,1996.
- HANSEN, B.R.; DAVIESS, S.R.H.; Review of Potencial Technologies for the Removal of Dissolved Components from Produced Water. Chemical Engineering Research and Design, 1994.
- HARRISON, J.R., A.P. Microbial sucession and mineral leaching in a artificial coal spoil. Applied and Environmental Microbiology, n. 131, p. 68-76, 1982.
- HENZE, M.; HARREMÕES ,P.;JANSEN J.L.G.; ARVIM,e.. Wastewater treatment. Germany 1997.
- HER, J. HUANG, J. Influence of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification carbon breakthrough. Bioresource technology,1995.
- HITZMAN, D.O.; SPERL, G.T.; SANDBECK, K.A. *Composition for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system, particularly in an aqueous system used in oil field applications.* United States Patent N° 5.750.392. Data: 12 de Maio de 1998.

- HOLT, J.G. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition, editor John G. Holt – in – Chief, Williams & Wilkins Baltimore, London, 1994.
- HORIBA, Instruction manual. Copyright Horiba, Ltd. Japão, 1995.
- INGVORSEN, K., ZEHNDER, A. J. B., & Jørgensen, B. B. Kinetics of sulphate uptake by *Desulfobacter postgatei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 403–408, (1984).
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ- Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz v 1 3^a ed São Paulo 1985.
- IPPC- Integrate Pollution Prevention and Control- Joint Research Centre – European Commission. Reference document on best available techniques for the tanning of hides and skins. Sevilha, 2003.
- IULTCS- International Union of Leather Technologists and Chemists Societies. Minutes of the annual meeting of the IUE environment and waste commission- CTC Lyon, França, 2002.
- JAVAHERDASHTI, R. 1999. A review of some characteristics of MIC caused by sulfate-reducing bacteria: past, present and future. *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 46(3): 173-180.
- JACOBS, M. B.; BRAVERMAN, M. M.; HCHEISER, S., “Ultramicrodetermination of Sulfides in air”. *Anal Chem.*, v. 29, p 1349-1951, 1957.
- JENNEMAN, G.E.; GEVERTZ D. (1999). Identification, characterization and application of sulfide-oxidizing bacteria in oil fields. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Bell CR, Brylinsky M, Jhonson- green P (ed), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- JONATHAN D. VAN HAMME, AJAY SINGH, AND OWEN P. Ward Recent Advances in Petroleum Microbiology *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 67, No. 4, p. 503-549, December 2003
- KANE, R.D.; SURINCH, P. A field study of microbiological growth and reservoir souring, corrosion 97. paper n 208, 1997.
- KARTHIKEYA, R. & BHANDARI, A. 2001. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. *J hazard subst ares* 3:1-19
- KERESZTES, Z., FELHOSI, I. & KÁLMÁN E. 2001. Role of redox properties of biofilms in corrosion processes. *Electrochimica Acta*, 46: 3841-3849.
- KLEIMKEMPER, J.; SCHROTH, M. H.; SIGLER, W.V.; SCHMUCKI, M.; BERNASCONI, S.M.; ZEYER, J. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1516-1523, 2002.

- KRUMHOLZ, L.R.; STEGER, J.L.; VINCENT, C.; BALLARD, J.D. *Desulfovibrio sp.* genes involved in the respiration of sulfate during metabolism of hydrogen and lactate. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, p. 1932-1937, 2002.
- LENS, P.; MASSONE, A.; ROZZI, A.; VERSTRAETE, W., “Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors”. *Water Research*, v. 29, n. 3, p. 857-870, 1995.
- LEVANDOWSKY, Z., STOODLEY, P & ROE, F. 1995. Internal mass transport in heterogeneous biofilms: recent advances. *Corrosion*, paper 222 Texas
- LIMA, A. C. F. et al., “Anaerobic sulphate-reducing microbial process using UASB reactor for heavy metals decontamination”. *Environmental Technology*, v. 22, p. 261-270, 2000.
- LOVLEY, D.R.; COATES, J.D; ANDERSON, R.T.; WOODWARD, J.C.; PHILLIPS, E.J.P. Anaerobic hydrocarbon degradation petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. Environmental Science Technology, v. 30, p. 2784-2789, 1996.
- MADIGAN, M. T. Microbiology, Physiology and Ecology of Phototrophic Bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Edited by Alexander J.B. Zehnder, p. 39-111, 1988.
- MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Sot. Indust. Appl.* 11, 431-441, (1963).
- MAXWELL, S. *et al.*, The simulation of nitrate-reducing bacteria (NRB) in oil-field systems to control sulphate-reducing bacteria (SRB), microbiologically influenced corrosion (MIC) and reservoir souring - An introduction review. Energy Institute, London, 2003
- MCINERNEY, M. J., K. L. SUBLETTE, V. K. BHUPARTHIARAJU, J. D. COATES, AND R. M. KNAPP. 1993. Causes and control of microbially induced souring, p. 363-371. In E. T. Premuzic, and A. Woodhead (ed.), *Developments in petroleum science*. 39. Microbial enhancement of oil recovery—recent advances. Proceedings of the 1992 International Conference on Microbial Enhanced Oil Recovery. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- METCALF & EDDY, INC., Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse, 3rd ed., revised by G. Tchobanoglous and F.L. Burton, Mc Graw-Hill, New York, NY, 1334 p., (1991).
- MOOSA, S., NEMATI, M. & HARRISON, S. T. L. A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, Part I: Effect of sulphate concentration, *Chemical Engineering Science*, 57 2773 – 2780, (2002).
- MOURA, I.; BURSAKOV, S.; COSTA, C.; MOURA, J.J.G. Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe*, 1997.

- [MYHR S](#), [LILLEBO BL](#), [SUNDE E](#), [BEEDER J](#), [TORSVIK T](#). Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. *Appl Microbiol Biotechnol*.58(3):400-408Dec2002
- NAGIUB, A. & MANSFEL, F. 2002. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition (MICI) with EIS and ENA. *Electrochimica Acta*, 47: 2319-02333
- NEMATI, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. *Mechanistic Study of Microbial Control of Hydrogen Sulfide Production in Oil Reservoirs*. Biotechnology and Bioengineering, V. 74, N° 5, 2001.
- NEVIUS, B. A.; BAGWELL, C. E.; BRIGMON, R. L. 2004. Characterization of microbial communities in TCE-contaminated seep zone sediments. *Journal of the South Carolina Academy of Science* *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 2(1): 25-29. <http://sti.srs.gov/fulltext/ms2005107/ms2005107.pdf>. Acesso em dezembro de 2005.
- OLIVEIRA, M. dos Santos. Flotação em coluna do rejeito remóido do processo de concentração da apatita (Cap. III e IV). Dissertação de Mestrado. FEQUI/UFU, Uberlândia, 2004, 131 p.
- ODOM, J. M.; R. SINGELTON, Jr. The sulphate-reducing bacteria: comtemporary perspectives. New York, Springer-Verlag, 1993.
- O'FLAHERTY, V., MAHONEY, T., O'Kennedy, R., & Colleran, E. E*ect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process Biochemistry*, 33, 1–15, (1998).
- ORNEK, D.; WOOD,T.K.; HU,C.H. & MANSFELD,F.2002. Corrosion control using regenerative biofilms (CCURB) on brass in different media. *Corrosiom Science*, 44: 2291-2302
- PIRT, S. J. PRINCIPLES of microbe and cell cultivation. Oxford, UK: Blackwell Scienti7c Publications, (1975).
- POSTGATE, J. R, The sulphate-reducing bacteria. 2^a ed. Cambridge, London. New York – Melbourne, Cambridge University Press, 1984;
- RABUS, R.; FUKUI, M.; WILKES, H. et al. Degradative Capacities and 16S rRNA-Targeted Whole-Cell Hybridization of Sulfate-Reducing Bacteria in an Anaerobic Enrichment Culture Utilizing ALkylbenzenes from Crude Oil. *Applied and Enviromental Micribiology*, 1996.
- REINSEL,M.; STEWART,P; AND J.T. SEARS. Control of Microbial Souring by Nitrate, Nitrite, or Glutraldehyde Injection in a Sandstone Column", *J. Ind. Microb.*, 17: 1128-1136 (1996)
- RIVIERE, L.; GARLAND, E. EXPERIENCE OF Produced Water-Treatment in the North Sea. *Marine Poll. Bull.* V.29, n. 6-12, p. 312-316, 1994.

- RIZZO, A.C.L.& LEITE, S.G.F. ISSN 0103-7374 Produção de sulfeto em reator do tipo UASB e sua potencial aplicação na remoção de metais pesados de efluentes CETEM 2004.
- ROS, M. Denitrification Kinetics in an activated sludge system. *Water science and technology*, 1995.
- SANTOS, S.G.; ONU, A.F.; FORESTI, E. Estudo comparativo entre três doadores de elétrons (metanol, etanol e metano) no processo de desnitrificação, São Carlos, EESC- USP, 2002.
- SCHURMAN, A; SCHROTH, M.H; SAURER, M; BERNASCONI, SM; ZEYER, J. (2001). Nitrate-consuming process in a petroleum-contaminated aquifer quantified using push-pull tests combined with ^{15}N isotope and acetylene- inhibition methods. *Journal of Contaminant Hydrology*, 66: 59-77
- SEABRA, P.N.C.; SANTIAGO, V.M.J. As Atividades de Perfuração e Produção de Petróleo e o Meio Ambiente. Boletim Técnico Petrobrás, RJ, 1984
- SÉRVULO, E.F.C.; VIEIRA, D.S.; CAMMAROTA, M.C. Degradation potential and growth of anaerobic bacteria in produced water. *Environmental Technology*, v.26, nº 8, p. 915-922, 2005.
- SÉRVULO, E.F.C. (1991) Ação das bactérias Oxidantes e redutoras de enxofre sobre o xisto. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia/ UFRJ, 148 p Tese de doutorado.
- SILVA, A.F.C. Avaliação da remoção biológica de sulfeto a partir de uma população fotossintética anoxigênica. Dissertação de Mestrado – EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.
- SOGIN, M.L.; DHILLON, A.; TESKE, A.; DILLON, J.; STAHL, D.A. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, no. 5, p. 2765-2772, 2003.
- SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology. 1ª edição, Nashville, Archae Press, 394 p, 1996.
- STEPHENSON, M. T. Components of Produced Water: A Compilation of Results from Several Industry Studies. SPE 23313, First Intl. Conf. Health, Safety and Envir. Hague, Netherlands, 1991.
- STOTT, J.; RIZK, T. Anti-Souring Control by Nitrate and Nitrite, A Literature Review. CAPCIS Ref.: TR 4500 - Rev. 1, 02/2005.
- STROMGREN, T.; SORSTROM, S. E.; SCHOU, L. et al. Acute Toxic Effects of Produced Water in Relation to Chemical Composition and Dispersion. *Marine Environmental Research*, 1995.
- STURMAN, P. J. Solving the Oilfield Souring Puzzle: Control of Downhole Hydrogen Sulphide Production Using Nitrite, UK Corrosion, Paper 19, 2001.

- SUFLITA, J. M.; KROPP, K.G.; DAVIDOVA, I.A. Anaerobic oxidation of *n* – Dodecane by an addition reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, p. 5393-5398, 2000.
- SURAMPALLI, R.Y., TYAGI,R.D.; SHEIBLE,O.K.;HEIDMAN,JA. Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. Bioresource technology, 1997.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition, p. 4-99 a 4-126, 1998.
- TELLEZ, G.T.; KHANDAN,N. A BIOLOGICAL Field Treatment Process for Removing Hydrocarbons from Oilfield roduced Waters. In The Ninth International Symposium of Gas, Ol and Enviromenttal Biotechnology, Rio de Janeiro, 1996.
- TELLEZ, G.T.; NIRMALAKHANDAM, N.; TORRESDEY-GARDEA, J.L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. Advances in Environmental Research, v. 6, p. 455-470, 2002.
- TIEDJ, J.M. 1994. Microbia Diversity: of value to whom? ASM News, 6 524-525
- THOMAS, J. E. Fundamentos da engenharia do petróleo. Rio de Janeiro, Interciência: PETROBRAS , 271 p., 2004.
- UTVIK, T.I.R. Chemical Characterization of Produced Water from Four Offshore Oil Production latforms in the North Sea. Chemosphere, 1999.
- U.S. FEDERAL HIGHWAY ADMINISTRATION, 2002.
- VAZOLLER, R.F. 1993. Características e Interações microbianas nos processos de Tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. In: II Curso de Processos Biológicos de Tratamento de Resíduos, São Paulo. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo . 18 p.
- VIDELA, H. A., Corrosão Microbiológica,2ª edição, 2003;
- VIEIRA, D. S. Avaliação da biodegradação anaeróbia no tratamento de água de produção. Dissertação de Mestrado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2003, 156 p.
- VIEIRA, P. A. Avaliação da biodegradação de efluente contendo óleo diesel e gasolina empregando culturas mistas. Dissertação de Mestrado, FEQUI/UFU, Uberlândia, 2004.
- VISSER, A., The anaerobic treatment of sulphate containing wastewater. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, (1995).**
- WALCH,M. (1991) . Introduction: Microbiological influences on marine corrosion, MTS J , 24 3-4.

WIDDEL, F. FUKUI, M.; HARMS, G.; RABUS, R.; SCHRAMM, A.; ZENGLER, K.; BOREHAM, C.; WILKES, H. Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria. Microbial Ecology of Oil Fields, In: 8th International Symposium on Microbial Ecology, Canada, 1999.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Environmental Biotechnology, v. 12, p. 259-276, 2001.

WIDDEL, F., & PFENNIG, N. Studies on dissimilatory sulphate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of Microbiology*, 129, 395–400, (1981).

ZITHA, P.L.J. Well Treatment and Water Shutoff by olymers Gels. Delft University Press, Netherlands, 1999.

www.abraco.org.br

www.aga.com.br

www.ambientebrasil.com.br

www.bahiainvest.com.br/port/segmentos/papel.asp

www.bio.ucalgary.ca,2004

www.cetesb.sp.gov.br/Ambiente/producao_limpa/casos/caso07.pdf

www.ciagri.usp.br

www.clickmacae.com.br

www.engefac.com.br/corrosao.htm

www.francal.com.br/codigo/p_noticias-conteudo.asp?noticia_ID=1221

www.recuperar.com.br/revistas.htm

www.ufscar.br/centrodecienciasagrarias.htm

<http://www.recuperar.com.br/revistas.htm>

www.whitemartins.com.br

www.tabelaperiodica.hpg.ig.com.br/n.htm

APÊNDICE A

ALGORITMO PARA MAXIMIZAÇÃO E MINIMIZAÇÃO DAS RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

```
Pe:=proc();
restart;

lprint(#####);
lprint(' Programa implementado em fevereiro de 2005 (Claudio Roberto Duarte)');
lprint(' Este programa obtém os pontos de máximo, mínimo ou sela para um PE');
lprint(#####);

#Primeiramente obter a forma canônica para o modelo ajustado de ordem 2:

with(linalg):

    lprint(' Digite o numero de variaveis de planejamento:');

    condvariaveis:=readstat(``);

if condvariaveis=2 then

    lprint(' Entre com o valor do termo independente');
    t0:=readstat(``);
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1');
    t1:=readstat(``);
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X2');
    t2:=readstat(``);
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1^2');
    t11:=readstat(``);
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X2^2');
    t22:=readstat(``);
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1X2');
    t12:=readstat(``);

A:=matrix(2,2,[t11,t12/2,t12/2,t22]);

charpoly(A,lambda):
lambda:=eigenvals(A):
b:=matrix(2,1,[t1,t2]):
x0:=evalm(-0.5*inverse(A)&*b):

for i from 1 to 2 do X[i]:=x0[i,1] od:

#lprint('X1',X[1]);
#lprint('X2',X[2]);

#lprint('lambda[1]',lambda[1]);
#lprint('lambda[2]',lambda[2]);

y[0]:=t0+t1*X[1]+t2*X[2]+t11*X[1]^2+t22*X[2]^2+t12*X[1]*X[2];
```

```

if lambda[1]*lambda[2]>0 then
    if lambda[1]>0 then
        lprint('Este problema possui ponto de mínimo');
        lprint('X1',X[1]);
        lprint('X2',X[2]);

        fi;

        if lambda[1]<0 then
            lprint(' Este problema possui ponto de máximo');
            lprint('X1',X[1]);
            lprint('X2',X[2]);
            fi;

        fi;

#Portanto a forma canônica ajustada é :

if lambda[1]*lambda[2]<0 then

lprint('Este problema não possui ponto de máximo e nem de mínimo');
lprint('Você deseja maximizar [1] ou minimizar [2] a sua resposta:');
condiaux:=readstat('');

y:=y[0]+lambda[1]*w[1]^2 +lambda[2]*w[2]^2:

A:=matrix(2,2,[t11-lambda[1],t12/2,t12/2,t22-lambda[1]]):

m21:=1:

Mextra:=matrix(2,1,[m11,m21]):
Mat1:=evalm(A&*Mextra):

P1:=evalm(Mat1[1,1])=0:

#lprint('P1',P1);

P2:=evalm(Mat1[2,1])=0:

m11linha:=solve(P1,m11):

#lprint('m11linha',m11linha);

m21linha:=1:

#lprint('m21linha',m21linha);

produto:=(m11linha^2+m21linha^2)^(0.5):
m11:=m11linha/produto: m21:=m21linha/produto:

A:=matrix(2,2,[t11-lambda[2],t12/2,t12/2,t22-lambda[2]]):

m22:=1:

Mextra:=matrix(2,1,[m12,m22]):
Mat1:=evalm(A&*Mextra):

P1:=evalm(Mat1[1,1])=0:

```

```

P2:=evalm(Mat1[2,1])=0:
m12linha:=solve(P1,m12):

#lprint('m12linha',m12linha);

m22linha:=1:
produto:=(m12linha^2+m22linha^2)^(0.5):
m22:=m22linha/produto:
m12:=m12linha/produto:

#lprint('m11',m11);
#lprint('m12',m12);
#lprint('m21',m21);
#lprint('m22',m22);

Matrizm:=matrix(2,2,[m11,m12,m21,m22]):

transM:=transpose(Matrizm):

MatrizW:=matrix(2,1,[www1,www2]):
MatrizX:=matrix(2,1,[x1-X[1],x2-X[2]]):

Eq:=evalm(transM&*MatrizX):

#lprint('x1',x1);
#lprint('x2',x2);
#lprint('X[1]',X[1]);
#lprint('X[2]',X[2]);

#Como quero maximizar a resposta farei

if condiaux=1 then

if lambda[1]<0 then www1:=w1: www2:=w2: fi;
if lambda[1]>0 then www1:=w2: www2:=w1: fi;

w1:=0: cont:=0:

readlibe(unassign):

lprint(' Entre com a faixa para w: ');
lprint(' menor valor da faixa: ');
auxw1:=readstat(' ');
lprint(' maior valor da faixa: ');
auxw2:=readstat(' ');
lprint(' Entre com o incremento desejado: ');
increw:=readstat(' ');

for i from auxw1 to auxw2 by increw do w2:=i:
Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1]},{x1,x2}):
assign(Resp[cont]): Ww2[cont]:=w2: Xx1[cont]:=x1: Xx2[cont]:=x2: unassign('x1'): unassign('x2'):
cont:=cont+1: od:

aux:=1:

for i from 1 to (cont-2) do

if Xx2[i]>=-1 and Xx2[i]<=1 then
if Xx1[i]>=-1 and Xx1[i]<=1 then
Vx1[aux]:=Xx1[i]:

```

```

Vx2[aux]:=Xx2[i]:
Vw2[aux]:=Ww2[i]:
#print('O valor de x1 é=',Vx1[aux]);
#print('O valor de x2 é=',Vx2[aux]);
#print('O valor do vw2 é=',Vw2[aux]);
aux:=aux+1:
fi;
fi;

od:

Maxw2:=(max(seq(Vw2[i]^2,i=1..(aux-1))))^(0.5);

lprint('O valor do w2 máximo em modulo é=',Maxw2);

w2:=Maxw2: Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1]},{x1,x2}):
assign(Resp[cont]):

lprint('O valor de x1 é=',x1);
lprint('O valor de x2 é=',x2);

fi;

Var1:=x1:
Var2:=x2:
Var3:=0:

unassign('Var1'): unassign('Var2'):
Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-1..1,Var2=-1..1,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection =
ORTHOGONAL));

#Como quero minimizarr a resposta farei

if condiaux=2 then

if lambda[1]>0 then www1:=w1: www2:=w2: fi;
if lambda[1]<0 then www1:=w2: www2:=w1: fi;

w1:=0: cont:=0:

readlibe(unassign):

lprint('Entre com a faixa para w:');
lprint('menor valor da faixa:');
auxw1:=readstat('');
lprint('maior valor da faixa:');
auxw2:=readstat('');
lprint('Entre com o incremento desejado:');
increw:=readstat('');

for i from auxw1 to auxw2 by increw do w2:=i:
Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1]},{x1,x2}):
assign(Resp[cont]): Ww2[cont]:=w2: Xx1[cont]:=x1: Xx2[cont]:=x2: unassign('x1'): unassign('x2'):
cont:=cont+1: od:

aux:=1:

```

```

for i from 1 to (cont-2) do

    if Xx2[i]>=-1 and Xx2[i]<=1 then
    if Xx1[i]>=-1 and Xx1[i]<=1 then
    Vx1[aux]:=Xx1[i]:
    Vx2[aux]:=Xx2[i]:
    Vw2[aux]:=Ww2[i]:
    #lprint('O valor de x1 é=',Vx1[aux]);
    #lprint('O valor de x2 é=',Vx2[aux]);
    #lprint('O valor do vw2 é=',Vw2[aux]);
    aux:=aux+1:
    fi;
    fi;

od:

Maxw2:=(max(seq(Vw2[i]^2,i=1..(aux-1))))^(0.5);

lprint('O valor do w2 máximo em modulo é=',Maxw2);

w2:=Maxw2: Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1]},{x1,x2}):
assign(Resp[cont]):

lprint('O valor de x1 é=',x1);
lprint('O valor de x2 é=',x2);

fi;

fi;

fi;

if condvariaveis=3 then

    lprint(' Entre com o valor do termo independente');
    t0:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1');
    t1:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X2');
    t2:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X3');
    t3:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1^2');
    t11:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X2^2');
    t22:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X3^2');
    t33:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1X2');
    t12:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X1X3');
    t13:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor referente ao termo X2X3');
    t23:=readstat('');
    lprint(' Entre com o valor do alpha de ortogonalidade');
    alpha:=readstat('');

A:=matrix(3,3,[t11,t12/2,t13/2,t12/2,t22,t23/2,t13/2,t23/2,t33]);

print(evalm(A));

```



```

charpoly(A,lambda):
lambda:=[eigenvals(A)]:
b:=matrix(3,1,[t1,t2,t3]):
x0:=evalm(-0.5*inverse(A)&*b):

```

```

for i from 1 to 3 do X[i]:=x0[i,1] od:

```

```

y0:=t0+t1*X[1]+t2*X[2]+t3*X[3]+t11*X[1]^2+t22*X[2]^2+t33*X[3]^2+t12*X[1]*X[2]+t13*X[1]*X[3]+t23*
X[2]*X[3]:

```

```

#lprint('X1',X[1]);
#lprint('X2',X[2]);
#lprint('X3',X[3]);

```

```

#lprint('lambda[1]',lambda[1]);
#lprint('lambda[2]',lambda[2]);
#lprint('lambda[3]',lambda[3]);

```

```

if lambda[1]*lambda[2]>0 then

```

```

if lambda[2]*lambda[3]>0 then

```

```

    if lambda[1]>0 then
        lprint('Este problema possui ponto de mínimo');
        lprint('X1',X[1]);
        lprint('X2',X[2]);
        lprint('X3',X[3]);
        fi;

```

```

    if lambda[1]<0 then
        lprint('Este problema possui ponto de máximo');
        lprint('X1',X[1]);
        lprint('X2',X[2]);
        lprint('X3',X[3]);
        fi;

```

```

fi;

```

```

fi;

```

```

if lambda[1]*lambda[2]>0 and lambda[2]*lambda[3]<0 or lambda[1]*lambda[2]<0 and
lambda[2]*lambda[3]>0 then

```

```

    lprint('Este problema não possui ponto de máximo e nem de mínimo');
    lprint('Você deseja maximizar [1] ou minimizar [2] a sua resposta:');
    condiaux:=readstat('');

```

```

y:=y0+lambda[1]*w[1]^2 +lambda[2]*w[2]^2+lambda[3]*w[3]^2:

```

```

A:=matrix(3,3,[t11-lambda[1],t12/2,t13/2,t12/2,t22-lambda[1],t23/2,t13/2,t23/2,t33-lambda[1]]):

```

```

m31:=1:

```

```

Mextra:=matrix(3,1,[m11,m21,m31]):
Mat1:=evalm(A&*Mextra):

```

```

P1:=evalm(Mat1[1,1])=0:
#lprint('P1',P1);

P2:=evalm(Mat1[2,1])=0:
#lprint('P2',P2);

assign(solve({P1,P2},{m11,m21})):
m11linha:=m11:
m21linha:=m21:

m31linha:=1:

#lprint('m11linha',m11linha);
#lprint('m21linha',m21linha);
#lprint('m31linha',m31linha);

produto:=(m11linha^2+m21linha^2+m31linha^2)^(0.5):
m11:=m11linha/produto: m21:=m21linha/produto: m31:=m31linha/produto:

#lprint('m11',m11);
#lprint('m21',m21);
#lprint('m31',m31);
A:=matrix(3,3,[t11-lambda[2],t12/2,t13/2,t12/2,t22-lambda[2],t23/2,t13/2,t23/2,t33-lambda[2]]):
m32:=1:

Mextra:=matrix(3,1,[m12,m22,m32]):
Mat1:=evalm(A&*Mextra):

P1:=evalm(Mat1[1,1])=0:
P2:=evalm(Mat1[2,1])=0:

assign(solve({P1,P2},{m12,m22})):
m12linha:=m12:
m22linha:=m22:
m32linha:=1:

#lprint('m12linha',m12linha);
#lprint('m22linha',m22linha);
#lprint('m32linha',m32linha);

produto:=(m12linha^2+m22linha^2+m32linha^2)^(0.5):
m12:=m12linha/produto:
m22:=m22linha/produto:
m32:=m32linha/produto:

#lprint('m12',m12);
#lprint('m22',m22);
#lprint('m32',m32);

A:=matrix(3,3,[t11-lambda[3],t12/2,t13/2,t12/2,t22-lambda[3],t23/2,t13/2,t23/2,t33-lambda[3]]):
m33:=1:

Mextra:=matrix(3,1,[m13,m23,m33]):
Mat1:=evalm(A&*Mextra):

P1:=evalm(Mat1[1,1])=0:
P2:=evalm(Mat1[2,1])=0:

```

```

assign(solve( {P1,P2}, {m13,m23} )):
m13linha:=m13:
m23linha:=m23:
m33linha:=1:

#lprint('m13linha',m13linha);
#lprint('m23linha',m23linha);
#lprint('m33linha',m33linha);

produto:=(m13linha^2+m23linha^2+m33linha^2)^(0.5):
m13:=m13linha/produto:
m23:=m23linha/produto:
m33:=m33linha/produto:
#lprint('m13',m13);
#lprint('m23',m23);
#lprint('m33',m33);

Matrizm:=matrix(3,3,[m11,m12,m13,m21,m22,m23,m31,m32,m33]):

lprint('#####');
lprint(' A matriz m é:');
print(evalm(Matrizm));

lprint('#####');

transM:=transpose(Matrizm):

MatrizW:=matrix(3,1,[www1,www2,www3]):
MatrizX:=matrix(3,1,[x1-X[1],x2-X[2],x3-X[3]]):

Eq:=evalm(transM&*MatrizX):

#lprint('x1',x1);
#lprint('x2',x2);
#lprint('x3',x3);
#lprint('X[1]',X[1]);
#lprint('X[2]',X[2]);
#lprint('X[3]',X[3]);

#Como quero maximizar a resposta farei

if condiaux=1 then

auxpositivo:=sort([seq(lambda[i],i=1..3)]);

#Condição para que duas raízes lambda sejam negativa e pretendo maximizar a resposta

if lambda[1]*lambda[2]*lambda[3]> 0 then

if lambda[1]>0 then www1:=w1: www2:=w2: www3:=w3: fi;
if lambda[2]>0 then www1:=w2: www2:=w1: www3:=w3: fi;
if lambda[3]>0 then www1:=w2: www2:=w3: www3:=w1: fi;

w2:=0: w3:=0: cont:=0:

lprint(' Entre com a faixa para w:');
lprint(' menor valor da faixa:');

```

```

auxw1:=readstat(`);
lprint(`maior valor da faixa:`);
auxw2:=readstat(`);
lprint(`Entre com o incremento desejado:`);
increw:=readstat(`);

readlibe(unassign):

for i from auxw1 to auxw2 by increw do w1:=i:
Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resp[cont]): Ww1[cont]:=w1: Xx1[cont]:=x1: Xx2[cont]:=x2: Xx3[cont]:=x3: unassign('x1'):
unassign('x2'): unassign('x3'):cont:=cont+1: od;
aux:=1:

for i from 1 to (cont-2) do

    if Xx2[i]>=-alpha and Xx2[i]<=alpha then
    if Xx1[i]>=-alpha and Xx1[i]<=alpha then
    if Xx3[i]>=-alpha and Xx3[i]<=alpha then
    Vx1[aux]:=Xx1[i]:
    Vx2[aux]:=Xx2[i]:
    Vx3[aux]:=Xx3[i]:
    Vw1[aux]:=Ww1[i]:
    #lprint(`O valor de x1 é=`,Vx1[aux]);
    #lprint(`O valor de x2 é=`,Vx2[aux]);
    #lprint(`O valor do vw2 é=`,Vw2[aux]);
    aux:=aux+1:
    fi;
    fi;
    fi;

od;

Maxw1:=(max(seq(Vw1[i]^2,i=1..(aux-1))))^(0.5);

lprint(`O valor do w máximo em modulo é=`,Maxw1);

w1:=Maxw1:
Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resp[cont]):

lprint(`O valor de x1 é=`,x1);
lprint(`O valor de x2 é=`,x2);
lprint(`O valor de x3 é=`,x3);

Var1:=x1:
Var2:=x2:
Var3:=x3:

unassign('Var1'): unassign('Var2'):
Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var2=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var1'): unassign('Var3'): Var2:=x2:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):

```

```

print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var2'): unassign('Var3'): Var1:=x1:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(x2)+t13*(Va
r1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var2=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

fi; #Finaliza a Condição para que duas raízes lambda sejam negativa e pretendo maximizar a resposta

#Condição para que uma raiz lambda seja negativa e pretendo maximizar a resposta

if lambda[1]*lambda[2]*lambda[3]< 0 then

#MatrizW:=matrix(3,1,[www1,www2,www3]):

if lambda[1]<0 then www1:=w3: www2:=w1: www3:=w2: fi;
if lambda[2]<0 then www1:=w1: www2:=w3: www3:=w2: fi;
if lambda[3]<0 then www1:=w1: www2:=w2: www3:=w3: fi;
w3:=0: cont:=0: cont2:=0:

readlibe(unassign):

lprint(' Entre com a faixa para w:');
lprint(' menor valor da faixa:');
auxw1:=readstat('');
lprint(' maior valor da faixa:');
auxw2:=readstat('');
lprint(' Entre com o incremento desejado:');
increw:=readstat('');

for i from auxw1 to auxw2 by increw do w1:=i: cont2:=0:
for j from auxw1 to auxw2 by increw do w2:=j:
Resp[cont,cont2]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resp[cont,cont2]): Ww1[cont,cont2]:=w1: Ww2[cont,cont2]:=w2: Xx1[cont,cont2]:=x1:
Xx2[cont,cont2]:=x2: Xx3[cont,cont2]:=x3: unassign('x1'): unassign('x2'): unassign('x3'):
cont2:=cont2+1: od; cont:=cont+1: od;

aux:=1:

contador:=(auxw2-auxw1)/increw;

for i from 0 to (contador) do
for j from 0 to (contador) do

if Xx2[i,j]>=-alpha and Xx2[i,j]<=alpha then
if Xx1[i,j]>=-alpha and Xx1[i,j]<=alpha then
if Xx3[i,j]>=-alpha and Xx3[i,j]<=alpha then
Vx1[aux]:=Xx1[i,j];
Vx2[aux]:=Xx2[i,j];
Vx3[aux]:=Xx3[i,j];
Vw1[aux]:=Ww1[i,j];
Vw2[aux]:=Ww2[i,j];
#AuxWmax[aux]:=y0+lambda[1]*Ww1[i,j]^2 +lambda[2]*Ww2[i,j]^2+lambda[3]*Ww3[i,j]^2:
#lprint('O valor de x1[',aux,'] é=',Vx1[aux]);
#lprint('O valor de x2[',aux,'] é=',Vx2[aux]);
#lprint('O valor de x3[',aux,'] é=',Vx3[aux]);

```

```

#lprint('O valor do vw2 é=',Vw2[aux]);
#lprint('O valor de vw1 é=',Vw1[aux]);
  codi:=i:
  codj:=j:
  aux:=aux+1:
    fi;
    fi;
    fi;
od;

od;

#lprint('codi',(codi-1));
#lprint('codj',(codj-1));

for i from 1 to (aux-1) do

if lambda[1]<0 then AWW1[i]:=0: AWW2[i]:=Vw1[i]: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[2]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=0: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[3]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=Vw2[i]: AWW3[i]:=0: fi;

AuxWmax[i]:=y0+lambda[1]*AWW1[i]^2 +lambda[2]*AWW2[i]^2+lambda[3]*AWW3[i]^2:
#lprint(' AuxWmax[',i,']é:',AuxWmax[i]);
#lprint(' W1[',i,']',AWW1[i]);
#lprint(' W2[',i,']',AWW2[i]);
#lprint(' W3[',i,']',AWW3[i]);
od;

#lprint('O valor do lambda1',lambda[1]);
#lprint('O valor do lambda2',lambda[2]);
#lprint('O valor do lambda3',lambda[3]);

valormaximoW:=max(seq(AuxWmax[i],i=1..(aux-1)));
lprint('valor máximo da eq',valormaximoW);

for i from 1 to (aux-1) do

if lambda[1]<0 then AWW1[i]:=0: AWW2[i]:=Vw1[i]: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[2]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=0: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[3]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=Vw2[i]: AWW3[i]:=0: fi;

if valormaximoW=(y0+lambda[1]*AWW1[i]^2 +lambda[2]*AWW2[i]^2+lambda[3]*AWW3[i]^2) then

  if lambda[1]<0 then w3:=0: w1:=Vw1[i]: w2:=Vw2[i]: fi;
  if lambda[2]<0 then w1:=Vw1[i]: w3:=0: w2:=Vw2[i]: fi;
  if lambda[3]<0 then w1:=Vw1[i]: w2:=Vw2[i]: w3:=0: fi;

lprint('W1',AWW1[i]);
lprint('W2',AWW2[i]);
lprint('W3',AWW3[i]);

  fi;
od;

#AuxWmax[0]:=0:

```

```

#for i from 1 to (aux-1) do

  #if AuxWmax[i]<= AuxWmax[i-1] then

    #AuxWmax[i]:=AuxWmax[i-1]:

    # if lambda[1]<0 then w3:=0: w1:=AWW2[i]: w2:=AWW3[i]: fi;
    # if lambda[2]<0 then w1:=AWW1[i]: w3:=0: w2:=AWW3[i]: fi;
    # if lambda[3]<0 then w1:=AWW1[i]: w2:=AWW2[i]: w3:=0: fi;

    #lprint('O valor do AuxWmax[i] máximo é=',AuxWmax[i]);
    #lprint('O valor do w1 máximo é=',w1);
    #lprint('O valor do w2 máximo é=',w2);
    # fi;
  #od;

#lprint('O valor maximo da eq é:',AuxWmax[aux-1]);

  #for j from 1 to (cont-2) do
  #Maxw1[1]:=max(seq(Vw1[i],i=1..(aux-1)));
  #Maxw2[1]:=max(seq(Vw2[i],i=1..(aux-1)));
  #od;

#MAXw1:=max(seq( Maxw1[j],j=1..(aux-1)));
#MAXw2:=max(seq( Maxw2[j],j=1..(aux-1)));

lprint('O valor do w1 máximo é=',w1);
lprint('O valor do w2 máximo é=',w2);

Resposta[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resposta[cont]):

lprint('O valor de x1 é=',x1);
lprint('O valor de x2 é=',x2);
lprint('O valor de x3 é=',x3);

Var1:=x1:
Var2:=x2:
Var3:=x3:

unassign('Var1'): unassign('Var2'):
Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var2=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var1'): unassign('Var3'): Var2:=x2:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var2'): unassign('Var3'): Var1:=x1:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(x2)+t13*(Va
r1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):

```

```
print(plot3d(Eqextra,Var2=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));
```

```
fi; #Finaliza a Condição para que duas raízes lambda sejam negativa e pretendo maximizar a resposta
```

```
fi;
```

```
*****
*****
```

```
#Como quero minimizar a resposta farei
```

```
*****
*****
```

```
if condiaux=2 then
```

```
auxpositivo:=sort([seq(lambda[i],i=1..3)]);
```

```
#Condição para que duas raízes lambda sejam positiva e pretendo minimizar a resposta
```

```
if lambda[1]*lambda[2]*lambda[3]< 0 then
```

```
if lambda[1]<0 then www1:=w1: www2:=w2: www3:=w3: fi;
```

```
if lambda[2]<0 then www1:=w2: www2:=w1: www3:=w3: fi;
```

```
if lambda[3]<0 then www1:=w2: www2:=w3: www3:=w1: fi;
```

```
w2:=0: w3:=0: cont:=0:
```

```
lprint(' Entre com a faixa para w: ');
```

```
lprint(' menor valor da faixa: ');
```

```
auxw1:=readstat(' ');
```

```
lprint(' maior valor da faixa: ');
```

```
auxw2:=readstat(' ');
```

```
lprint(' Entre com o incremento desejado: ');
```

```
increw:=readstat(' ');
```

```
readlibe(unassign):
```

```
for i from auxw1 to auxw2 by increw do w1:=i:
```

```
Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
```

```
assign(Resp[cont]): Ww1[cont]:=w1: Xx1[cont]:=x1: Xx2[cont]:=x2: Xx3[cont]:=x3: unassign('x1');
```

```
unassign('x2'): unassign('x3'):cont:=cont+1: od;
```

```
aux:=1:
```

```
for i from 1 to (cont-2) do
```

```
if Xx2[i]>=-alpha and Xx2[i]<=alpha then
```

```
if Xx1[i]>=-alpha and Xx1[i]<=alpha then
```

```
if Xx3[i]>=-alpha and Xx3[i]<=alpha then
```

```
Vx1[aux]:=Xx1[i]:
```

```
Vx2[aux]:=Xx2[i]:
```

```
Vx3[aux]:=Xx3[i]:
```

```
Vw1[aux]:=Ww1[i]:
```

```
#lprint('O valor de x1 é=',Vx1[aux]);
```

```
#lprint('O valor do vw2 é=',Vw2[aux]);
```

```
aux:=aux+1:
```

```
fi;
```



```

fi;
fi;

od;

#Maxw1:=(min(seq(Vw1[i]^2,i=1..(aux-1))))^(0.5);
Maxw1:=(min(seq(Vw1[i],i=1..(aux-1))));

lprint('O valor do w mínimo em modulo é=',Maxw1);

w1:=Maxw1:
Resp[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resp[cont]):

Eqfinal:=t0+t1*x1+t2*x2+t3*x3+t11*(x1)^2+t22*(x2)^2+t33*(x3)^2+t12*(x1)*(x2)+t13*(x1)*(x3)+t23*(x2)*(
x3):
lprint('O valor mínimo da resposta é ',Eqfinal);

lprint('O valor de x1 é=',x1);
lprint('O valor de x2 é=',x2);
lprint('O valor de x3 é=',x3);

Var1:=x1:
Var2:=x2:
Var3:=x3:

unassign('Var1'): unassign('Var2'):
Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var2=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var1'): unassign('Var3'): Var2:=x2:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var2'): unassign('Var3'): Var1:=x1:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(x2)+t13*(Va
r1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var2=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

fi; #Finaliza a Condição para que duas raízes lambda sejam negativa e pretendo minimizar a resposta

#Condição para que uma raiz lambda seja positiva e pretendo minimizar a resposta

if lambda[1]*lambda[2]*lambda[3]> 0 then

#MatrizW:=matrix(3,1,[www1,www2,www3]):

if lambda[1]>0 then www1:=w3: www2:=w1: www3:=w2: fi;
if lambda[2]>0 then www1:=w1: www2:=w3: www3:=w2: fi;
if lambda[3]>0 then www1:=w1: www2:=w2: www3:=w3: fi;

```

```

w3:=0: cont:=0: cont2:=0:

readlibe(unassign):

lprint('Entre com a faixa para w:'):
lprint('menor valor da faixa:');
auxw1:=readstat('');
lprint('maior valor da faixa:');
auxw2:=readstat('');
lprint('Entre com o incremento desejado:');
increw:=readstat('');

for i from auxw1 to auxw2 by increw do w1:=i: cont2:=0:
for j from auxw1 to auxw2 by increw do w2:=j:
Resp[cont,cont2]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resp[cont,cont2]): Ww1[cont,cont2]:=w1: Ww2[cont,cont2]:=w2: Xx1[cont,cont2]:=x1:
Xx2[cont,cont2]:=x2: Xx3[cont,cont2]:=x3: unassign('x1'): unassign('x2'): unassign('x3'): cont2:=cont2+1:
od; cont:=cont+1: od;

aux:=1:

    contador:=(auxw2-auxw1)/increw;

for i from 0 to (contador) do
for j from 0 to (contador) do

    if Xx2[i,j]>=-alpha and Xx2[i,j]<=alpha then
    if Xx1[i,j]>=-alpha and Xx1[i,j]<=alpha then
    if Xx3[i,j]>=-alpha and Xx3[i,j]<=alpha then
    Vx1[aux]:=Xx1[i,j];
    Vx2[aux]:=Xx2[i,j];
    Vx3[aux]:=Xx3[i,j];
    Vw1[aux]:=Ww1[i,j];
    Vw2[aux]:=Ww2[i,j];
    #AuxWmax[aux]:=y0+lambda[1]*Ww1[i,j]^2 +lambda[2]*Ww2[i,j]^2+lambda[3]*Ww3[i,j]^2:
    #lprint('O valor de x1[',aux,'] é=',Vx1[aux]);
    #lprint('O valor de x2[',aux,'] é=',Vx2[aux]);
    #lprint('O valor de x3[',aux,'] é=',Vx3[aux]);
    #lprint('O valor do vw2 é=',Vw2[aux]);
    #lprint('O valor de vw1 é=',Vw1[aux]);
        codi:=i:
        codj:=j:
        aux:=aux+1:
            fi;
            fi;
            fi;
od;

od;

#lprint('codi',(codi-1));
#lprint('codj',(codj-1));

for i from 1 to (aux-1) do

if lambda[1]<0 then AWW1[i]:=0: AWW2[i]:=Vw1[i]: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[2]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=0: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[3]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=Vw2[i]: AWW3[i]:=0: fi;

```

```

AuxWmax[i]:=y0+lambda[1]*AWW1[i]^2 +lambda[2]*AWW2[i]^2+lambda[3]*AWW3[i]^2:
#print(' AuxWmax[',i,']é:',AuxWmax[i]);
#print(' W1[',i,']',AWW1[i]);
#print(' W2[',i,']',AWW2[i]);
#print(' W3[',i,']',AWW3[i]);
od;

#print(' O valor do lambda1',lambda[1]);
#print(' O valor do lambda2',lambda[2]);
#print(' O valor do lambda3',lambda[3]);

valormaximoW:=min(seq(AuxWmax[i],i=1..(aux-1)));
lprint(' valor mínimo da eq',valormaximoW);

for i from 1 to (aux-1) do

if lambda[1]<0 then AWW1[i]:=0: AWW2[i]:=Vw1[i]: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[2]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=0: AWW3[i]:=Vw2[i]: fi;
if lambda[3]<0 then AWW1[i]:=Vw1[i]: AWW2[i]:=Vw2[i]: AWW3[i]:=0: fi;

if valormaximoW=(y0+lambda[1]*AWW1[i]^2 +lambda[2]*AWW2[i]^2+lambda[3]*AWW3[i]^2) then

    if lambda[1]<0 then w3:=0: w1:=Vw1[i]: w2:=Vw2[i]: fi;
    if lambda[2]<0 then w1:=Vw1[i]: w3:=0: w2:=Vw2[i]: fi;
    if lambda[3]<0 then w1:=Vw1[i]: w2:=Vw2[i]: w3:=0: fi;

lprint(' W1',AWW1[i]);
lprint(' W2',AWW2[i]);
lprint(' W3',AWW3[i]);

    fi;
od;

#AuxWmax[0]:=0:

#for i from 1 to (aux-1) do

    #if AuxWmax[i]<= AuxWmax[i-1] then

        #AuxWmax[i]:=AuxWmax[i-1]:

            # if lambda[1]<0 then w3:=0: w1:=AWW2[i]: w2:=AWW3[i]: fi;
            # if lambda[2]<0 then w1:=AWW1[i]: w3:=0: w2:=AWW3[i]: fi;
            # if lambda[3]<0 then w1:=AWW1[i]: w2:=AWW2[i]: w3:=0: fi;

            #lprint(' O valor do AuxWmax[i] mínimo é=',AuxWmax[i]);
            #lprint(' O valor do w1 mínimo é=',w1);
            #lprint(' O valor do w2 mínimo é=',w2);
            # fi;
        #od;

#lprint(' O valor mínimo da eq é:',AuxWmax[aux-1]);

#for j from 1 to (cont-2) do

```

```

#Maxw1[1]:=max(seq(Vw1[i],i=1..(aux-1)));
#Maxw2[1]:=max(seq(Vw2[i],i=1..(aux-1)));
#od;

#MAXw1:=max(seq( Maxw1[j],j=1..(aux-1)));
#MAXw2:=max(seq( Maxw2[j],j=1..(aux-1)));

lprint(`O valor do w1 mínimo é=`,w1);
lprint(`O valor do w2 mínimo é=`,w2);
lprint(`O valor do w3 mínimo é=`,w3);

Resposta[cont]:=solve({Eq[1,1]=MatrizW[1,1],Eq[2,1]=MatrizW[2,1],Eq[3,1]=MatrizW[3,1]},{x1,x2,x3}):
assign(Resposta[cont]);

lprint(`O valor de x1 é=`,x1);
lprint(`O valor de x2 é=`,x2);
lprint(`O valor de x3 é=`,x3);

Var1:=x1:
Var2:=x2:
Var3:=x3:

unassign('Var1'): unassign('Var2'):
Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var2=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

unassign('Var1'): unassign('Var3'): Var2:=x2:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(Var2)+t13*(
Var1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var1=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));
unassign('Var2'): unassign('Var3'): Var1:=x1:

Eqextra:=t0+t1*Var1+t2*Var2+t3*Var3+t11*(Var1)^2+t22*(Var2)^2+t33*(Var3)^2+t12*(Var1)*(x2)+t13*(Va
r1)*(Var3)+t23*(Var2)*(Var3):
print(plot3d(Eqextra,Var2=-alpha..alpha,Var3=-
alpha..alpha,style=PATCHCONTOUR,axes=BOXED,projection = ORTHOGONAL));

fi; #Finaliza a Condição para que duas raízes lambda sejam negativa e pretendo minimizar a resposta

fi;

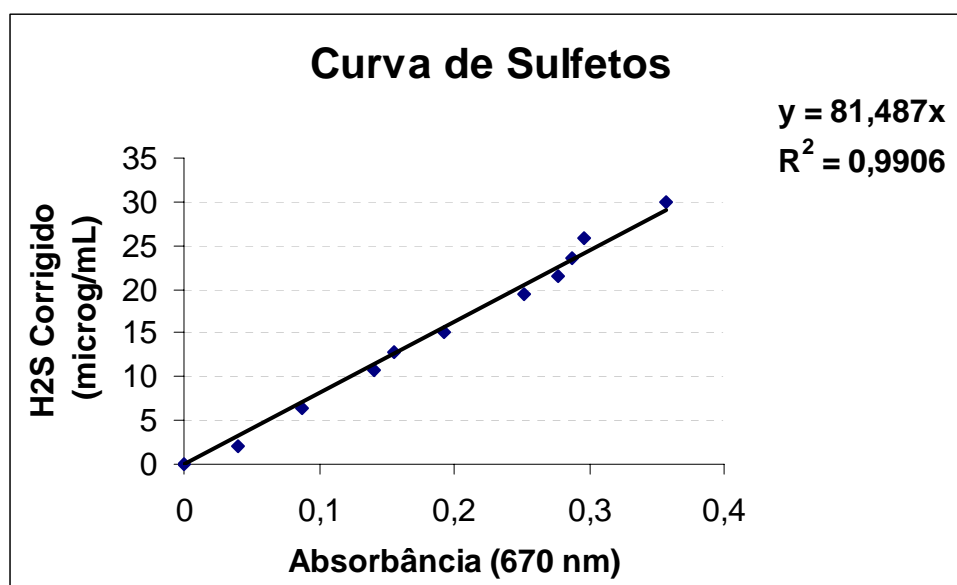
fi;

end;

```

APÊNDICE B

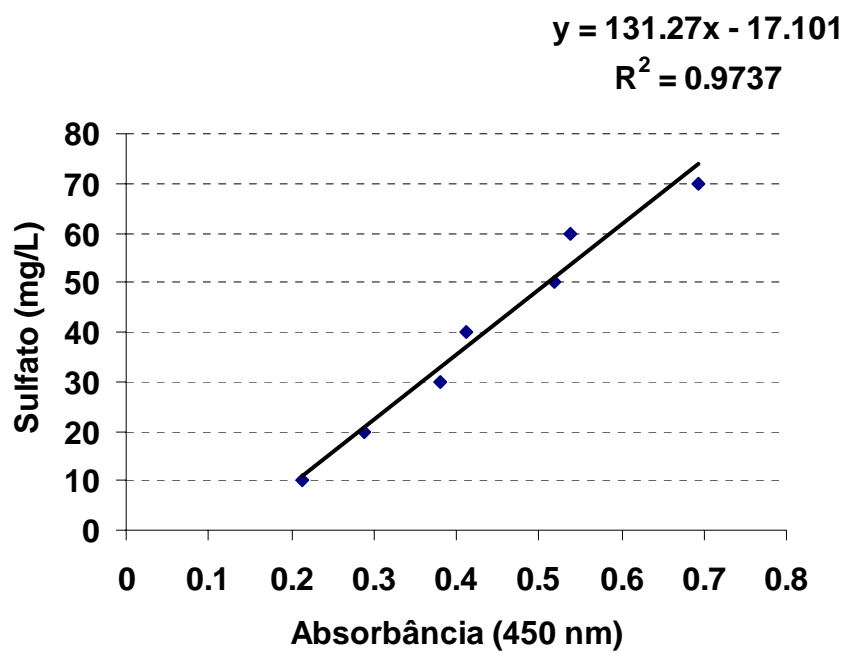
CURVA PADRÃO DE SULFETO



H ₂ S (mg/L)	Absorbância (670 nm)
0	0
2,148	0,051
6,443	0,131
10,739	0,270
12,888	0,311
15,036	0,448
19,331	0,252
21,479	0,277
23,627	0,288
25,775	0,296
30,071	0,357

APÊNDICE C

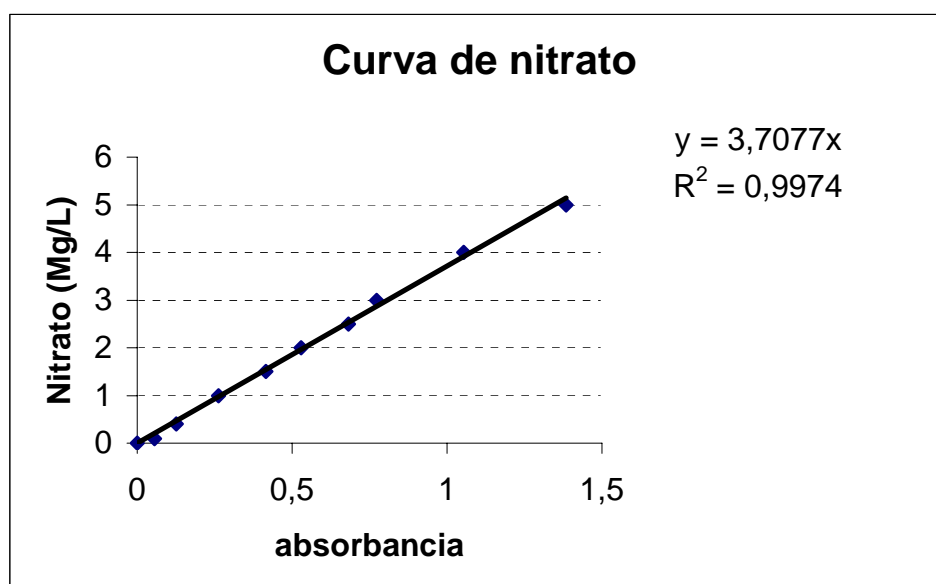
CURVA PADRÃO DE SULFATO



Sulfato (mg/L)	Absorbância (450 nm)
10	0,214
20	0,288
30	0,380
40	0,413
50	0,518
60	0,539
70	0,693

APÊNDICE D

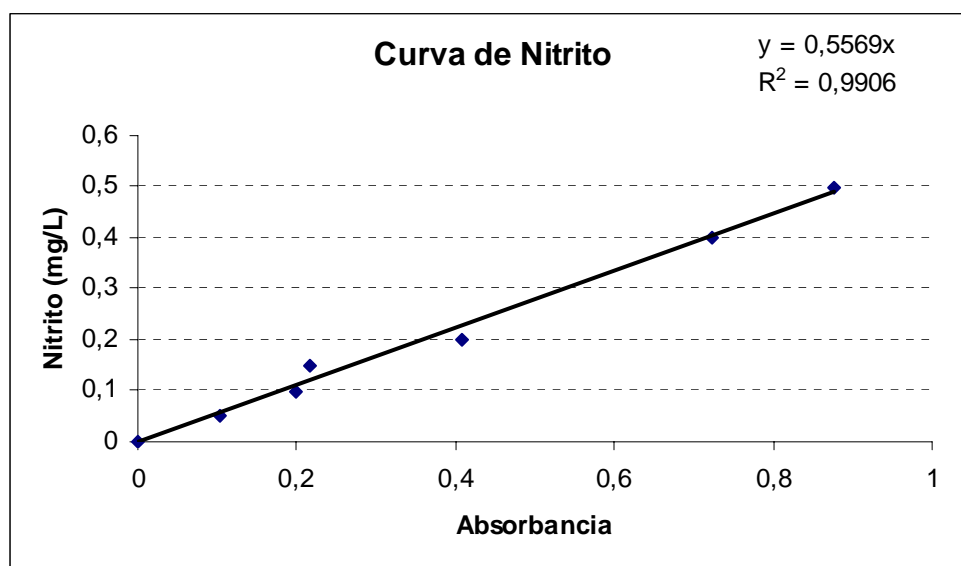
CURVA PADRÃO DE NITRATO



Nitrato (mg/L)	Absorbância (880 nm)
0	0
0,055	0,1
0,126	0,4
0,263	1
0,416	1,5
0,528	2
0,681	2,5
0,772	3
1,053	4
1,385	5

APÊNDICE E

CURVA PADRÃO DE NITRITO



Nitrato (mg/L)	Absorbância (880 nm)
0	0
0,103	0,05
0,198	0,1
0,217	0,15
0,409	0,2
0,724	0,4
0,877	0,5