



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CATIA LARISSA SANTOS RAMOS

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA
DE SULFATO**

Salvador
2013

CATIA LARISSA SANTOS RAMOS

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA
DE SULFATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Orientador: Dra. Leticia Alonso Bernardez

Co-Orientador: Dr. Paulo Fernando de Almeida

Salvador
2013

AGRADECIMENTOS

São tantos agradecimentos, principalmente para aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe, Ana Lúcia pelas orações, pelo amor incondicional e pelas palavras de incentivo nos momentos em que pensei em desistir.

À meu irmão, Wagner que acreditou em mim, ajudando a sua maneira nos momentos críticos.

À meu amigos e parentes que sempre estiveram ao meu lado torcendo e vibrando com cada vitória.

À Ciro, meu namorado, pelo carinho, compreensão e apoio na reta final dessa conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da UFBA, pelo apoio, pela infraestrutura e pela qualidade dos seus professores, pesquisadores e funcionários.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro ao projeto.

À professora Letícia, minha orientadora, pela oportunidade, apoio e ensinamentos que foram importantes nesta etapa acadêmica.

Ao professor Paulo Almeida, meu orientador, por acreditar em meu potencial, pelos ensinamentos que foram essenciais para a minha formação profissional e por me apresentar ao mundo da Microbiologia.

Ao professor Luiz Rogério, que sempre esteve disposto a ajudar no desenvolvimento dos métodos analíticos e nos tratamentos de dados.

À Leila, que sempre esteve disponível para ajudar nos problemas operacionais que ocorreram ao longo dos experimentos.

À família LABEM, pela ajuda, pelos momentos de descontração e pela amizade construída.

Por fim agradeço a meu Anjo da Guarda, meu Pai. Sei que de onde estiver estará vibrando com mais esta conquista.

RAMOS, Catia Larissa Santos. Avaliação da cinética de redução microbiológica de sulfato. 2013. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

A pesquisa desenvolvida tem como objetivo estudar a cinética de crescimento de bactérias redutoras de sulfato em reator de leito fixo avaliando o efeito da concentração do aceptor final de elétrons (sulfato) no aumento da população microbiana. Para isso foi utilizado um consórcio de micro-organismos isolado a partir de amostras de água produzida de um reservatório da Bacia do Recôncavo que apresentava produção de H₂S (gás sulfídrico). As concentrações de sulfato e sulfeto em solução aquosa, assim como o potencial de oxidação-redução, foram medidos ao longo da duração do experimento para acompanhar o crescimento microbiano. Foram utilizadas três concentrações iniciais de sulfato: 200, 1000 e 3500 mg/L. Os resultados indicam o crescimento e a atividade das bactérias assim como a diminuição exponencial da concentração de sulfato na fase descontínua do experimento. O ajuste de modelos cinéticos indicou que a conversão do sulfato e a geração do sulfeto são ambos processos de primeira ordem e que a primeira reação é mais rápida que a segunda.

Palavras chave: Bactérias redutoras de sulfato, cinética de crescimento bacteriano.

RAMOS, Catia Larissa Santos. Kinetic evaluation of microbiological reduction of sulfate. 2013. Master Dissertation. Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

The research undertaken aims to study the kinetics of growth of sulfate-reducing bacteria in a fixed bed reactor evaluating the effect of the concentration of the final acceptor of electrons (sulfate) in increasing the microbial population. For this we used a consortium of micro-organisms isolated from water samples produced from a reservoir of the Reconcavo Basin with production of H₂S (hydrogen sulfide). The concentrations of sulfate and sulfide in aqueous solution, as the oxidation-reduction potential were measured over the duration of the experiment to monitor microbial growth. Three initial concentrations of sulfate: 200, 1000 and 3500 mg/L were used. The results indicated the growth and the activity of bacteria as well as the exponential decrease of the sulfate concentration in the discontinuous phase of the experiment. The adjustment of kinetic models indicated that the conversion of sulfate and sulfide are both first order processes and that the former reaction is faster than the second.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, bacterial growth kinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do Ciclo do Enxofre.....	11
Figura 2: <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	13
Figura 3: <i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	13
Figura 4: Diagrama de predominância das espécies de sulfeto em função do pH.....	14
Figura 5: Diagrama esquemático da montagem experimental.....	26
Figura 6: Sistema experimental em funcionamento.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO LITERATURA	11
2.1 CICLO DO ENXOFRE	11
2.2 BACTERIAS REDUTORAS DE SULFATO	12
2.3 FONTES DE CARBONO E METABOLISMO MICROBIANO	14
2.4 CINÉTICA DE REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SULFATO	17
2.5 REATORES UTILIZADOS EM ESTUDO CINÉTICO	19
2.6 PARÂMETROS QUE INFLUÊNCIAM A CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BRS	23
2.6.1 Concentração de Sulfato	24
2.6.2 Temperatura	24
2.6.3 pH	25
3. METODOLOGIA	26
3.1 EXPERIMENTOS CINÉTICOS EM REATOR DE LEITO FIXO	26
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	29
3.2.1 Cromatografia Iônica	29
3.2.2 Concentração de Sulfato em Solução	29
3.2.3 Concentração de Sulfeto em Solução	30
3.2.4 Potencial Redox (Eh) e pH do Meio	30
3.3 MODELAGEM CINÉTICA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SULFATO: CINÉTICA PARA BAIXA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO	33
KINETIC ANALYSIS OF MICROBIAL SULFATE REDUCTION IN AN UPFLOW PACKED-BED ANAEROBIC	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6. REFERÊNCIA	66

1. INTRODUÇÃO

A indústria de petróleo enfrenta problemas associados à presença de gás sulfídrico, que é tóxico e corrosivo, no processo de produção de óleo e gás. Uma das fontes de produção de gás sulfídrico é a biosulfetogênese, que ocorre devido à presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) nos poços de petróleo. A produção de gás sulfídrico constitui sério problema econômico para a indústria de petróleo e gás natural já que afeta os sistemas de produção, transporte e armazenamento de óleos e a qualidade do petróleo produzido (OKABE et al., 1995; HUPERT et al., 2003, 2005; KJELLERUP et al., 2005; ZHANG et al., 2008). Alguns estudiosos acreditam que as BRS foram introduzidas neste ambiente juntamente com a água de injeção que é utilizada na recuperação secundária do óleo já que os efeitos da presença de BRS em poços de petróleo são mais intensos quando é utilizada a água do mar para recuperação secundária (BENKA-COKER et al., 1995; BAO et al., 2009). Isto acontece, pois a água do mar é rica em sulfatos aumentando a concentração do ânion no meio que juntamente com outros nutrientes favorece o crescimento das redutoras de sulfato. A teoria mais aceita é que as redutoras de sulfato são micro-organismos autóctones dos reservatórios (BENKA-COKER et al., 1995; BAO et al., 2009). Reservatórios com grande quantidade de óleos parafínicos oferece as cadeias simples de carbono necessárias para o crescimento bacteriano (CORD-RUWISCH et al., 1987; BENKA-COKER et al., 1995).

O custo de produção de petróleo aumenta consideravelmente devido a presença de BRS já que é fundamental a retirada do gás sulfídrico antes do processamento do óleo para evitar a contaminação de catalisadores e a corrosão de equipamentos (TANG et al., 2009). Existem algumas formas de controlar a presença das BRSs em poços de petróleo. Quando o poço precisa de injeção de água, o sulfato existente no líquido pode ser retirado, porém devido ao volume utilizado na recuperação secundária, o processo se torna caro. A adição de biocidas a base de glutaraldeído ou de cocodiamina juntamente com a água de injeção é um procedimento bastante adotado. Os biocidas são substâncias químicas com elevado poder antibacteriano, porém muitos não são biodegradáveis além de possuírem custo elevado (NEMATI et al., 2001), além de serem corrosivos em concentrações elevadas (HUBERT et al., 2005).

Métodos alternativos ao uso de biocida no controle das BRS em poços de petróleo foram propostos, como por exemplo, a utilização de análogos de sulfato (molibdato, tungstato, selenato e cromato) em diferentes concentrações (PATIDAR;

TARE, 2005; CHOU et al., 2008; ZHANG et al., 2008), ou o estímulo da biocompetição entre as redutoras de sulfato e as bactérias heterotróficas redutoras de nitrato ou nitrito (hBRN) (HUBERT et al., 2005).

Dentro deste contexto, o estudo da cinética do crescimento de populações de bactérias redutoras de sulfato coletadas em campos de produção usando ambiente controlado é de fundamental importância para o conhecimento e controle deste processo.

O objetivo desta pesquisa é a avaliação da cinética de bactérias redutoras de sulfato. Os objetivos específicos do projeto incluem experimentos em laboratório envolvendo ensaios para avaliação de um dos principais fatores que afeta o processo: a concentração inicial de sulfato. Os experimentos foram realizados utilizando reator de vidro e as bactérias redutoras de sulfato foram isoladas de campos de petróleo da bacia do Recôncavo Baiano nos quais ocorre produção de gás sulfídrico.

2. REVISÃO LITERATURA

As bactérias são micro-organismos que estão presentes em quase todos os ambientes. Elas podem ser encontradas nas situações mais extremas de temperatura e pressão, em anaerobiose e/ou aerobiose utilizando as mais diversas fontes de nutrientes para sua sobrevivência. As redutoras de sulfato são bactérias que desempenham papel importante na redução de sulfato do ambiente em que se encontram. Suas características metabólicas juntamente com os parâmetros que influenciam a sua cinética de crescimento serão apresentados neste capítulo.

2.1 CICLO DO ENXOFRE

No meio ambiente existem diversos elementos que são de fundamental importância para a vida como, por exemplo, o nitrogênio, o carbono e o enxofre. O enxofre pode existir de diversas formas já que possui três números de oxidação: -2 (sulfeto), 0 (enxofre elementar) e +6 (sulfato) (TANG et al., 2009). O enxofre oxidado é a forma mais abundante e pode ser encontrado no solo, nas rochas, no mar e em rios. Na atmosfera, os óxidos de enxofre são pouco encontrados. A redução de sulfato da mesma forma que a fixação de nitrogênio e a produção de oxigênio são de fundamental importância para a vida na Terra (POSTGATE, 1979). A transformação do enxofre de um estado de oxidação para outro acontece devido à ação de agentes químicos e biológicos. O esquema resumido do ciclo microbiológico do enxofre é apresentado abaixo (TANG et al., 2009):

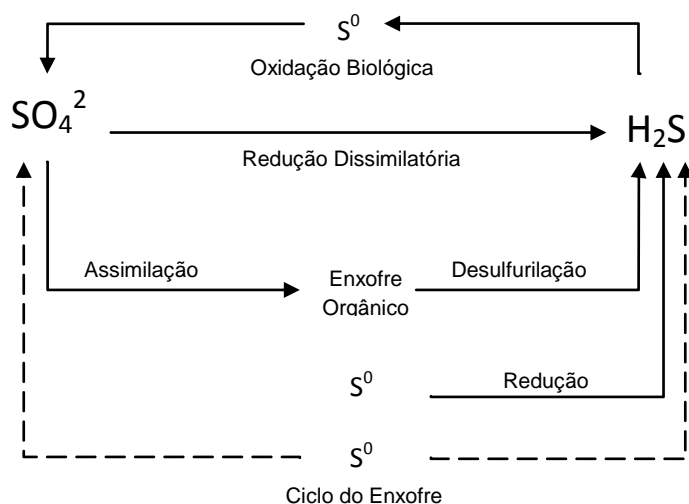


Figura 1: Representação esquemática do ciclo do enxofre microbiano

Como apresentado na Figura 1, para que a assimilação do enxofre por organismos superiores se torne possível, é necessário que micro-organismos oxidem o enxofre elementar a sulfatos. É necessária a ação de bactérias fototróficas ou quimiolitotróficas que utilizam o sulfeto para produzir o enxofre elementar que pode ser transformado em sulfato. Neste processo podem participar bactérias ftopigmentadas dos gêneros *Chlorobium* e *Pelodityon*. Porém, as mais ativas neste processo são as não ftopigmentadas em especial as do gênero *Thiobacillus*, que podem gerar ácido sulfúrico durante o processo. O sulfato produzido biologicamente ou existente no meio pode ser utilizado como acceptor de elétrons para o metabolismo de um grupo de bactérias com características especiais: as bactérias redutoras de sulfato.

A etapa na qual participa as bactérias do gênero *Desulfovibrio* chama-se Redução Dissimilatória do Sulfato. Neste processo o íon sulfato atua como um agente oxidante para dissimilação da matéria orgânica, assim como o oxigênio na respiração convencional. As bactérias redutoras do sulfato utilizam este íon que são reduzidos a sulfeto de hidrogênio (H₂S). Seu papel no ciclo do enxofre pode ser comparado ao papel das bactérias redutoras de nitrato no ciclo do nitrogênio. Além das bactérias *Desulfovibrio*, outras bactérias anaeróbicas restritas e morfologicamente diversificadas participam do processo, sendo *Desulfomaculum* e *Desulfobulbus*, as mais conhecidas (POSTGATE, 1965, 1979; TANG et al., 2009).

2.2 BACTERIAS REDUTORAS DE SULFATO

As BRSs fazem parte de uma classe de micro-organismos que realiza a redução dissimilatória de sulfato em anaerobiose (ambiente livre de oxigênio), e são importantes para o ciclo microbiológico do enxofre já que elas reduzem o enxofre presente no ambiente na forma de sulfato a sulfeto (POSTGATE, 1965, 1979; TANG et al., 2009).

As BRS são micro-organismos gram-negativos e podem ser divididas em dois grandes gêneros: *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*. Um terceiro gênero pode ser citado o *Desulfomonas*, mas por serem bastante semelhantes à *Desulfovibrio* é adicionado a este gênero. O *Desulfovibrio* é o gênero mais estudado já que as bactérias que pertencem a esse grupo são mais fáceis de isolar e purificar além de não formarem esporos. Elas são geralmente mesofílicas, e possuem morfologia curvada (Figura 2). Já uma boa parte das *Desulfotomaculum* são termofílicas, formam esporos e tem morfologia reta (Figura 3). Em ambientes extremos, as *Desulfovibrio*

assumem a forma espiralada enquanto as *Desulfotomaculum* se tornam filamentosas (POSTGATE, 1979).

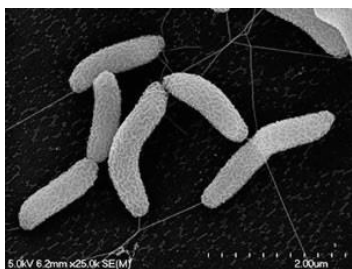


Figura 2: *Desulfovibrio desulfuricans*

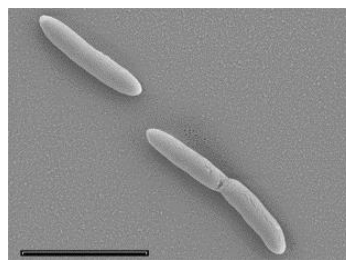
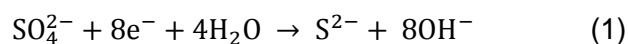


Figura 3: *Desulfotomaculum acetoxidans*

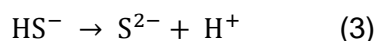
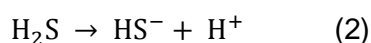
Muitos micro-organismos geram gás sulfídrico através do seu metabolismo utilizando o sulfato em um processo geralmente em pequena escala, onde ocorre absorção de enxofre para formação de proteínas e posterior degradação em processos catabólicos ou autolíticos (POSTGATE, 1965). As bactérias redutoras de sulfato utilizam o sulfato com aceptor final de elétrons na sua respiração anaeróbica produzindo sulfeto, seguindo a equação 1 (TANG et al., 2009).



Este processo é basicamente oxidativo envolvendo toda a cadeia respiratória da bactéria e os íons sulfato agem como agente oxidante na dissimilação orgânica (POSTGATE, 1965; TANG et al., 2009). Os elétrons utilizados no processo são gerados pela oxidação de uma fonte de carbono e de energia, tal como os íons: acetato, propionato, lactato e alcoóis como o etílico (LENZ et al., 2002).

O potencial de oxidação e redução (redox) da solução aquosa diminui devido ao consumo de elétrons. A forma da curva de evolução temporal do potencial redox (Eh) é característica do tipo de micro-organismo e geralmente as bactérias redutoras de sulfato podem crescer no meio de cultura na faixa de -100 a -500 mV.

Quando o sulfato é reduzido a sulfeto, o pH do ambiente desempenha um papel importante na forma existente de sulfeto produzido. Mudando o pH os sulfetos dissolvidos podem ser encontrados como S^{2-} , HS^- ou H_2S já que o equilíbrio das espécies de sulfeto é dependente do pH (OKABE et al., 1995; BERNARDEZ et al., 2012). O processo de dissociação é dado por equações 2 e 3 apresentadas abaixo:



A Figura 4 mostra o efeito do pH na predominância das espécies para temperatura entre 25 e 50°C. Nota-se que em pH neutro, a espécie predominante é o HS⁻. Aumentando o pH, a concentração da espécie S²⁻ aumenta mas a forma HS⁻ ainda é predominante. Já em pH ácido (abaixo de 6) haverá liberação de gás sulfídrico já que esta é a forma predominante.

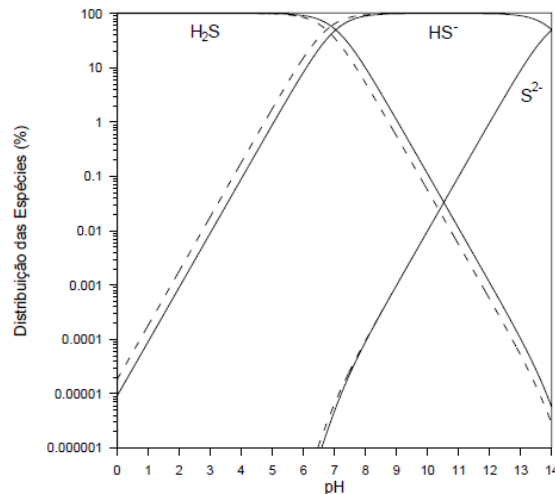


Figura 4: Diagrama de predominância das espécies de sulfeto em função do pH a 30 (Linha contínua) e 50°C (linha pontilhada) (Adaptado de Bernardez et al., 2012)

Resultados disponíveis na literatura sobre a toxicidade de sulfeto e o mecanismo de toxicidade são escassos. Foi relatado que o sulfeto é absorvido pela célula e destrói as proteínas, tornando a célula inativa (POSTGATE, 1984). Por outro lado, foi relatado que a inibição de sulfeto é reversível em biorreatores inoculados com bactérias redutoras de sulfato. Além da incerteza quanto a mecanismos inibitórios em presença de sulfeto, relatos contraditórios existem no que diz respeito a efeitos inibitórios de várias formas de sulfeto (REIS et al., 1992).

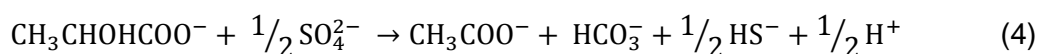
2.3 FONTES DE CARBONO E METABOLISMO MICROBIANO

As BRSs são muito diferentes quanto a utilização da fonte de carbono e as atividades metabólicas. Muitos pesquisadores estudam qual a fonte de carbono ideal para aperfeiçoar o processo de redução de sulfato. Vários compostos orgânicos foram testados entre eles: açucares ácido acético, etanol, propionato, formiato, butirato e lactato. (MOOSA et al., 1999, 2002). Segundo Knobel e Lewis (2002), o ideal é utilizar como fonte de carbono compostos simples, pois a utilização de compostos orgânicos

mais complexos como proteínas, leva a necessidade da fermentação deste composto por bactérias acidogênicas para que o carbono fique mais disponível para consumo das BRSs. A escolha da melhor fonte de carbono também deve levar em consideração a disponibilidade e o custo (MOOSA et al., 1999).

A fonte de carbono que tem maior potencial de utilização é o lactato, já que fornece energia mais do que suficiente para uma redução de sulfato otimizada. Além de fornecer energia, a utilização de lactato favorece o crescimento de diversas espécies de BRS, encorajando a diversidade microbiana (OKABE et al., 1995; OYEKOLA et al., 2009, 2012).

Para o crescimento das BRSs, é necessário que o meio contenha sulfato, exceto se o meio for extremamente rico em nutrientes (POSTGATE, 1979). As BRS utilizam apenas os sulfatos na forma dissolvida e uma pequena quantidade do sulfato disponível é absorvida pelo organismo e a outra parte é liberada na forma de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Metabolicamente as bactérias redutoras de sulfato são divididas em dois grupos: as que oxidam completamente o carbono orgânico disponível em dióxido de carbono como, por exemplo, bactérias do gênero *Desulfobacter* e as que oxidam parcialmente o carbono orgânico a acetato e dióxido de carbono, como a *Desulfovibrio*. Geralmente a cinética de crescimento das bactérias que oxidam parcialmente o carbono orgânico é mais rápida rendendo maior energia (GHIGLIAZZA et al., 2000; TANG et al., 2009; NEVATALO et al., 2010). As BRS podem utilizar diversas fontes de carbono, porém o lactato é o doador preferencial (ZHAO et al., 2008; OYEKOLA et al., 2009, 2012; NEVATALO et al., 2010). Quando é utilizado no meio de cultura o lactato como fonte de carbono, o acetato pode ser considerado um dos produtos finais do crescimento bacteriano processo que é apresentado na equação 4 (OYEKOLA et al., 2009, NEVATALO et al., 2010):



Acetato é uma das principais fontes orgânicas que é utilizada pela BRS, e é um dos intermediários na metanogênese. A espécie *Desulfobacter* cresce facilmente em ambiente contendo acetato como fonte de carbono, já que possui uma grande versatilidade na utilização da fonte de carbono. Já as espécies que oxidam completamente o enxofre do meio como a *Desulfovibrio baarsi* oxidam o acetato muito lentamente (COLLERAN et al., 1995).

Em alguns casos, quando é utilizado um consórcio de bactérias e o propionato como fonte de carbono mesmo tendo uma conversão elevada de sulfeto (aprox. 99%)

uma quantidade superior à esperada de propionato é encontrada no efluente, indicando uma utilização incompleta do substrato orgânico. Este processo pode ser explicado pelas equações 3 e 4. A equação 3 mostra a utilização do propionato pelas BRS para redução de sulfato com produção de sulfeto e acetato. Se no meio existir bactérias acetogênicas elas irão utilizar o acetato produzido como fonte de carbono para a redução do sulfato, como apresentado na equação 4 (GHIGLIAZZA et al., 2000). Em pH abaixo de 6 pode ocorrer inibição da redução de sulfato devido a presença de acetato não dissociado (OYEKOLA et al., 2010).



O propionato como o acetato também é produto final de processos fermentativos que pode ser utilizado como fonte de carbono para as BRS. Bactérias da espécie *Desulfobulbus* podem crescer utilizando apenas o propionato como fonte de carbono, oxidando-o a acetato e dióxido de carbono (COLLERAN et al., 1995).

O ferro é um dos metais mais importantes para o crescimento de BRS. Experimento realizado por Marchal et al. (2001) mostrou que em um meio reacional onde o estado estacionário havia sido alcançado, retirando-se Fe^{2+} do meio a concentração celular diminui. Após a diminuição dos micro-organismos, se for adicionando novamente o Fe^{2+} ao meio, ocorre um aumento da biomassa, voltando à condição inicial.

As bactérias da espécie *Desulfovibrio* podem crescer utilizando o hidrogênio (H_2) como fonte de energia. O crescimento das BRS utilizando hidrogênio é mais favorável termodinamicamente que quando utilizado o acetato ou outros compostos orgânicos. A equação 7 mostra a espontaneidade do processo de redução do sulfato quando utilizado o hidrogênio:



Todas as espécies de BRS que podem utilizar o H_2 são capazes de um crescimento autotrófico, que é um processo exclusivo para as bactérias que realizam a oxidação completa já que as bactérias que tem um processo de oxidação incompleta necessitam da adição de uma fonte de carbono para facilitar o processo. A maioria das espécies de BRS que crescem utilizando hidrogênio também cresce utilizando formiato como fonte de carbono (COLLERAN et al., 1995).

O crescimento de BRS do gênero *Desulfovibrio* normalmente tem perfil linear. O crescimento linear se deve a três motivos: o acúmulo de sulfeto no meio reacional que atua como inibidor; a precipitação do sulfeto de ferro, diminuindo a concentração de um micronutriente essencial para o crescimento; e a evaporação do sulfeto para a fase gasosa (POSTGATE, 1965; MARCHAL et al., 2001). Como descrito na equação 1, durante o crescimento das bactérias redutoras de sulfato o pH aumenta devido a geração de íons do OH⁻. Essa variação do pH pode causar alteração da taxa de crescimento e em casos extremos a lise alcalina das células. Quando é adicionado ao meio de cultura citrato ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ocorre uma mudança no perfil de crescimento para um perfil exponencial (POSTGATE, 1965).

2.4 CINÉTICA DE REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SULFATO

O estudo cinético da redução microbiológica do sulfato é de fundamental importância para entender o funcionamento do mecanismo do processo em anaerobiose. Muitos estudos cinéticos em anaerobiose foram feitos, porém o estudo específico para o processo da redução de sulfato é recente (KNOBEL; LEWIS, 2002). O estudo cinético pode avaliar apenas a redução de sulfato ou a redução de sulfato e as reações concorrentes, como a metanogênese, acidogênese, acetanogênese e a beta-oxidação de gorduras. O ideal nesses casos é utilizar como fonte de carbono compostos simples, já que ao utilizar compostos orgânicos mais complexos como proteínas, é necessário que ocorra uma fermentação por bactérias acidogênicas para que o carbono fique mais disponível para consumo das BRS.

Em experimento apresentado em OYEKOLA et al. (2012), é possível notar que a competição entre os variados micro-organismos influencia na cinética de crescimento diretamente através do parâmetro μ_{max} que é a taxa de crescimento específico máximo. Há relatos que o aumento da concentração de lactato no meio favorece o consumo do sulfato além de diminuir a inibição do crescimento microbiano devido à presença de sulfeto dissolvido (ELLIOTT et al., 1998; OYEKOLA et al., 2010). Utilizando apenas as reações, relações estequiométricas e dados teóricos apresentados, Knobel E Lewis em artigo publicado em 2002, apresentaram um modelo cinético onde é possível utilizar as mais diversas fontes de carbono, diferentes tipos de reatores além de avaliar o pH do meio com uma boa precisão. Os autores também verificaram que avaliando as diversas rotas de consumo de glicose pelas BRS, a que mais fornece energia é a de produção de acetato que é a rota mais usual. Como o lactato é um intermediário importante na fermentação da glicose utilizando a rota de

formação de acetato, é proposto um modelo para análise da fermentação de lactato a acetato e propionato.

Diversos experimentos foram propostos para avaliar a influência da concentração de sulfato na cinética de redução por BRS. Em experimento apresentado em Moosa et al. (2002), diferentes concentrações de sulfato foram utilizadas, em um intervalo de 1,0 a 10 kg/m³, utilizando variadas fontes de carbono, inclusive a glicose. Para evitar que a fonte de carbono se torne o reagente limitante, é adicionado ao meio uma quantidade superior à quantidade estequiométrica. Foi observado que ao aumentar a concentração de sulfato no meio, mantendo-se a taxa de diluição constante ou aumentando a diluição até certo nível, chamado de nível crítico, aumenta-se a conversão da reação. Este resultado mostra que existe uma dependência linear entre a taxa volumétrica de redução de sulfato e a carga volumétrica de sulfato no reator. Esses resultados foram confirmados por Moosa et al. (2005) e Oyekola et al (2009). Outro resultado desses estudos foi a obtenção de uma relação direta entre a concentração de acetato e a de sulfato: a redução de sulfato está intimamente ligada ao consumo de acetato.

Para todas as concentrações estudadas, o aumento da taxa de diluição do sulfato leva a uma diminuição da velocidade de reação já que ocorre diminuição da concentração microbiana no reator operado em modo contínuo devido ao arraste de células. Este arraste de células diminui com o aumento da concentração de sulfato, por esse motivo em concentrações mais elevadas, a conversão de sulfato é mais rápida: a taxa de reação aumenta em consequência do aumento da biomassa (MOOSA et al., 1999, 2002, 2005; OYEKOLA et al., 2010).

Ainda avaliando a influência da concentração do sulfato na cinética de redução anaeróbica por BRS, resultados apresentados em Oyekola et al (2010), revelam que em uma cultura pura elevadas concentrações de sulfato pode levar a inibição da redução. Esse fenômeno se deve a mudanças no pH e no Eh, já que o aumento da concentração de sulfato residual, leva a um aumento do potencial redox com consequente inibição das BRS. Em experimentos realizados utilizando consórcio de bactérias à inibição devido a elevada concentração de sulfato pode não acontecer devido a diversas reações paralelas que ocorrem já que o ambiente favorece o crescimento de variados micro-organismos (OYEKOLA et al., 2009, 2010).

Em estudos apresentados em Moosa et al (2005), utilizando cepas mesófilicas variando a temperatura entre 20 e 40°C, observou-se que a cinética da reação além de estar relacionada com a concentração de sulfato dissolvido no meio também é dependente da temperatura: quanto maior a temperatura maior a conversão sendo que 40°C foi a temperatura máxima de trabalho para o consórcio microbiano estudado,

apresentando nesta temperatura um decaimento na velocidade de reação. O aumento da conversão com a temperatura não está relacionado com o crescimento bacteriano, já que o aumento da biomassa não apresenta grandes variações com o aumento da temperatura. Este fenômeno pode ser explicado devido a desnaturação de proteínas e enzimas celulares em ambientes de temperatura elevada (MOOSA et al., 2005, TANG et al., 2009).

Além da temperatura, foram feitos experimentos para avaliar o efeito do pH na cinética de crescimento de BRS. Em experimentos realizados em reatores em pH ácido, é necessário um longo período de adaptação que varia de 2 a 5 dias para que as BRS possam iniciar a redução de sulfato e após a adaptação neste ambiente, ocorre aumento da biomassa bacteriana por todo reator (ELLIOTT et al., 1998; JONG; PARRY, 2006). A utilização de lactato como fonte de carbono em ambientes ácidos pode levar a inibição do crescimento bacteriano já que o ácido orgânico em baixos pH atua na membrana celular evitando que a célula mantenha a seu potencial de membrana. Para evitar a inibição do crescimento de BRS em ambientes ácidos outra fonte de carbono pode ser utilizada a exemplo do etanol que vem sendo amplamente utilizado na redução de sulfato em escala industrial (ELLIOTT et al., 1998).

Como um dos produtos final da redução microbiológica do sulfato, foram feitos estudos para avaliar o efeito da concentração de sulfeto na cinética de crescimento microbiano. Em experimento apresentado em OYEKOLA et al (2010) foi utilizada a concentração de sulfato na faixa de 10g/L e como fonte de carbono o lactato. Os resultados obtidos mostram que a elevada concentração de sulfeto pode selecionar BRS oxidantes de lactato como, por exemplo, as bactérias dos grupos *Desulfobacter* e *Desulfotomaculum* inibindo as BRS que não utilizam o lactato. Além das BRS outros micro-organismos podem ser inibidos pelo sulfeto. O aumento do pH pode levar a uma maior tolerância a presença de sulfeto dissolvido (TANG et al., 2009; OYEKOLA et al., 2010). A lise celular causando a morte de bactérias pouco resistentes a elevadas concentrações de sulfeto leva a uma cinética mais lenta.

2.5 REATORES UTILIZADOS EM ESTUDO CINÉTICO

Existem diferentes tipos de reatores podem ser utilizados em estudos cinéticos, como os reatores agitados, de lodo ativado, de membrana de leito fluidizado e de leito fixo. Os mais utilizados para estudo cinético são os reatores de agitação contínua (CSTR) e os reatores de leito fixo.

O reator de agitação contínua, também conhecido como CSTR, é um reator bastante utilizado em processos industriais e consiste em um tanque com agitação contínua normalmente operada de forma a obter uma mistura perfeita. Por possuir uma mistura perfeita e funcionar em regime estacionário, o CSTR é modelado considerando que não existe variação na temperatura, na concentração e na velocidade de reação em todo o reator. Sendo assim, a temperatura e a concentração dos reagentes na saída do reator é a mesma em qualquer ponto dentro do tanque. (FOGLER, 1999).

Diversos estudos da cinética de crescimento de BRS foram feitos em reatores agitados como o publicado por Moosa et al (2002, 2004), onde foram avaliadas a concentração de sulfato e a temperatura na cinética microbiana. A competição entre diferentes espécies de micro-organismos como, por exemplo, as bactérias acidogênicas e as BRS, avaliando o consumo de sulfato e da fonte de carbono utilizada, também podem ser realizadas em reatores agitados como feito em Zhao et al (2008). A construção de modelos matemáticos de sistemas de tratamento microbiano de águas residuais contendo grande quantidade de sulfato também podem utilizar os reatores agitados como feito em Knobel e Lewis (2001).

Reatores de lodo ativado são bastante utilizados para o tratamento de esgotos sanitários. O sistema tem alta eficiência já que ocorre a recirculação de lodo. O reator, o tanque de decantação e a recirculação de lodo são partes integrantes deste sistema de tratamento. O efluente passa pelo reator, onde ocorre a remoção da matéria orgânica e depois pelo decantador, de onde sai clarificado após a sedimentação dos sólidos (biomassa) que formam o lodo de fundo (FOGLER, 1999).

Para a construção de modelos cinéticos de competição entre as BRS e bactérias metanogênicas, ou apenas para avaliar o crescimento de BRS avaliando a fontes de carbono utilizada, o reator de lodo ativado associado em série com um reator agitado é bastante empregado (KALYUZHNYI; FEDOROVICH, 1998; TANG et al., 2009). Este tipo de reator também é vastamente utilizado na construção de modelo matemático em sistemas de tratamento de águas residuais como em Knobel e Lewis (2001).

Os reatores associados a membranas vêm sendo utilizados para tratar diferentes tipos de efluentes. Os reatores de membrana são reatores tubulares de fluxo contínuo e constituído por uma membrana cuja função é de separação e catálise. São amplamente utilizados em reações em fase líquida e reações reversíveis. Tem como vantagem o aumento da conversão em relação ao tubular e a seletividade pelo produto específico. As desvantagens incluem o alto custo das membranas, que

precisam ser trocadas em intervalos regulares, a limpeza que é dificultada devido a presença das membranas e a formação de um caminho preferencial de fluxo.

Em estudos feitos para utilizar as BRS no tratamento da drenagem ácida mineira ou em outros tipos de águas residuais ricos em metais pesados e sulfato, o reator de membrana pode ser utilizado. O reator de membrana pode estar associado em série com um reator de leito fluidizado o que em alguns casos favorece o crescimento microbiano. A desvantagem de utilizar os reatores em membrana em estudos cinéticos com BRS é a deposição do sulfeto de zinco que acaba contaminando as membranas e dificultando os estudos (TANG et al., 2009).

Já o reator de leito fluidizado possui um conteúdo heterogêneo mesmo assim é bastante parecido com o CSTR já que é bem misturado possuindo uma distribuição homogênea de temperatura através do seu leito. Pode ser catalítico ou não catalítico, é adequado para operações de grande escala e é bastante utilizado já que é possível utilizar grande quantidade de alimentação e de sólidos, além de possuir bom controle de temperatura. A temperatura é relativamente uniforme através do leito, o que evita os chamados pontos quentes. Possui elevada velocidade de reação, comparados aos reatores de leito fixo, devido à uniformidade do leito e favorece o transporte de energia devido à fluidez (FOGLER, 1999).

O estudo dos efeitos das BRS na drenagem ácida mineira com consequente diminuição da concentração de sulfato na água residual, avaliando a fonte de carbono ideal para o processo poder ser realizado em reatores de leito fluidizado (TANG et al., 2009).

Os reatores de leito fixo ou leito recheado são reatores em sua maioria cilíndricos operados usualmente em regime estacionário. O leito pode ser recheado por catalisadores quando a reação for heterogênea (fluido/sólido) ou quando se tratar de um bioprocessamento por algum suporte que favoreça a formação de biofilmes quando desejado (FOGLER, 1999).

O balanço de massa utilizado para construir o modelo cinético do reator utilizado é:

$$[\text{Acumulo}] = [\text{Entrada}] - [\text{Saída}] + [\text{Geração}] - [\text{Consumo}]$$

Dando origem a equação 8:

$$\frac{1}{V} = \frac{d(Vy)}{dt} = \sum r_{\text{ger}} - \sum r_{\text{cons}} + Dy_e - \gamma Dy \quad (8)$$

Onde:

V = volume de controle;

y = concentração da variável de estado no biorreator;

r_{ger} = velocidades de geração do componente representado pela variável de estado;

r_{cons} = velocidades de consumo do componente representado pela variável de estado;

y_e = concentração na alimentação;

γ = relação entre a vazão de alimentação e de retirada do biorreator.

Estudos sobre a cinética das bactérias redutoras de sulfato têm sido efetuados extensivamente e descritos qualitativamente por diversos autores nos mais diversos reatores anaeróbicos (OKABE et al., 1992, 1995; TANG et al., 2009; BERNARDEZ et al. 2012). Estudos foram realizados em reatores contínuos de fluxo ascendente e leito fluidizado (NEVATALO et al., 2010) e reatores de fluxo ascendente e leito empacotado (OKABE et al., 1994; ELLIOTT et al., 1998; HUBERT et al., 2003, 2005; BASKARAN; NEMATl, 2006; BERNARDEZ et al. 2012).

Reatores agitados (CSTR) também podem ser utilizados para avaliar a cinética de BRS. O maior problema do reator agitado é o seu elevado tempo de reação. (LYBERATOS; SKIADAS, 1999) O reator de leito fixo e fluxo ascendente é o mais utilizado para avaliar a cinética de crescimento de BRS em anaerobiose. Isso se deve ao reduzido tempo de bioreação e a elevada superfície de contato disponível para a formação e adesão do biofilme (BERNARDEZ et al., 2008). Os principais parâmetros para a construção deste tipo de reator é o holdup que é o volume de líquido no reator e a dispersão axial do líquido que é a derivação a partir da vazão ideal (BERNARDEZ et al., 2008).

É importante antes de realizar qualquer experimento cinético em biorreator ter o máximo de informações sobre a operação e as características dinâmicas do equipamento. Em experimento realizado por Baskaran e Nematl (2006), onde foi utilizado reator de leito fixo, mostra que o *holdup* da biomassa (soma das células que estão imobilizadas no leito do reator e as células que estão em suspensão) é um parâmetro importante e que tem grande influência na taxa da reação estudada.

Chen et al (1994) estudaram a cinética de formação de sulfeto em um biorreator de leito empacotado usando a areia do mar como meio poroso. A fonte de carbono utilizada foi o lactato e a espécie de BRS em questão foi a *Desulfovibrio desulfuricans*. A concentração de lactato chegou a mínima encontrando-se sulfeto no

efluente do reator onde a taxa de carregamento volumétrico foi de 0.138 g/L-h e a taxa de redução volumétrica máxima alcançada foi de 0,015 g/L-h. O experimento demonstrou também que existe uma influência do fenômeno de transporte na cinética de produção de sulfeto.

Elliott et al (1998) realizaram experimentos em um biorreator de leito empacotado também utilizando areia, porém diferente de Chen et al (1994) neste experimento foi investigado o efeito do pH sobre a redução anaeróbica de sulfato. O meio de cultura utilizado neste estudo também continha lactato como fonte de carbono e foi bombeado através da coluna a uma taxa de 0,6 mL/min. Inicialmente o pH da alimentação foi ajustado para 4,5 e, em seguida, ele foi diminuído progressivamente até 3 sob condições de fluxo contínuo. Este trabalho demonstrou que em condições ácidas é possível ocorrer a redução de sulfato onde em pH igual a 3,25 obteve-se uma remoção de 38,3% de sulfato encontrando BRS ativa em pH igual a 3 após 21 dias de inóculo.

Kolmert e Johnson (2001) investigaram a tolerância de três culturas diferentes de BRS: uma cultura mista de acidófilas, uma cultura de neutrófilas e um consórcio misto contendo acidófilas e neutrofílicas. Os inóculos foram feitos em ambiente ácido utilizando um biorreator de leito fixo, formado por perlas de vidro, e fluxo ascendente. Foram avaliadas a concentração da fonte de carbono e a tolerância ao estresse ácido dos diferentes consórcios. A cultura mista contendo as cepas acidófilas foram mais eficiente do que a cultura de neutrofílicas na redução de sulfato e de todos os substratos testados. As taxas de redução volumétrica média de 0,010 a 0,013 g/L-dia foram alcançadas em presença de cultura mista com alimentação em pH 4.0. O efeito do pH foi investigado observando-se que a redução de sulfato a pH de 3.0 ocorreu a uma taxa mais baixa mostrando que quanto menor o pH mais lenta a reação.

2.6 PARÂMETROS QUE INFLUÊNCIAM A CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BRS

Diferentes fatores agem na velocidade que o sulfato será reduzido por microorganismos no ambiente. Quando o objetivo da pesquisa é avaliar a redução de sulfato por BRS em larga escala, seja para aplicar em processos de tratamento de efluentes líquidos ou em experimentos de inibição microbiana, um longo estudo da cinética de redução de sulfato em biorreatores se faz necessário (MOOSA et al., 1999).

Alguns estudos cinéticos executados com as bactérias redutoras de sulfato mostraram que a cinética de reação da redução de sulfato é influenciada por diversos fatores entre eles o tipo e a concentração do doador de elétrons, a temperatura, o pH e a presença de alguns íons que causam inibição (MOOSA et al., 1999, 2002, 2005; NEMATİ et al., 2001; BASKARAN; NEMATİ, 2006; AL-ZUHAİR et al., 2008; OYEKOLA et al., 2010; BERNARDEZ et al., 2012). Geralmente em estudos cinéticos são utilizados mix de micro-organismos para simular as condições ambientais já que a utilização de culturas puras leva a resultados incompletos quando se deseja utilizar os resultados obtidos em ambientes complexos (MOOSA et al., 1999; OYEKOLA et al., 2009, 2010).

2.6.1 Concentração de Sulfato

Em estudos realizados para avaliar o efeito da concentração de sulfato na cinética de redução, o pH e a temperatura que são parâmetros que também influenciam na cinética da reação são mantidos constantes, variando-se apenas a concentração de sulfato no meio. O carbono orgânico também funciona como doador de elétron, porém para o estudo da cinética de crescimento de BRS, é importante avaliar apenas o consumo de sulfato sendo ele o substrato limitante (GHIGLIAZZA et al., 2000; LENZ et al. 2002; MOOSA et al., 2002, 2005; OYEKOLA et al., 2010).

2.6.2 Temperatura

A influência da temperatura é um parâmetro importante que afeta a cinética da redução de sulfato e a atividade das BRS (MOOSA et al., 2005; TANG et al., 2009). Esta influência varia consideravelmente dependendo da cepa estudada da bactéria. Se for utilizada cepa de BRS mesofílica a temperatura de trabalho é moderada, variando entre 25 e 40°C. Já utilizando cepa de BRS termofílica pode ser utilizado ambiente mais extremo variando a temperatura entre 50 e 70°C (POSTGATE, 1965; TANG et al., 2009).

2.6.3 pH

Normalmente as BRS são micro-organismos que conseguem sobreviver em ambiente com pH entre 5 e 9, tendo sua atividade reduzida quando o pH sai desta faixa (GHIGLIAZZA et al., 2000; JONG; PARRY, 2006; TANG et al., 2009). Alguns autores conseguiram identificar o micro-organismo em ambientes extremos com pH abaixo da faixa descrita porém não é o meio ideal para o crescimento de BRS, sendo necessário longo tempo de adaptação para o micro-organismo (TANG et al., 2009).

3. METODOLOGIA

A cultura de BRS que foi utilizada no experimento foi obtida a partir da água produzida proveniente de campos de petróleo da Bacia do Recôncavo. No inóculo, a espécie dominante de BRS foi a *Desulfovibrio*.

O consórcio de bactérias denominada APB55, armazenada a -80°C , foi descongelada e inoculada em meio de cultura enriquecido no interior da câmara de anaerobiose (Bactron VI, Shellab, Sheldon Manufacturing Inc.), a 38°C , constituindo o inóculo inicial. Um volume de $100\ \mu\text{L}$ do inóculo inicial, foi inoculado novamente em meio de cultura enriquecido. Foram feitos mais 2 repiques de $100\ \mu\text{L}$ cada para a cultura microbiana ficar disponível para uso. A cultura utilizada continha aproximadamente 2.0×10^9 NMP/mL.

O meio enriquecido utilizado para o estudo cinético foi o Postgate modificado, onde o lactato de sódio é utilizado como fonte de carbono e potencial e doador de electrons. Este meio é ideal para crescimento das mais diversas espécies de BRS e contém (por litro): KH_2PO_4 , 0,5 g; NH_4Cl , 1,0 g; CaCl_2 , 1,0 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,83 g; lactato de sódio, 1,75 mL; extrato de levedura, 1,0 g; Na_2SO_4 , 1,0 g; ácido ascórbico, 0,1 g; tioglicolato de sódio, 0,013 g; citrato de sódio, 6,38 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g; NaCl 1,5%, resazurina, 2,0 mL de 0,025% w/v. Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e o pH ajustado entre 7,5-8,0 usando HCl 5 M ou NaOH 1M. O meio de cultura foi esterilizado a 121°C durante 15 min. Devido a presença do sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o meio se torna negro quando ocorre formação de sulfeto, funcionando como indicador do crescimento microbiano.

Para a realização dos inóculos, foi utilizado meio semi-sólido, quando é adicionado além dos reagentes 2 g de agar. Para o experimento cinético foi utilizado meio líquido, sem adição de agar.

3.1 EXPERIMENTOS CINÉTICOS EM REATOR DE LEITO FIXO

O biorreator de fluxo ascendente e leito fixo usado neste estudo foi feito com um cilindro graduado Pyrobras® de um litro (diâmetro 6 cm e altura 32 cm) com dez saídas laterais para amostragem em intervalos de 3,6 cm. Todas as saídas de amostragem foram fechadas durante o experimento usando septos do silicone. O biorreator foi preenchido com esferas de vidro de 3,0 milímetros de diâmetro para fornecer um suporte para o estabelecimento do biofilme. A porosidade do meio poroso

foi de 40%. Depois de preenchido com o meio poroso o biorreator foi esterilizado em uma autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 121°C. A junção de vidro na parte superior do biorreator foi fechada com um selante de silicone para garantir que não haveria vazamentos de líquido ou de gás no biorreator. Tubos Tygon® foram usados para transferir o meio de cultura para a parte inferior do biorreator e para remover o efluente da parte superior deste. Para garantir um ambiente anaeróbico dentro do biorreator nitrogênio foi introduzido continuamente à parte inferior, com uma baixa vazão, antes e durante o carregamento do meio poroso. O biorreator foi mantido a uma temperatura de 32°C usando uma caixa aquecida por uma lâmpada de 25 W e um controlador de tensão AC (Figura 6 e 7).

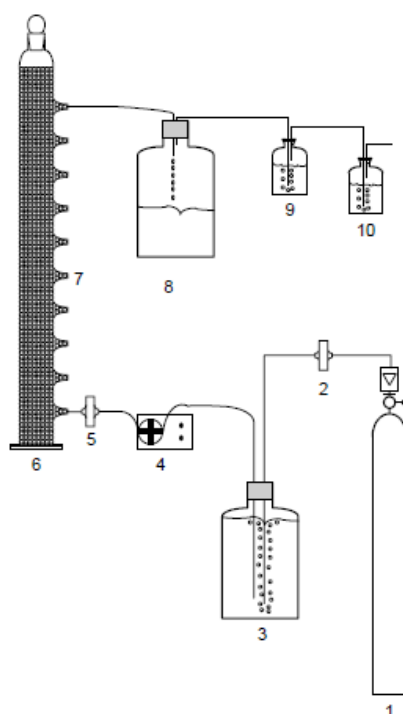


Figura 5: Diagrama esquemático da montagem experimental usada. Os números indicam: 1) cilindro de nitrogênio, 2) porta-filtro, 3) recipiente do meio de cultura, 4) bomba peristáltica, 5) filtro, 6) biorreator de leito fixo, 7) pontos de amostragem, 8) recipiente de recepção, 9) primeiro recipiente de proteção, 10) segundo recipiente de proteção.

A solução aquosa foi introduzida na parte inferior do biorreator usando uma bomba peristáltica (modelo 77912-00 Masterflex® L/S) com tubulações de PTFE. A solução foi coletada na parte superior do biorreator. O gás sulfídrico eventualmente gerado durante os experimentos foi coletado em dois reservatórios contendo solução alcalina com 10% e 5% de $ZnCl_2$, o que neutraliza o ácido e precipita o sulfeto como ZnS . O pH destas soluções foi periodicamente medidos e ajustados com $NaOH$. A turbidez das soluções foi monitorada regularmente.

O meio líquido com sulfato foi introduzido na parte inferior do biorreator através de um tubo Tygon usando uma bomba peristáltica. Antes de ligar a bomba, toda a tubulação foi lavada com uma solução de álcool etílico a 70% e uma solução bactericida para minimizar a contaminação. Aproximadamente dois volumes do poro de meio foram bombeados através do biorreator para assegurar de que o meio poroso estivesse completamente preenchido. A solução aquosa no topo do biorreator foi coletada em um recipiente. Para a operação do equipamento a bomba peristáltica foi mantida desligada e foi inoculado no interior do biorreator uma solução enriquecida de BRS em três saídas laterais (parte inferior, central e superior) para assegurar o estabelecimento de um biofilme uniforme. Depois da inoculação, as tubulações das partes superior e inferior do biorreator foram fechadas para manter o equipamento livre de contaminação. Ao longo do tempo amostras foram tomadas nos três pontos (parte inferior, meio e superior) e analisadas para a determinação dos teores de sulfato e sulfeto em solução aquosa, além do potencial redox.



Figura 6: Sistema experimental em funcionamento.

Inicialmente o biorreator foi operado de forma descontínua. Nesta fase a atividade das bactérias foi monitorada determinando-se as concentrações de sulfato e sulfeto em solução aquosa assim com o potencial redox. Quando a conversão de sulfato foi praticamente completa a operação do biorreator passou a ser contínua, ligando-se a bomba peristáltica e alimentando o biorreator com uma solução a uma taxa de 2,6 mL/min. O estado estacionário foi assumido quando a variação na conversão do sulfato foi menor que 10% em um período de operação igual a duas vezes o tempo de residência da solução, que foi determinado previamente em

experiências da distribuição do tempo de residência que corresponde a aproximadamente 24 horas (BERNARDEZ et al., 2008).

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1 Cromatografia Iônica

A cromatografia iônica foi utilizada para realizar as análises de sulfato e sulfeto no experimento utilizando 200 mg/L de sulfato no meio de cultura.

As amostras do experimento foram analisadas com cromatógrafo iônico (ICS-3000 da Dionex) com bomba de gradiente, detector da condutividade e válvula da injeção. Todos os ânions foram determinados simultaneamente usando colunas de troca iônica Ionpac AS11-HC (4x250 mm D.I.) e AS7 Dionex. A fase móvel foi formada por uma solução 0,1M NaOH/0,5 M AcNa/0,5% (v/v) EDTA em eluição isocrática com 1,0 mL/min. Para impedir a contaminação das amostras pipetas sem uso e filtros foram usados em cada amostra e todos as vidrarias foram lavadas com sabão ficando imersa por 24 horas e enxaguadas com água ultra pura.

A amostragem foi executada usando seringa com agulha Precision Glide esterilizada de 1,0 mL e transferida para um frascos limpos de 1,0 mL. Cada amostra foi diluída cem vezes com água deionizada (de resistividade 18,2 mΩ) em balões volumétricos de 10 mL contendo NaOH 1,0 M. As amostras foram filtradas usando membranas de acetato de celulose de 0,22 mm.

Um volume de 5,0 ml foi transferido para tubos de 20 ml e injetado diretamente no sistema através do amostrador automático AS40. O teor de sulfeto nas soluções foi medido por cromatografia iônica.

Para análise de sulfeto o mesmo procedimento apresentado acima foi utilizado exceto que neste caso as concentrações de S^{2-} foram medidas usando um detector amperimétrico.

3.2.2 Concentração de Sulfato em Solução

A concentração de sulfato foi medida utilizando o método turbidimétrico desenvolvido por Kolmert e Johnson (2000) que se baseia na precipitação de ions de sulfato como sulfato de bário. As amostras antes de serem analisadas foram tratadas

com um excesso acetato de zinco precipitar o sulfeto dissolvido presente na amostra que poderia interferir na análise final. Aproximadamente 0,01 g de acetato de zinco foi misturado a 1 mL de amostra a ser analisada em microtubos. Após a dissolução do acetato, a mistura foi centrifugada durante 10 min a 6.000 rpm e 4 °C. Em seguida, 0,8 mL do sobrenadante foi misturado com 7,2 mL solução condicionante (0,85 mL de glicerol, 0,5 mL de HCl, 1,3g de NaCl e 17 mL de etanol). Em seguida, 0,08 g de cloreto de bário foram adicionados à mistura, que foi agitada por 15s até total dissolução do sal e formação de precipitado branco. A absorbância foi medida a 420 nm usando espectrofotômetro. Os padrões de calibração foram preparados utilizando sulfato de sódio e água deionizada.

3.2.3 Concentração de Sulfeto em Solução

A concentração de sulfeto dissolvido foi medida utilizando o método turbidimétrico segundo Cord-Ruwisch (1985), imediatamente após a amostragem para evitar a sua oxidação e volatilização. O método é baseado na precipitação do sulfeto como sulfeto de cobre (avermelhado). Em tubos de ensaio, 0,8 mL de amostra foi misturado com 7,2 mL de solução condicionante (5 mM CuSO₄ 5H₂O e 50 mM HCl). Após homogeneização, a absorbância foi medida utilizando 480 nm em espectrofotômetro. Os padrões de calibração foram preparados utilizando sulfeto de sódio e água deionizada.

3.2.4 Potencial Redox (Eh) e pH do Meio

O pH foi medido utilizando um eletrodo específico Orion Thermo PerpHecT Meter (modelo 330). Antes de ser utilizado, o medidor de pH foi regularmente calibrado utilizando soluções tampão de pH 4 e 7. O potencial redox, ΔEh , foi medido usando um eletrodo ORP Cole-Parmer calibrado com soluções padrão (Analion) de 470 e 220 mV a 20°C. O equipamento utilizado tem um eletrodo interno de referência de Ag / AgCl.

3.3 MODELAGEM CINÉTICA

A conversão da reação foi calculada utilizando a variação de concentração do sulfato como mostrado na equação abaixo:

$$x(t) = \frac{C_{SO_4^{2-}}(0) - C_{SO_4^{2-}}(t)}{C_{SO_4^{2-}}(0)} \times 100 \quad (9)$$

Onde $C_{SO_4^{2-}}(0)$ é a concentração inicial de sulfato, $C_{SO_4^{2-}}(t)$ é a concentração de sulfato em um determinado tempo.

Assumindo que o biorreator operando em regime descontínuo tem volume constante, os modelos cinéticos para o consumo de sulfato e para a produção do sulfeto podem ser dado por cinética pseudo-homogênea:

$$\frac{dC_{SO_4^{2-}}}{dt} = -k_{SO_4^{2-}} C_{SO_4^{2-}}^\alpha \quad (10)$$

$$C_{SO_4^{2-}}(0) = C_{SO_4^{2-},0} \quad (11)$$

$$\frac{dC_{S^{2-}}}{dt} = k_{S^{2-}} \left(C_{S^{2-},\infty} - C_{S^{2-}} \right)^\beta \quad (12)$$

$$C_{S^{2-}}(0) = 0 \quad (13)$$

Onde $C_{SO_4^{2-}}$ é a concentração de sulfato na solução, $k_{SO_4^{2-}}$ é a constante cinética de consumo de sulfato, α é a ordem da reação de consumo de sulfato, $C_{SO_4^{2-},0}$ é a concentração inicial de sulfato na solução, t é o tempo, $C_{S^{2-}}$ é a concentração de sulfeto na solução, $k_{S^{2-}}$ é a constante cinética de geração de sulfeto, β é a ordem da reação de geração de sulfeto, $C_{S^{2-},\infty}$ é a concentração final de sulfeto na solução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados diversos experimentos que deram origem a dois artigos publicados. São eles: *Kinetic Analysis of Microbial Sulfate Reduction in an Upflow Packed-Bed Anaerobic*, publicado em 2012 no *Mine Water and the Environment* e *Redução microbiológica de sulfato: Cinética para baixa concentração de sulfato*, publicado nos anais do XXIV Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa.

O primeiro artigo a ser apresentado tem o título: *Redução microbiológica de sulfato: Cinética para baixa concentração de sulfato*. Nesse artigo são apresentados os resultados dos estudos cinéticos obtidos a partir de experimentos realizados em meio reacional com aproximadamente 200mg/L, concentração considerada baixa em se tratando de reservatórios de petróleo.

**REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SULFATO: CINÉTICA PARA BAIXA
CONCENTRAÇÃO DE SULFATO**

REDUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SULFATO: CINÉTICA PARA BAIXA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO

L.A. Bernardez¹, C.L.S. Ramos¹, L.R.P. de Andrade Lima², P.F. Almeida¹

¹Departamento de Ciências da Biointeração, Universidade Federal da Bahia
Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, 40110-100. e-mail:

leticiaab@ufba.br

²Departamento de Ciência e Tecnologia dos Materiais, Universidade Federal da Bahia
Rua Aristides Novis, 2, Federação, Salvador, Bahia, 40210-630. e-mail: lelo@ufba.br

RESUMO

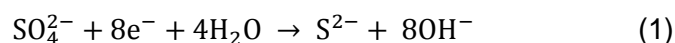
Os efluentes líquidos de minas e usinas metalúrgicas podem ter concentrações de sulfatos significativas, além de elementos potencialmente tóxicos, e o tratamento biológico utilizando bactérias redutoras de sulfato é uma opção viável devido ao baixo custo deste processo. Neste trabalho a redução anaeróbica de sulfato foi estudada em um biorreator de leito fixo usando um consórcio de bactérias redutoras de sulfato obtidas de amostras de água produzida de um reservatório da Bacia do Recôncavo que apresentava desprendimento de H₂S. As concentrações de sulfato e sulfeto em solução aquosa, assim como o potencial de oxidação-redução, foram determinados em amostras retiradas do biorreator ao longo de 12 dias, para o caso em que a concentração inicial do sulfato foi de cerca de 200 mg/L e a de sulfeto foi nula. Os resultados indicam o crescimento e a atividade das bactérias assim como a diminuição exponencial da concentração de sulfato na fase descontínua do experimento. O ajuste de modelos cinéticos indicou que a conversão do sulfato e a geração do sulfeto são ambos processos de primeira ordem e que a primeira reação é mais rápida que a segunda. As equações cinéticas globais para estas reações são (em mg/L.h): $r_{SO_4^{2-}} = -10,9 \times 10^{-3} C_{SO_4^{2-}}^{1,1}$ e $r_{S^{2-}} = 3 \times 10^{-3} (60,0 - C_{S^{2-}}^{1,1})^{1,0}$.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias redutoras de sulfato, Drenagem ácida, Cinética.

1. INTRODUÇÃO

Os efluentes líquidos de minas e de usinas metalúrgicas podem ter uma quantidade significativa de sulfato e de elementos potencialmente tóxicos, como As, Pb, Cd, Zn e Cu oriundos da oxidação biológica e química de minerais sulfetados. O tratamento biológico destes efluentes usando bactérias redutores de sulfato (BRS) é uma opção viável devido ao baixo custo deste processo quando comparado com o tratamento químico (Hammack et al., 1998; Lenz et al., 2002; Moosa e Harrison, 2006). A avaliação da cinética do consumo de sulfato e da geração do sulfeto para populações específicas de BRS é fundamental para permitir o projeto sistemático de unidades industriais usando estas bactérias.

A redução do sulfato por BRS segue a reação abaixo, onde os elétrons são gerados pela oxidação de uma fonte de carbono e de energia, tal como os íons: acetato, propionato e lactato e alcoóis como o etílico (Lenz et al., 2002):



Alguns estudos cinéticos foram executados com BRS em biorreatores descontínuos e contínuos (Okabe et al., 1992, 1995). Os biorreatores de leito fixo com fluxo ascendente são usados amplamente em microbiologia industrial, incluindo o estudo da atividade anaeróbica do BRS em campos de petróleo, devido à grande área superficial disponível para servir de suporte para os micro-organismos assim como o tempo reduzido do bioreação (Elliott et al, 1998; Jong and Perry, 2003). Alta produtividade volumétrica foi verificada em biorreatores de leito fixo, quando comparado com outras configurações. Nestes sistemas reativos o crescimento e a atividade das BRS nos experimentos foram avaliados usando contagem em placa de Petri, que exige um período longo, tipicamente 48 a 72 horas.

Em reservatórios de petróleo que apresentam geração de gás sulfídrico (*souring*), na bio restauração da drenagem ácida mineira e outros métodos de tratamento de sulfatos de metais usando BRS a redução do sulfato é uma etapa crítica (Baskaran and Nemati, 2006). Estudos usando acetato e álcool etílico como doadores de elétron para o consórcio de BRS tem mostrado que a cinética da reação de redução de sulfato é influenciada pela concentração do sulfato da alimentação (Lenz et al., 2002; Moosa and Harrison, 2006).

Como descrito na equação 1, durante o crescimento das bactérias redutoras de sulfato o pH aumenta devido a geração de íons do OH⁻. O potencial de oxidação e redução (redox) da solução aquosa diminui devido ao consumo de elétrons. A forma

da curva de evolução temporal do potencial redox é característica do tipo de micro-organismo e geralmente as bactérias redutoras de sulfato podem crescer no meio de cultura na faixa de - 100 a - 500 mV (Eh). Mudando o pH os sulfetos dissolvidos podem ser encontrados como S^{2-} , HS^- ou H_2S . Mudando o potencial redox da solução o sulfeto pode ser encontrado como SO_4^{2-} , S, HSO_4^- , etc. O teste cinético apresentado neste estudo foi executado em uma temperatura de 32°C. A avaliação do efeito da temperatura na especiação do enxofre é importante para evitar ambigüidade nos resultados analíticos. Levando em consideração o equilíbrio iônico e o balanço de massa das espécies, assumindo que o sistema é diluído com força iônica nula, e usando a primeira (K_1) e a segunda constante da ionização (K_2) do H_2S para as temperaturas de 25 e 50°C os diagramas da especiação para o sulfeto foram calculados. No caso de uma temperatura de 25°C, as constantes de ionização são: $K_1 = 10^{-7.045}$ e $K_2 = 10^{-14}$ (g-mol/kg). No caso de uma temperatura de 50°C, as constantes de ionização são: K_1 é $10^{-6.74}$ e K_2 é 10^{-14} (g-mol/kg) (Millero, 1986).

A Figura 1 mostra que o efeito da temperatura sobre o diagrama da predominância das espécies para uma temperatura entre 25°C e 50°C é pequeno. Nota-se que para um valor de pH inicial de aproximadamente 7,5 a espécie predominante é o HS^- . Se o pH aumenta, a concentração de S^{2-} aumentará, mas não chegara a ser a espécie predominante, o que somente ocorrerá um pH muito básico. Por outro lado, a concentração de H_2S dissolvido e eventualmente a liberação de gás sulfídrico torna-se importante abaixo de pH aproximadamente 6,0.

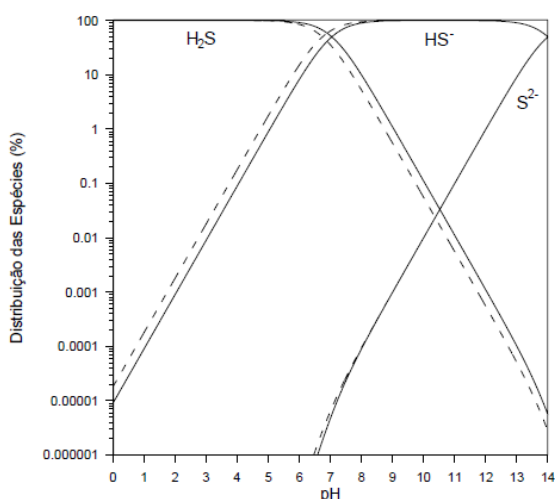


Figura 1: Diagrama de predominância das espécies em função do pH para sulfeto a 30 (linha contínua) e 50°C (linha pontilhada)

A Figura 2 mostra o diagrama da predominância da espécie em função do potencial redox da solução e o pH para uma concentração inicial do sulfato de 1000

mg/l a 32°C. Observa-se que na faixa de pH entre 7,5 a 8,0 e ambiente redutor a espécie termodinamicamente predominante é HS⁻.

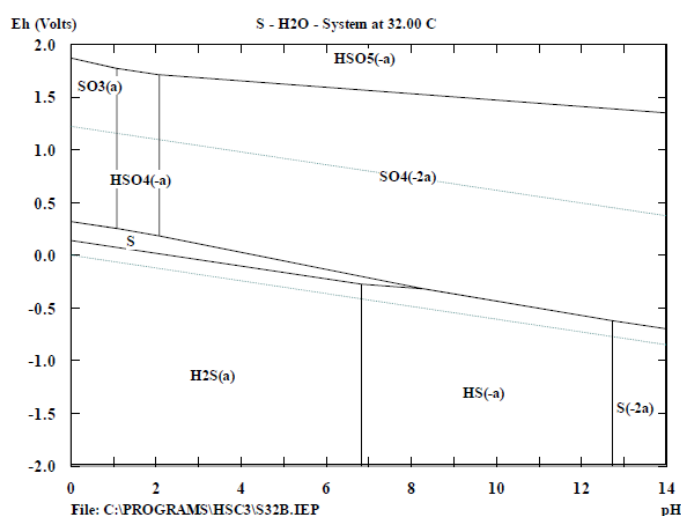


Figura 2: Diagrama Eh –pH para o sistema S-H₂O a 32°C

Este trabalho investiga a atividade de uma cultura de bactérias redutoras de sulfato isoladas de amostras de água produzida de um reservatório de petróleo do Recôncavo da Bahia que apresentava desprendimento de gás sulfídrico. Um biorreator de leito fixo e fluxo ascendente, preenchido com esferas de vidro, foi usado nestes testes. A cinética da conversão sulfato-sulfeto foi avaliada para uma solução com uma concentração inicial de 200 mg/L de sulfato.

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O biorreator de fluxo ascendente e leito fixo usado neste estudo foi feito com um cilindro graduado Pyrobras® de um litro (diâmetro 6 cm e altura 32 cm) com dez saídas laterais para amostragem em intervalos de 3,6 cm. Todas as saídas de amostragem foram fechadas durante o experimento usando septos do silicone. O biorreator foi preenchido com esferas de vidro de 3,0 milímetros de diâmetro para fornecer um suporte para o estabelecimento do biofilme. A porosidade do meio poroso foi de 40%. Depois de preenchido com o meio poroso o biorreator foi esterilizado em uma autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 121°C. A junção de vidro na parte superior do biorreator foi fechada com um selante de silicone para garantir que não haveria vazamentos de líquido ou de gás no biorreator. Tubos Tygon® foram usados para transferir o meio de cultura para a parte inferior do biorreator e para remover o efluente da parte superior deste. Para garantir um ambiente anaeróbico

dentro do biorreator nitrogênio foi introduzido continuamente à parte inferior, com uma baixa vazão, antes e durante o carregamento do meio poroso. A Figura 3 mostra um diagrama da montagem experimental. O biorreator foi mantido a uma temperatura de 32°C usando uma caixa aquecida por uma lâmpada de 25 W e um controlador de tensão AC.

A solução aquosa foi introduzida na parte inferior do biorreator usando uma bomba peristáltica (modelo 77912-00 de Masterflex® L/S®) com tubulações de PTFE. A solução foi coletada na parte superior do biorreator. O gás sulfídrico eventualmente gerado durante os experimentos foi coletado em dois reservatórios contendo solução alcalina com 10% e 5% de $ZnCl_2$, o que neutraliza o ácido e precipita o sulfeto como ZnS . O pH destas soluções foi periodicamente medidos e ajustados com $NaOH$. A turbidez das soluções foi monitorada regularmente.

O meio líquido com sulfato foi introduzido na parte inferior do biorreator através de um tubo Tygon usando uma bomba peristáltica. Antes de ligar a bomba, toda a tubulação foi lavada com uma solução de álcool etílico a 70% para minimizar a possibilidade de contaminação. Aproximadamente dois volumes do poro de meio foram bombeados através do biorreator para assegurar de que o meio poroso estivesse completamente preenchido. A solução aquosa no topo do biorreator foi coletada em um recipiente. Para a operação do equipamento a bomba peristáltica foi mantida desligada e foi inoculado no interior do biorreator uma solução enriquecida de BRS em três saídas laterais (parte inferior, central e superior) para assegurar o estabelecimento de um biofilme uniforme. Depois da inoculação, as tubulações das partes superior e inferior do biorreator foram fechadas para manter o equipamento livre de contaminação. Ao longo do tempo amostras foram tomadas nos três pontos (parte inferior, meio e superior) e analisadas para a determinação dos teores de sulfato e sulfeto em solução aquosa, além do potencial redox.

Inicialmente o biorreator foi operado de forma descontínua. Nesta fase a atividade das bactérias foi monitorada determinando-se as concentrações de sulfato e sulfeto em solução aquosa assim com o potencial redox. Quando a conversão de sulfato foi praticamente completa a operação do biorreator passou a ser contínua, ligando-se a bomba peristáltica e alimentando o biorreator com uma solução a uma taxa de 2,6 ml/min. O estado estacionário foi assumido quando a variação na conversão do sulfato foi menor que 10% em um período de operação igual a duas vezes o tempo de residência da solução, que foi determinado previamente em experiências da distribuição do tempo de residência que corresponde a aproximadamente 24 horas (Bernardez et al., 2008).

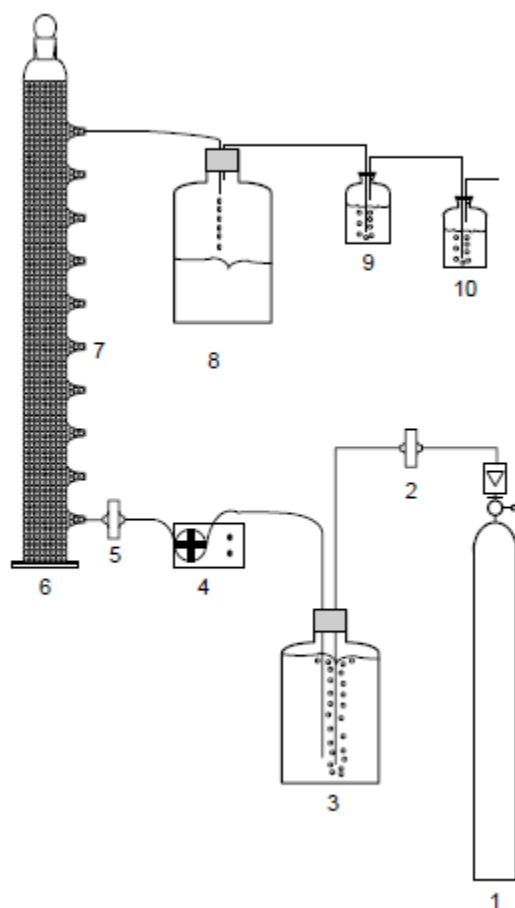


Figura 3: Diagrama esquemático da montagem experimental usada. Os números indicam: 1) Cilindro do nitrogênio, 2) porta-filtro, 3) recipiente do meio de cultura, 4) bomba peristáltica, 5) filtro, 6) biorreator de leito fixo, 7) pontos de amostragem, 8) recipiente de recepção, 9) primeiro recipiente de proteção, 10) segundo recipiente de proteção.

Uma cultura mista das BRS, que foi enriquecida a partir de água produzida em campos de petróleo da Bacia do Recôncavo, foi usada como inoculo. Dentro da câmara anaeróbica (Bactron VI, Shellab, Sheldon Manufacturing, Incorporation) a 38°C um volume de 100 µL da cultura mista de BRS contendo cerca de 2.0×10^9 NMP/mL foi inoculado e enriquecido em um meio de cultura padrão. O meio de Postgate modificado foi usado para o crescimento das BRS. O lactato do sódio foi usado como fonte de carbono e como potencial doador de elétron, pois suporta o crescimento de uma grande variedade de bactérias, apoiando uma diversidade microbiana. Neste meio a formação de um precipitado preto indica a formação de FeS.

A composição do meio de Postgate modificado contido em um litro: Ágar, 2.0 g (Difco); KH_2PO_4 , 0.5 g (Merk); NH_4Cl , 1.0g (suporte de J.T.); Na_2SO_4 , 1.0 g (Merk); CaCl_2 , 1.0 g (Vetec); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, g 1.83 (Merk); fermento, 1.0 g (Merk); ácido ascórbico, 0.1 g (Merk); tioglicolato do sódio, 0.013 g (Vetec); citrato de sódio, 6.38 g (Synth); lactato do sódio 1.75 mL; NaCl (Quemis) 3.5%, resazurina, 2.0 mL (Vetec)

0.025% P/V, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g (Merk). Todos os componentes foram dissolvidos em água deionizada e o pH foi ajustado para a faixa de 7.5 a 8.0 usando uma solução 5M de HCl. Após isto, a solução foi homogeneizada por agitação e esterilizada a 121°C por 30 minutos. Um meio de Postgate modificado, sem ágar, foi usado para permitir escoar a solução através do biorreator. Este meio foi preparado em um frasco de dois litros, esterilizado por 30 minutos a 121°C, refrigerado à temperatura ambiente e em seguida purgado com nitrogênio por aproximadamente duas horas antes de usá-lo como uma alimentação para o biorreator. A concentração total de sulfato era aproximadamente de 200 mg/l. Para manter a condição anaeróbica durante a experiência e para impedir a contaminação do meio, nitrogênio foi injetado periodicamente.

As amostras do experimento analisadas com cromatógrafo iônico (ICS-3000 da Dionex) com bomba de gradiente, detector da condutividade e válvula da injeção. Todos os ânions foram determinados simultaneamente usando colunas de troca iônica Ionpac AS11-HC (4x250 mm D.I.) e AS7 Dionex. A fase móvel foi formada por uma solução 0,1M NaOH/0,5 M AcNa/0,5% (v/v) EDTA em eluição isocrática com 1,0 ml/min. Para impedir a contaminação das amostras pipetas sem uso e filtros foram usados em cada amostra e todos as vidrarias foram lavadas com sabão ficando imersa por 24 horas e enxaguadas com água ultra pura.

A amostragem foi executada usando seringa com agulha Precision Glide esterilizada de 1,0 ml e transferida para um tubo de ensaio de 1,0 mL. Cada amostra foi diluída cem vezes com água deionizada (de resistividade 18,2 mΩ) em balões volumétricos de 100 ml contendo NaOH 1,0 M. As amostras foram filtradas usando membranas de acetato de celulose de 0,22 mm. Um volume de 5,0 ml foi transferido para tubos de 20 ml e injetado diretamente no sistema através do amostrador automático AS40.

O teor de sulfeto nas soluções foi medido por cromatografia iônica. O mesmo procedimento usado para as análises do sulfato foi usado exceto que neste caso as concentrações de S^{2-} foram medidas usando um detector amperimétrico.

Para as medidas do pH um foi usado o medidor Thermo de Orion PerpHecT (modelo 330). O medidor de pH foi regularmente calibrado usando as soluções tampões (pH de 4 e de 7). Os potenciais redox, ΔE_h , foram medidos *ex-situ* usando um elétron de ORP com um elétron de referência interno de Ag/AgCl da Cole-Parmer. As medidas foram calibradas com soluções padrão de ORP (Analion) de 470 e de 220 mV em 20°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O biorreator foi operado inicialmente na forma descontínua visando a geração do biofilme. O meio líquido tinha um teor inicial de sulfato de 200 mg/l e foi introduzido na parte inferior do biorreator por uma bomba peristáltica. Neste período de operação descontínua a atividade microbiana foi monitorada através da determinação das concentrações de sulfeto e sulfato e do potencial redox. Após um período de incubação o biofilme foi iniciado e após sete dias o biofilme formou-se ao longo de todo o leito do biorreator.

Depois da inoculação das BRS e do período da incubação a atividade das bactérias e a produção de sulfetos iniciaram. Os perfis de concentrações do sulfato e do sulfeto em função do tempo são mostrados na Figura 4. A concentração de sulfato na solução diminui exponencialmente até aproximadamente 50 mg/l, e a concentração de sulfeto produzido aumentou alcançando um valor máximo igual a aproximadamente 50 mg/l. Ao longo da fase descontínua do experimento o pH do meio manteve-se relativamente constante em 7.5 e a conversão do sulfato chegou a cerca de 75% em um período de sete dias. Durante esta fase descontínua do experimento uma diminuição gradual no potencial redox da solução foi observada, como é mostrado na Figura 5.

Nota-se que as concentrações de sulfeto medidas representam apenas o íon S^{2-} e não pode levar em consideração HS^- , H_2S e outras espécies geradas pelo equilíbrio iônico (ver Figuras 1 e 2). Isso explica o aparente desequilíbrio na massa de enxofre. Esta mesma observação foi relatada em um estudo precedente (Baskaran and Nemati, 2006). Um valor do potencial redox igual a -313 mV é considerado o valor de maior eficiência para as BRS. Foi observado também que não houve precipitação de ZnS nos recipientes de proteção durante o experimento indicando que não houve formação de H_2S .

O tempo no qual a bomba foi ligada é indicado nas Figuras 4 e 5 pelas linhas verticais tracejadas. Neste ponto, houve uma diminuição transiente na concentração de sulfeto dissolvido devido aos efeitos da diluição. Como a biomassa dentro do biorreator se ajustou às mudanças na alimentação, as concentrações de sulfeto e sulfato retornaram aos seus valores originais. Figura 4 mostra que conversão do sulfeto é superior a 95% no final do teste. Figura 5 mostra a evolução temporal do potencial redox da solução que alcança um valor de aproximadamente -300 mV.

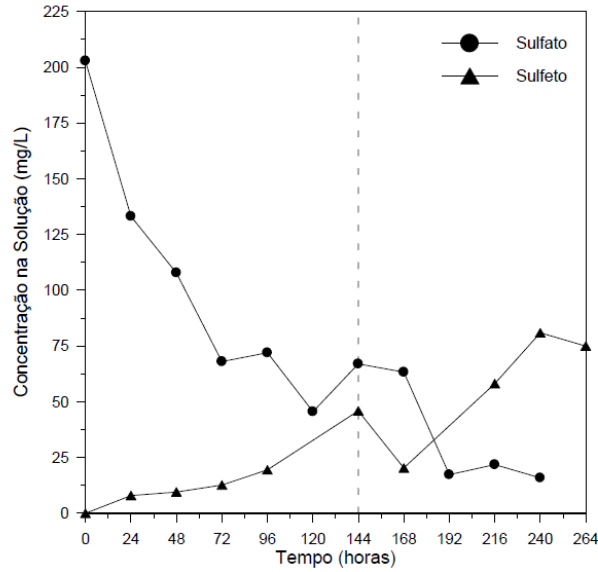


Figura 4: Evolução temporal das concentrações de sulfato e sulfeto em solução. A linha pontilhada indica o fim do regime descontínuo e o início da operação da bomba peristáltica.

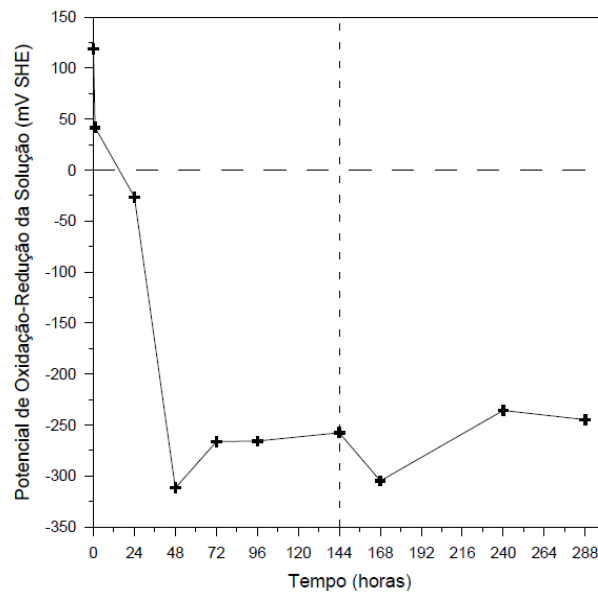


Figura 5: Evolução temporal do potencial redox da solução. A linha pontilhada indica o fim do regime descontínuo e o início da operação da bomba peristáltica.

Assumindo que o biorreator operando em regime descontínuo tem um comportamento análogo a um biorreator de volume constante, os modelos cinéticos aparentes para o consumo de sulfato e para a produção do sulfeto podem ser aproximados por:

$$\frac{dC_{SO_4^{2-}}}{dt} = -k_{SO_4^{2-}} C_{SO_4^{2-}}^\alpha \quad (2)$$

$$C_{SO_4^{2-}}(0) = C_{SO_4^{2-},0} \quad (3)$$

$$\frac{dC_{S^{2-}}}{dt} = k_{S^{2-}} (C_{S^{2-},\infty} - C_{S^{2-}})^\beta \quad (4)$$

$$C_{S^{2-}}(0) = 0 \quad (5)$$

onde $C_{SO_4^{2-}}$ é a concentração de sulfato na solução, $k_{SO_4^{2-}}$ é a constante cinética de consumo de sulfato, α é a ordem da reação de consumo de sulfato, $C_{SO_4^{2-},0}$ é a concentração inicial de sulfato na solução, t é o tempo, $C_{S^{2-}}$ é a concentração de sulfeto na solução, $k_{S^{2-}}$ é a constante cinética de geração de sulfeto β é a ordem da reação de geração de sulfeto, $C_{S^{2-},\infty}$ é a concentração final de sulfeto na solução.

As equações 2 e 4 foram integradas numericamente usando as condições iniciais dadas pelas equações 3 e 5 e o método de Runge-Kutta de quarta ordem. Os parâmetros cinéticos ($k_{SO_4^{2-}}$, $k_{S^{2-}}$, α , β , $C_{S^{2-},\infty}$) foram estimados através de um ajuste não linear usando o método dos mínimos quadrados. A Figura 6 mostra os pontos experimentais e as curvas ajustadas para as concentrações de sulfato e sulfeto em solução.

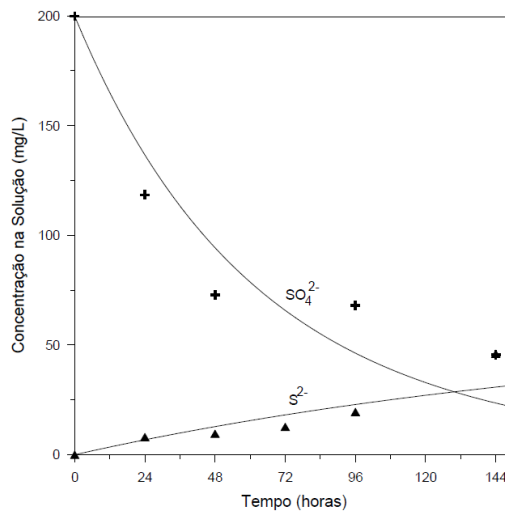


Figura 6: Ajuste do modelo cinético para a conversão do sulfato e sulfeto no regime descontínuo.

As equações abaixo mostram as equações cinéticas globais ajustadas e indicam que a conversão do sulfato e a geração do sulfeto são ambos processos de primeira ordem, sendo a primeira reação mais rápida que a segunda.

$$r_{SO_4^{2-}} = -10,9 \times 10^{-3} C_{SO_4^{2-}}^{1,1} \quad \text{mg/L.h}$$

$$r_{S^{2-}} = 3 \times 10^{-3} (60,0 - C_{S^{2-}})^{1,0} \quad \text{mg/L.h}$$

4. CONCLUSÕES

Este estudo investigou a atividade de uma cultura de bactérias redutoras de sulfato coletada em um reservatório de petróleo da Bacia do Recôncavo. As medidas do potencial de redox da solução foram usadas igualmente para monitorar o crescimento e a atividade do SRB durante todos os funcionamentos experimentais. Os resultados indicam que a conversão do sulfato e a geração do sulfeto são ambos processos de primeira ordem.

5. AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi suportada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (projeto PNPd 014/089) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (projetos 475810/2008-2 e 476344/2009-5). C.L.S. Ramos agradece a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa mestrado para este projeto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baskaran V., Nemati M., Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir, *Biochem. Eng. J.*, 31, 148-159, 2006.

Bernardez L.A., Andrade Lima L.R.P., Almeida P.F., The hydrodynamics of an upflow packed bed bioreactor at low Reynolds number, *Braz. J. Pet. & Gas.*, 2, 114-121, 2008

Elliott P., Ragusa S., Catcheside D., Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage, *Water Res.*, 32, 3724-3730, 1998.

Hammack R.W., de Vegt A.L., Schoeneman A.L., The removal of sulfate and metals from mine waters using bacterial sulfate reduction: pilot plant results, *Mine Water Environ.*, 17(1), 8-27, 1998.

Jong T., Parry D.L., Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in a bench scale upflow anaerobic packed bed reactor, *Water Res.*, 37, 3379-3389, 2003.

Lenz P., Vallero M., Esposito G., Zandvoort M., Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 1, 311-325, 2002.

Millero F.J., The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide systems in natural waters. *Mar. Chem.*, 18, 121-147, 1986.

Moosa S., Harrison S.T.L., Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage, *Hydrometallurgy*, 83, 214-222, 2006.

Okabe S., Nielsen P.H., Characklis W.G., Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 725-734, 1992.

Okabe S., Nielsen P.H., Jones W.L., Characklis W.G., Sulfate product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures, *Water Res.*, 2, 571-578, 1995.

O artigo a seguir tem o título: *Kinetic Analysis of Microbial Sulfate Reduction in an Upflow Packed-Bed Anaerobic*. Após a realização dos experimentos em meio contendo baixa concentração de sulfato, novos experimentos foram montados para avaliar a influência do aumento da concentração de sulfato na cinética de crescimento microbiano. As concentrações escolhidas foram 1000 e 3500mg /L.

**KINETIC ANALYSIS OF MICROBIAL SULFATE REDUCTION IN AN UPFLOW
PACKED-BED ANAEROBIC**

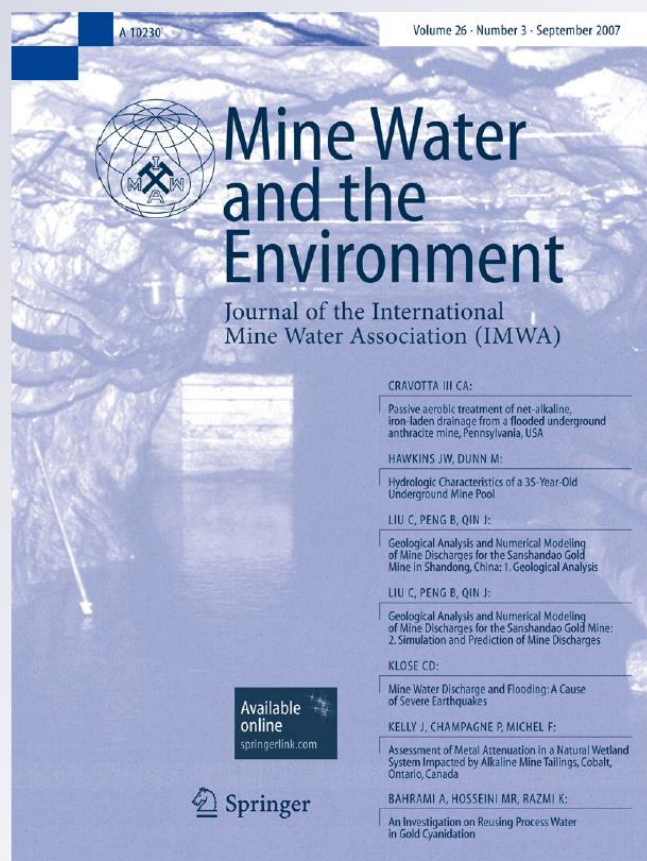
A Kinetic Analysis of Microbial Sulfate Reduction in an Upflow Packed-Bed Anaerobic Bioreactor

L. A. Bernardez, L. R. P. de Andrade Lima, C. L. S. Ramos & P. F. Almeida

Mine Water and the Environment
Journal of the International Mine Water Association (IMWA)

ISSN 1025-9112

Mine Water Environ
DOI 10.1007/s10230-012-0170-z



 Springer

A Kinetic Analysis of Microbial Sulfate Reduction in an Upflow Packed-Bed Anaerobic Bioreactor

L. A. Bernardez • L. R. P. de Andrade Lima • C. L. S. Ramos • P. F. Almeida

L. A. Bernardez, C. L. S. Ramos, P. F. Almeida
Department of Bio-Interaction Science, Federal University of Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Salvador, BA 40110-902, Brazil

L. R. P. de Andrade Lima
Department of Materials Science and Technology, Federal University of Bahia, CP 6974, Salvador, BA 41810-971, Brazil e-mail: lelo@ufba.br

Received: 17 May 2011 / Accepted: 26 January 2012 - Springer-Verlag 2012

Abstract

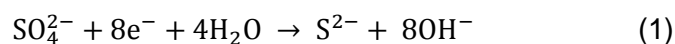
The effects of initial sulfate concentration on anaerobic sulfate reduction and sulfide generation kinetics were investigated in an up-flow bioreactor, using a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB) from water produced from a Brazilian oil reservoir. Redox potential and sulfate concentration were measured to indicate the growth and activity of the SRB throughout the experimental runs. The results of the batch regime indicate that sulfate conversion and sulfide generation are both first order processes for initial sulfate concentrations of 1,000 and 3,500 mg/L. The kinetic constants for the sulfate conversion indicate that the enhanced initial sulfate content was initially inhibiting, but that the sulfide generation reaction is almost independent of the initial sulfate concentration, likely due to the presence of at least two in series processes that are faster than the microbial conversion of the sulfate.

Keywords: Acid mine drainage, Brazil, *Desulfovibrio vulgaris*, Sulfate reducing bacteria, Treatment

Introduction

Wastewater from mining often contains elevated levels of sulfate and potentially toxic elements. The biological treatment of wastewater from mining using sulfate-reducing bacteria (SRB) is a relatively low-cost option that has received attention (Hammack et al. 1998; Lenz et al. 2002; Luo et al. 2008; Moosa and Harrison 2006; Nemati et al. 2001; Ros and Mejac 1991; Tsukamoto et al. 2004; Zamzow et al. 2006). Evaluation of the kinetics of sulfate consumption and sulfide generation for a specific SRB population is important in predicting the SRB activity.

Sulfate reduction by SRB follows the reaction below, where the electrons are generated by the oxidation of a source of carbon and energy, such as organic acids and alcohols (Lenz et al. 2002):



Kinetic studies have been performed with SRB in batch and continuous reactors (Okabe et al. 1992, 1995). Up-flow packed-bed bioreactors have been widely used in industrial microbiology, including the study of the anaerobic activity of SRB in oil fields, due to the large surface area available for the attachment of microorganisms and the reduced bioreaction time (Chen et al. 1994; Elliott et al. 1998; Jong and Parry 2003). High volumetric productivities have been reported in packed bed bioreactors compared to other configurations (Nagpal et al. 2000). In these reactive systems, the growth and activity of the SRB throughout the experimental runs have been assessed using plating, which typically requires 48–72 h.

In the bioremediation of acid mine drainage and other sulfate-laden wastewaters using SRB, sulfate reduction is a critical step (Baskaran and Nematı 2006). Studies with suspended mixed SRB consortia (fed with acetate and ethanol) and lactate-fed immobilized SRB cells have shown that sulfate reduction reaction kinetics is influenced by the influent sulfate concentration (Lenz et al. 1995; Moosa et al. 2002, 2005; Oyekola et al. 2010).

As described in Eq. 1, during growth of the SRB, the pH increases due to the generation of OH⁻ ions, and the redox potential of the solution decreases due to the consumption of electrons. The shape of the redox potential curve is characteristic of the type of microorganism and generally, SRB can grow in the culture medium at an Eh range of -100 to -500 mV. The pH determines whether the dissolved sulfide occurs as S²⁻, HS⁻, or H₂S, while the redox potential determines whether the sulfide is found as SO₄²⁻, S, HSO₄⁻, etc. (Millero 1986). For an initial pH value of about 7.5, most of the sulfide content is HS⁻. If the pH increases, the concentration of S²⁻ will increase. The species predominance is also a function of the solution redox potential. At a pH ranging from 7.5 to 8.0 and the range of redox potential values obtained during the experiments, the predominant sulfide form is HS⁻. Temperature also affects sulfur speciation and is an important variable in most of microbiologic processes. Despite the fact that SRB are active at 6°C (Tsukamoto et al. 2004), SRB activity slows down at low temperatures and the optimal temperature is about 30–39°C. The kinetic tests presented in this study were performed at 32 °C, because this temperature is close to the optimum value for SRB growth and can be found in some environments in the

sulfide mines located in Brazil's arid region.

This paper investigates the activity of a mixed SRB culture including a strain of *Desulfovibrio vulgaris* ssp *vulgaris* DP4, which was collected from a Brazilian soured oil reservoir. An up-flow bioreactor packed with glass beads was used. The effects of the initial sulfate concentration on the anaerobic sulfate reduction and sulfide generation kinetics were investigated. Two initial sulfate concentration were used, respectively 1,000 and 3,500 mg/L.

Materials and Methods

Experimental Setup

The upflow packed-bed bioreactor used in this study was made using a 1 L graduated Pyrobras_ (D:6 cm and H:32 cm) glass column with ten lateral sampling ports at 3.6 cm intervals. All sampling ports were sealed using a silicon septum. The bioreactor was then packed with 3.0 mm glass beads to provide a matrix for the establishment of the biofilm. The measured porosity of the stream bed was 40%. Following the packing with the carrier matrix, the bioreactor was sterilized in an autoclave for 30 min at 121°C. The glass joint at the top of the bioreactor was sealed with silicon sealant to make sure that there were no leaks from the bioreactor. Tygon tubing was used to transfer the medium into the bottom of the bioreactor and to remove the effluent from the top of the bioreactor. To guarantee an anaerobic environment inside the column, nitrogen was introduced continuously to the bottom of the column at a low flow rate, prior to and during the packing of the carrier matrix. A diagram of the experimental set-up is shown in Fig. 1. The bioreactor was maintained at 32 °C using a box heated by a 25 W electric lamp and a variable AC voltage controller.

The solution was fed into the bottom of the reactor, close to the inferior part of the column with a peristaltic pump (Masterflex_ L/S_ model 77912-00) using polytetrafluorethylene (PTFE) tubing. The solution was then collected at the top of the column.

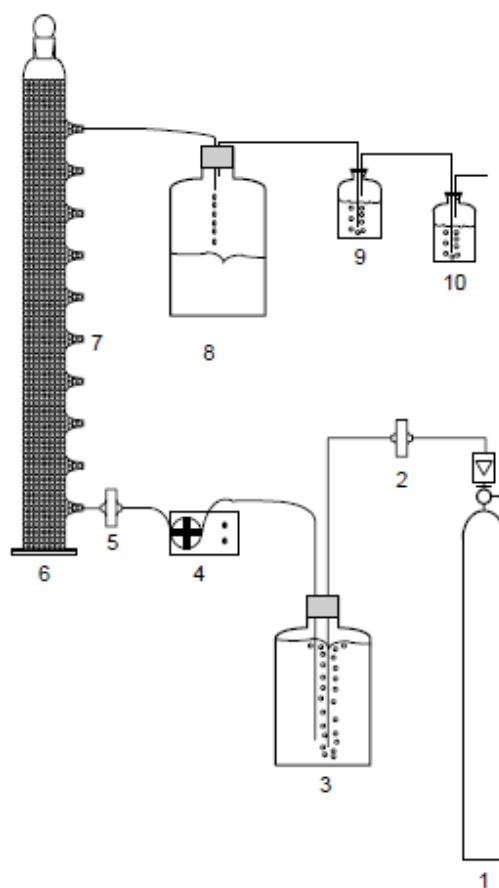


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental set-up used for column kinetic studies. The numbers stand for: 1 nitrogen cylinder, 2 filter, 3 medium container, 4 peristaltic pump, 5 filter, 6 packed bed bioreactor, 7 sampling ports, 8 effluent container, 9 primary trap, 10 secondary trap.

The gas generated during the experiment was collected in a reservoir containing an alkaline 10% ZnCl_2 solution to precipitate ZnS . The pH of the trap solution was periodically measured and adjusted by adding pellets of NaOH . To make sure that no loss of H_2S occurred, the hydrogen sulfide (H_2S) of the effluent of the first container was transferred to a second trap containing an alkaline 5% ZnCl_2 solution. Solution turbidity was monitored for ZnCl_2 precipitation.

The liquid medium with sulfate was fed into the bottom of the bioreactor via Tygon tubing using a peristaltic pump. Before turning the pump on, all the tubing was washed with 70% ethanol solution to minimize the possibility of contamination. About two pore volumes of medium were pumped through the bioreactor to ensure that the medium completely filled the voids. The effluent stream left the top of the reactor and was collected in an effluent vessel. The pump was then switched off and the bioreactor was inoculated by injecting SRB enrichment into three sampling ports (bottom, medium, and top). The inoculation was performed from the bottom port to the top port to prevent the outflow of inoculum through the effluent tubing at the top and to assure

the establishment of a uniform biofilm. Following the inoculation, the tubing at the top and bottom of the bioreactor was clamped to keep the bioreactor free from contamination. Samples were taken from the three ports (bottom, middle, and top) and analyzed for sulfate and sulfide.

Initially, the bioreactor was operated in batch mode, during which microbial activity was monitored by determining concentrations of sulfide, sulfate, and the redox potential. Once the conversion of sulfate was almost 100%, the bioreactor was switched to continuous mode by pumping medium into the bioreactor at a low flow rate (2.6 mL/min). Steady state conditions were assumed to be established when the sulfate conversion varied by less than 10% during a period of about 24 h, which had previously been determined to be equal to at least two residence times (Bernardez et al. 2008).

Microbial Culture and Medium

A mixed culture of SRB was enriched from the water produced from the oil fields from the Reconcavo Basin, Brazil and used as an inoculum. This culture was dominated by *Desulfovibrio* species. A volume of 100 μ L of mix culture of SRB containing about 2.0×10^9 NMP/mL was inoculated and enriched in a culture medium inside the anaerobic chamber (Bactron VI, Shellab, Sheldon Manufacturing Inc.) at 38_C. The modified Postgate medium, in which sodium lactate is used as a potential carbon source and electron donor, was used for the growth of the SRB.

This medium contained (per liter): agar, 2.0 g; KH₂PO₄, 0.5 g; NH₄Cl, 1.0 g; Na₂SO₄, 1.0 g; CaCl₂, 1.0 g; MgCl₂.6H₂O, 1.83 g; yeast extract, 1.0 g; ascorbic acid, 0.1 g; sodium thioglycollate, 0.013 g; sodium citrate, 6.38 g; sodium lactate 1.75 mL; NaCl 3.5%, resazurin, 2.0 mL 0.025% w/v, and FeSO₄.7H₂O, 0.5 g. All the components were dissolved in deionized water and the pH was adjusted to 7.5–8.0 using 5 M HCl. After this, the solution was homogenized by agitation and later sterilized at 121°C for 30 min. It supports the growth of a wide spectrum of SRB, encouraging microbial diversity (Oyekola et al. 2010). In this medium, the formation of black precipitate indicates the formation of FeS.

Culture Medium for the Bioreactor

A second modified Postgate medium was used in the bioreactor experiments. It was the previous modified Postgate medium without agar. The medium was prepared

in a 2 L flask, autoclaved for 30 min at 121 °C, cooled to room temperature and then purged with nitrogen for about 2 h before using it as a feed for the bioreactor. The initial concentration of sulfate used in the first kinetic test was the original amount of the modified Postgate medium, about 1,000 mg/L. In the second kinetic test, the initial concentration of sulfate was 3,500 mg/L; in this case, the amount of Na₂SO₄ and FeSO₄·7H₂O were proportionately enhanced in the culture medium to reach this concentration. The amount of the other components of the culture medium was the same. To maintain anaerobic conditions and to prevent contamination of the medium, nitrogen was purged periodically through the medium bottle during the experiment.

Sulfate Concentration

The sulfate concentration was measured by a turbidimetric method (Kolmert et al. 2000) that is based on the precipitation of sulfate ions as barium sulfate. Samples to be analyzed for sulfate was treated with an excess of zinc acetate dehydrate crystals to precipitate dissolved sulfide as zinc sulfide. Fixation of sulfide prevented oxidation to sulfate. Using 1.5 mL microcentrifuged tubes, 1.0 mL culture samples were stirred for 5 s with approximately 0.01 g of zinc acetate. The mixture was then centrifuged for 10 min at 6,000 rpm and at 4 °C. Then, 50µL of the supernatant was mixed with 950µL of the conditioning fluid in a fresh microcentrifuge tube and stirred for 5 s. Then, approximately 0.01 g of barium chloride dehydrate crystals was added to the mixture, which was then stirred for 15 s; the relative absorbance was then immediately read at 420 nm using a UV/Visible spectrophotometer. The calibration standards were prepared using sodium sulfate and deionized water.

Sulfide Concentration

The dissolved sulfide concentration was measured using the turbidimetric method (Cord-Ruwish 1985) immediately after sampling to prevent its oxidation and volatilization. The assay is based on the precipitation of sulfide as a colloid copper sulfide. Using 1.5 mL microcentrifuge tubes, 50 µL of the culture samples was mixed with a 950µL copper solution (5 mM CuSO₄·5H₂O and 50 mM HCl) and then stirred for 5 s. Then, the relative absorbance was measured immediately at 480 nm using a UV/Visible spectrophotometer. Calibration standards at 100, 200, 300, 400, 500, 600, and 700 mg/L were used for the analysis at higher sulfide concentrations.

Solution pH and Oxidation–Reduction Potential

The pH was measured with a Thermo Orion PerpHecT Meter (Model 330). The pH meter was regularly calibrated using pH 4 and 7 buffer solutions. Redox potential differences, DEh, were measured ex-situ using an ORP electrode with an internal Ag/AgCl reference electrode from Cole-Parmer. The measurements were calibrated with ORP standard solutions (Analion) of 470 and 220 mV at 20 °C.

Results and Discussion

Batch Operation of the Packed-Bed Bioreactor

In the first experiment, a liquid medium with sulfate content of 1,000 mg/L was introduced into the bottom of the bioreactor by a peristaltic pump and the bioreactor was inoculated by injecting 10 mL of SRB enrichment into the three sampling ports. Initially, the bioreactor was operated in batch mode, during which microbial activity was monitored by determining concentrations of sulfide and sulfate and the redox potential. After 7 days, a biofilm had formed all along the bed of the bioreactor.

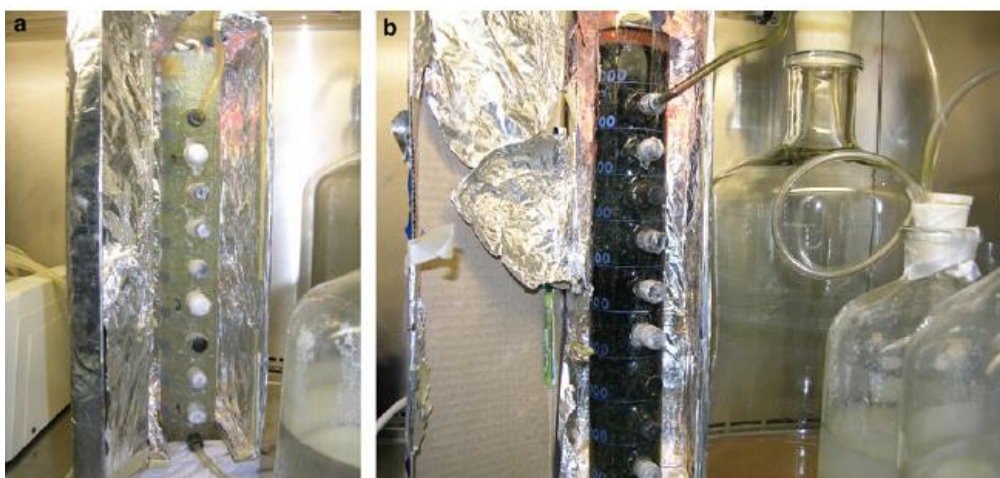


Fig. 2 Biofilm formation in the bioreactor; **a** after inoculation; and **b** after 7 days of operation

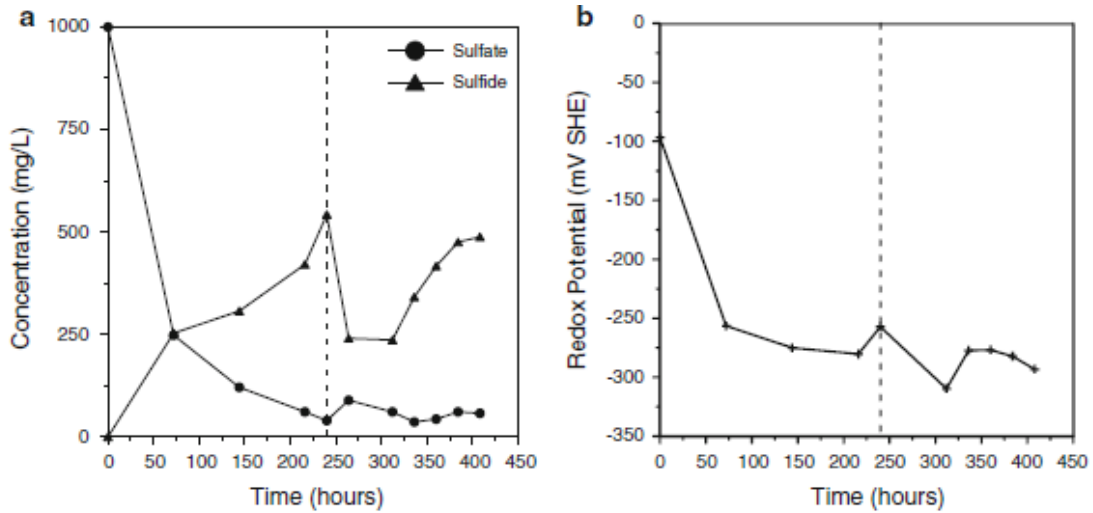


Fig. 3 Column kinetic **a b** experiment results at initial sulfate concentration equal to 1,000 mg/L: **a** sulfate and sulfide concentration time evolution, **b** solution oxidation–reduction potential time evolution. Dashed line indicates the end of the batch regime and the startup of the peristaltic pump for medium circulation

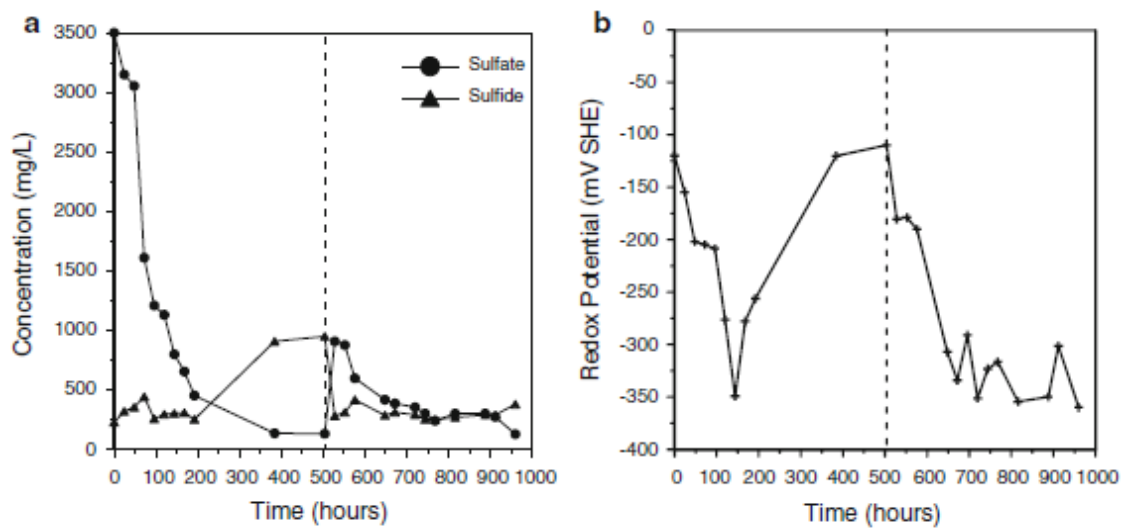


Fig. 4 Column kinetic experiment results at initial sulfate concentration equal to 3,500 mg/L: **a** sulfate and sulfide concentration time evolution, **b** solution oxidation–reduction potential time evolution. Dashed line indicates the end of the batch regime and the startup of the peristaltic pump for medium circulation

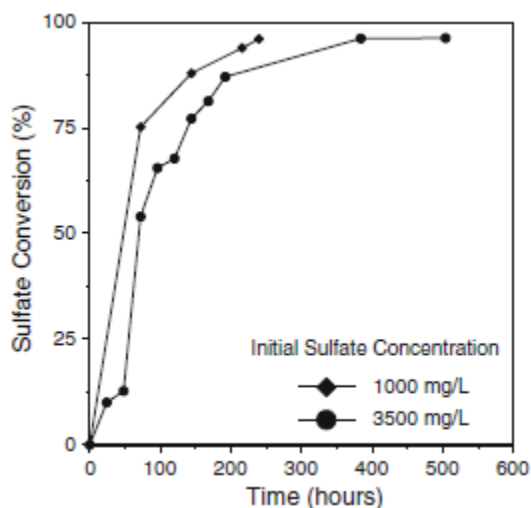


Fig. 5 Sulfate conversion evolution for the batch regimes in the column experiment

After stabilization of the sulfate conversion, the peristaltic pump was switched on. Figure 2a, b illustrates the process of biofilm formation. The profiles of sulfate and sulfide concentrations as a function of time are shown in Fig. 3a. The sulfate concentration decreased exponentially to about 50 mg/L, and the produced sulfide content increased, reaching a maximum value of about 500 mg/L. At the beginning of the experiment, the environment pH was relatively constant at 7.5. A conversion of sulfate of about 80% was obtained over a period of 7 days. During this period, a gradual decrease in the solution redox potential was observed, as shown in Fig. 3b.

The measured sulfide content represents only the S^{2-} ion and cannot account for HS^- , H_2S , and other species generated by the ionic equilibrium, which explains the apparent sulfur mass imbalance. The same observation was reported in a previous study (Baskaran and Nematı 2006). The redox potential value of about -300 mV was the threshold for optimal sulfate reduction. It was also noted that ZnS precipitation was not observed in the traps; thus, H_2S was not volatilized during the experiment.

The effect of enhanced initial sulfate content on the process kinetics was determined by feeding a solution with an initial sulfate concentration of 3,500 mg/L into the bottom of the bioreactor. Figure 4a shows the profiles of residual sulfate and produced sulfide concentrations as a function of time. During batch mode operation, the sulfate content decreased from 3,500 to 130 mg/L (a conversion of about 96%) and the sulfide concentration increased to 949 mg/L. At the beginning of the experiment, the pH of the solution was relatively constant at 7.5. The solution redox potential profile (Fig. 4b) was analogous to the previous cases, and again, no ZnS precipitation was observed in the traps during the experiment.

Continuous Operation of the Packed-Bed Bioreactor

The time the pump was turned on is indicated in Figs. 3a and 4a by the dashed vertical lines. In all cases, there was a transient decrease in dissolved sulfide concentration due to the effects of dilution. As the biomass within the bioreactor adjusted to changes in the feed, the sulfide and sulfate concentrations returned to their original value. Figures 3a and 4a show sulfide conversions of greater than 95% by the end of the tests. Figures 3b and 4b show how the redox potential evolved, reaching a value of about -300 mV.

A Kinetic Model for the Batch Operation

To evaluate the effect of the sulfate concentration on sulfate consumption, the sulfate conversion evolution for the two cases was contrasted; the conversion was defined by:

$$x(t) = \frac{C_{SO_4^{2-}}(0) - C_{SO_4^{2-}}(t)}{C_{SO_4^{2-}}(0)} \times 100 \quad (2)$$

where $C_{SO_4^{2-}}(0)$ is the initial sulfate concentration and $C_{SO_4^{2-}}(t)$ is the sulfate content at time t . (Fig. 5). It can be seen that sulfate conversion was inhibited at the enhanced initial sulfate content, yet in both cases, 95% of the sulfate was converted between 10 and 15 days. Figure 6 shows the relationship between the solution reduction–oxidation potential and the sulfate conversion for the batch regime. The significant agreement between these variables is convenient to process monitoring, since redox potential can be easily and quickly measured.

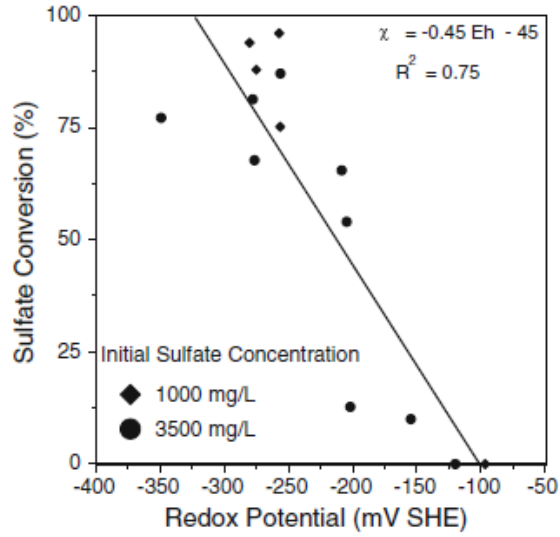


Fig. 6 Relationship between the reduction–oxidation potential and sulfate conversion

Assuming that the bioreactor is operating as a batch reactor of constant volume, the apparent kinetic models for sulfate consumption and sulfide production are proposed as follows:

$$\frac{dC_{SO_4^{2-}}}{dt} = -k_{SO_4^{2-}} C_{SO_4^{2-}}^\alpha \quad (3)$$

$$C_{SO_4^{2-}}(0) = C_{SO_4^{2-},0} \quad (4)$$

$$\frac{dC_{S^{2-}}}{dt} = k_{S^{2-}} (C_{S^{2-},\infty} - C_{S^{2-}})^\beta \quad (5)$$

$$C_{S^{2-}}(0) = 0 \quad (6)$$

$C_{SO_4^{2-},0}$ (mg/L)	$k_{SO_4^{2-}}$ [(mg/L) $^{1-\alpha}$ /h]	α	$k_{S^{2-}}$ (L/h)	β	$C_{S^{2-},infty}$ (mg/L)
1,000	-11.1×10^{-3}	1.1	3.0×10^{-3}	1.0	600.0
3,500	-5.7×10^{-3}	1.1	3.0×10^{-3}	1.0	1,000.0

Table 1 Kinetic parameters for the sulfate conversion for the batch regimes in the column experiments

where $C_{SO_4^{2-}}$ is the dissolved sulfate concentration, $k_{SO_4^{2-}}$ is the sulfate consumption kinetic constant, α is the sulfate consumption reaction order, $C_{SO_4^{2-},0}$ is the initial dissolved sulfate concentration, t is time, $C_{S^{2-}}$ is the dissolved sulfide concentration, $k_{S^{2-}}$ is the sulfide generation kinetic constant, β is the sulfide generation reaction order, and $C_{S^{2-},\infty}$ is the final dissolved sulfate concentration.

Equations 3 and 5 were numerically integrated using the initial conditions given by Eqs. 4 and 6 and the fourth order Runge–Kutta method. The kinetic parameters ($k_{SO_4^{2-}}$, $k_{S^{2-}}$, α , β , $C_{S^{2-},\infty}$) were evaluated by curve fitting using nonlinear least square. Figure 7a, b shows the resulting curve fittings for the sulfate and sulfide solution concentration for the two cases.

Table 1 summarizes the kinetic parameter estimation. The results indicate that sulfate conversion and sulfide generation are both first-order processes. The kinetic constants for sulfate conversion indicate an inhibition at the enhanced initial sulfate concentration. Sulfate consumption kinetic inhibition of *Desulfovibrio* activity has been previously observed (Okabe et al. 1995). On the other hand, the kinetic constants for sulfide generation indicate that it is virtually independent of the initial sulfate concentration. This result indicates that after the microbial conversion of the SO_4^{2-} to S^{2-} , at least two in-series processes take place. First, in accordance with chemical ionic equilibria, most of the S^{2-} converts to HS^- ; afterwards, some of the HS^- converts to H_2S . The kinetic of these processes seems faster than the microbial conversion of the sulfate (Millero, 1986).

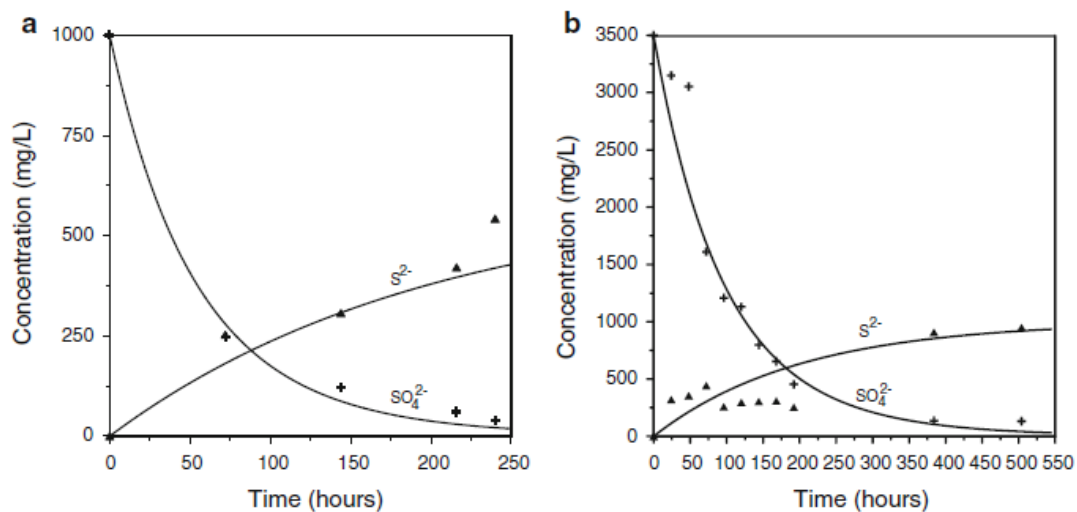


Fig. 7 Kinetic model fitting for sulfate and sulfide conversion for the batch regime in the column experiment; initial sulfate concentration: **a** 1,000 mg/L; **b** 3,500 mg/L

Conclusion

This study investigated the activity of a mixed SRB culture collected from a Brazilian soured oil reservoir. The effects of the initial sulfate concentration (1,000 and 3,500 mg/L) on the anaerobic sulfate reduction and sulfide generation kinetics were investigated in an up-flow bioreactor packed with glass beads. Redox potential measurements were also used to monitor the growth and the activity of the SRB throughout the experimental runs. The results indicate that sulfate conversion and sulfide generation are both first order processes. The kinetic constants for sulfate conversion indicate an initial inhibition at an initial sulfate concentration of 3,500 mg/L. In contrast, the kinetic constants for sulfide generation indicate that this reaction is almost independent of the initial sulfate concentration. This might be due to the presence of at least two in-series processes that are faster than the microbial conversion of the sulfate.

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Project numbers 475810/2008-2 and 476344/2009-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) (Project number PNPd 014/089). C.L.S. Ramos thanks the FAPESB-Brazil for a MS scholarship.

References

- Baskaran V, Nemat M (2006) Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir. *Biochem Eng J* 31:148–159
- Bernardez LA, Andrade Lima LRP, Almeida PF (2008) The hydrodynamics of an upflow packed-bed bioreactor at low Reynolds number. *Braz J Pet Gas* 2:114–121
- Chen CI, Mueller RF, Griebel T (1994) Kinetic analysis of microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in an upflow porous media biofilm reactor. *Biotechnol Bioeng* 43:267–274

Cord-Ruwish R (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Meth* 4:33–36

Elliott P, Ragusa S, Catcheside D (1998) Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Res* 32:3724–3730

Hammack RW, de Vegt AL, Schoeneman AL (1998) The removal of sulfate and metals from mine waters using bacterial sulfate reduction: pilot plant results. *Mine Water Environ* 17(1):8–27

Jong T, Parry DL (2003) Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in a bench scale upflow anaerobic packed bed reactor. *Water Res* 37:3379–3389

Kolmert A °, Wikstro¨m P, Hallberg KB (2000) A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfatereducing bacterial cultures. *J Microbiol Meth* 41:179–184

Lenz P, Massone A, Rozzi A, Verstraete W (1995) Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors. *Water Res* 3:857–870

Lenz P, Vallero M, Esposito G, Zandvoort M (2002) Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Rev Environ Sci Biotechnol* 1:311–325

Luo Q, Tsukamoto T, Zamzow K, Miller G (2008) Arsenic, selenium, and sulfate removal using an ethanol-enhanced sulfate-reducing bioreactor. *Mine Water Environ* 27(2):100–108

Millero FJ (1986) The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide systems in natural waters. *Mar Chem* 18:121–147

Moosa S, Harrison STL (2006) Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage. *Hydrometallurgy* 83:214–222

Moosa S, Nemati M, Harrison STL (2002) A kinetic study on anaerobic reduction of sulfate. Part I. Effect of sulfate concentration. *Chem Eng Sci* 57:2773–2780

Moosa S, Nemati M, Harrison STL (2005) A kinetic study on anaerobic reduction of sulfate. Part II. Incorporation of temperature effects in the kinetic model. *Chem Eng Sci* 60:3517–3524

Nagpal S, Chuichulcherm S, Peeva L, Livingston A (2000) Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng* 70:370–380

Nemati M, Jenneman GE, Voordouw G (2001) Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnol Bioeng* 74:424–434

Okabe S, Nielsen PH, Characklis WG (1992) Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnol Bioeng* 40:725–734

Okabe S, Nielsen PH, Jones WL, Characklis WG (1995) Sulfate product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res* 29:571–578

Oyekola OO, van Hille R, Harrison STL (2010) Kinetic analysis of biological sulphate reduction using lactate as carbon source and electron donor: effect of sulphate concentration. *Chem Eng Sci* 65:4771–4781

Ros M, Mejac B (1991) Treatment of wastewater in an upflow packed-bed reactor. *Water Sci Technol* 24:81–88

Tsukamoto TK, Killion HA, Miller GC (2004) Column experiments for microbial treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Res* 38:1405–1418

Zamzow KL, Tsukamoto TK, Miller GC (2006) Waste from biodiesel manufacturing as an inexpensive carbon source for bioreactors treating acid mine drainage. *Mine Water Environ* 25:163–170 *Mine Water Environ* 123

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os experimentos realizados, que deram origem aos artigos publicados, foi possível acompanhar a atividade de uma cultura mista de BRS proveniente de poços de petróleo em ambiente controlado. O efeito da concentração de sulfato no meio foi o parâmetro estudado e além da análise das concentrações de sulfato e sulfeto, medidas do potencial redox e do pH também foram utilizados para monitorar o crescimento microbiano.

Dificuldades operacionais ocorreram na montagem dos experimentos, como por exemplo, a contaminação da coluna por fungos, vazamentos pelas portas de amostragem da coluna e a contaminação do meio de cultura antes da injeção no reator. Esses problemas foram sanados com mudanças na montagem do experimento como a passagem de nitrogênio na coluna e a mudança no método de esterilização o que evitou o crescimento de fungos, a utilização de parafilme nas portas de alimentação evitando os vazamentos e a divisão do meio de cultura em porções menores evitando a contaminação do mesmo.

A escolha dos métodos analíticos também foi um complicador. Nos primeiros experimentos realizados foi utilizada a cromatografia para avaliar a concentração dos ânions de interesse. Como o método é bastante sensível e a amostra bastante agressiva, o método teve de ser modificado para espectroscopia. A escolha das concentrações ideais para a construção das curvas padrão para sulfato e sulfeto envolveram estudos prévios das concentrações máximas e mínimas que os ânions são encontrados no processo de redução de sulfato por BRS.

Os efeitos da concentração inicial do sulfato na cinética anaeróbica da redução do sulfato e da geração do sulfeto foram investigados em um biorreator de fluxo ascendente, usando um consórcio de bactérias redutoras de sulfato proveniente de um reservatório de petróleo. As concentrações iniciais de sulfato utilizadas foram 200, 1000 e 3500 mg/L.

No experimento realizado com 200 mg/L os resultados indicaram o crescimento da atividade das bactérias assim como a diminuição exponencial da concentração de sulfato na fase descontínua do experimento. O ajuste de modelos cinéticos indicou que a conversão do sulfato e a geração do sulfeto são ambos processos de primeira ordem e que a primeira reação é mais rápida que a segunda. Já nos experimentos realizados com 1000 e 3500 mg/L, além de confirmar que os processos de conversão do sulfato e da geração do sulfeto são de primeira ordem, as constantes cinéticas para a conversão do sulfato indicam uma inibição inicial para uma concentração de 3000

mg/L de sulfato como indicado na literatura. Em contraste, as constantes cinéticas para a geração de sulfeto indicam que esta reação é quase independente da concentração inicial do sulfato. Isto pôde ser devido à presença pelo menos de dois processos em series que são mais rápidos do que a conversão microbiana do sulfato.

Os resultados obtidos no presente trabalho incentivam as pesquisas direcionadas ao estudo da cinética de redução de sulfato por BRS em anaerobiose, fortalecendo o conhecimento sobre o tema e conduzindo a pesquisa para aplicações em problemas de interesse para a área de produção de petróleo.

6. REFERÊNCIA

AL-ZUHAIR, S.; EL-NAAS, M.H.; AL-HASSANI, H. Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria. **Journal of Biochemical Technology**, v. 1, p. 39-44. 2008.

ANGELL, P.; URBANIC, K. Sulphate-reducing bacterial activity as a parameter to predict localized corrosion of stainless alloys. **Corrosion Science** v. 42, p. 897–912, 2008.

BAO, M.; KONG, X.; JIANG, G.; WANG, X.; LI, X. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. **Journal of Petroleum Science and Engineering** v. 66 p. 42–46, 2009.

BASS, C.; LAPPIN-SCOTT, H. The Bad Guys and the good guys in petroleum microbiology. **Oilfield Review** v. 9, p. 17–25, 1997.

BENKA-COKER, M.O.; METSEAGHARUN, W.; EKUNDAYO, J.A. Abundance of sulphate-reducing bacteria in Niger Delta Oilfield waters. **Bioresource Technology** v. 54 p. 151–154, 1995.

BERNARDEZ L.A.; ANDRADE LIMA L.R.P.; RAMOS C.L.S.; ALMEIDA P.F. A kinetic analysis of microbial sulfate reduction in an upflow packed-bed anaerobic bioreactor. **Journal of the International Mine Water Association (IMWA)** 2012.

BERNARDEZ L.A.; ANDRADE LIMA L.R.P.; ALMEIDA P.F. The hydrodynamics of an upflow packed-bed bioreactor at low Reynolds number. **Brazil Journal of Petroleum and Gas** v. 2 p. 114–121, 2008.

BASKARAN V.; NEMATI M. Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir. **Biochemical Engineering Journal** v. 31 p. 148–159, 2006.

CHEN C.I.; MUELLER R.F.; GRIEBE T. Kinetic analysis of microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in an upflow porous media biofilm reactor. **Biotechnology and Bioengineering** v. 43 p. 267–274, 1994.

CHOU H.; HUANG J.; CHEN W.; REIKO O. Competitive reaction kinetics of sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic filters. **Bioresource Technology** v. 99 p. 8061–8067, 2008.

COLLERAN E.; FINNEGAN S.; LENS P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 67 p. 29 - 46, 1995.

CORD-RUWISCH R.; KLEINITZ W.; WIDDEL F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology** v. 39, p. 97-106, 1987.

CORD-RUWISH, R. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiology Methods** 4:33–36 1985

Desulfotomaculum acetoxidans 5575, DSM 771. Image credit: Dr. Manfred Rohde at Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig. Disponível em <<http://genome.jgi-psf.org/desa7/desa7.home.html>>. Acesso em: 19 de abril de 2012.

Desulfovibrio desulfuricans G20. Image Courtesy of the Lawrence Berkeley National Laboratory. Disponível em <<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Desulfovibrio>>. Acesso em: 19 de abril de 2012.

DONLAN R.M.; COSTERTON W.J. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v 15, p.167–193, 2002.

ELLIOTT P.; RAGUSA S.; CATCHESIDE D. Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. **Water Research** v. 32 p. 3724–3730, 1998.

FOGLER H.S., **Elementos de Engenharia das reações Químicas**. 3^a Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1999.

GHIGLIAZZA R.; LODI A.; ROVATTI M. Kinetic and process considerations on biological reduction of soluble and scarcely soluble sulfates.. **Resources Conservation & Recycling** v. 29 p. 181–194, 2000.

HOEK J.; CANFIELD D.; REYSENBACH A.; IVERSEN L. Bioreactor for growth of sulphate-reducing bacteria: online estimation of specific growth a biomass for the deep-sea hydrothermal bent thermophile *Thermodesulfatator indicus*. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 470–578, 2006.

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

HUPERT C.; NEMATI M.; JENNEMAN G.; VOORDOUW G. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Environmental Biotechnology** V. 68 p. 272–282, 2005.

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

KALYUZHNYI S.; FEDOROVICH V.V. Mathematical modeling of competition between sulphate-reduction and methanogenesis in anaerobic reactors. **Bioresource Technology** v. 65 p. 227–242, 1998.

KHELIFI E.; BOUALLAGUI H.; FARDEAU M.; TOUHAMI Y.; GODON J.; CAYOL J.; OLLIVIER B.; HAMDY M. Fermentative and sulphate-reducing bacteria associated with treatment of an industrial dye effluent in an up-flow anaerobic fixed bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal** v. 45 p. 136–144, 2009.

KJELLERUP B.V.; VEEH R.H.; SUMITHRARATNE P.; THOMSEN T.R.; BUCKINGHAM-MEYER K.; FROLUND B.; STURMAN P. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced water biofil system using molecular techniques. **Journal Industrial Microbiology** v. 32 p. 163–170, 2005.

KNOBEL, A.N.; LEWIS, A.E. A mathematical model of a high sulphate wastewater anaerobic treatment system. **Water Research** v. 36 p. 257–265, 2002.

KOLMERT, A.; JOHNSON, D. B.; Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulfate-reducing bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 76 p. 836–843, 2001.

LENZ, P.; MASSONE, A.; ROZZI, A.; VERSTRAETE, W. Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors. **Water Research** v.3 p.857–870,1995.

LENZ, P.; VALLERO, M.; ESPOSITO, G.; ZANDVOORT, M. Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** v. 1 p. 311–325, 2002.

LYBERATOS, G.; SKIADAS, L.V. Modelling of anaerobic digestion – A review. **Global Nest: The International Journal**. 2 p. 63–76, 1999.

MARCHAL, R.; CHAUSSEPIED, B.; WARZYWODA, M. Effect of ferrous availability on growth of a corroding sulfate-reducing bacterium. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 47 p. 125–131, 2001.

MOOSA, S.; HARRISON, S.T.L. Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage. **Hydrometallurgy** v. 83 p. 214–222, 2006.

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

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** v. 57 p. 2773–2780, 2002.

MOOSA, S.; NEMATI, M.; HARRISON, S.T.L. Kinetic studies on anaerobic reduction of sulfate. **Process Metallurgy** v. 9 p. 697–706, 1999.

NEMATI, M.; JENNEMAN, G.E.; VOORDOUW, G. Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. **Biotechnology and Bioengineering** v. 74 p. 424–434, 2001.

NEVATALO, L.M.; MAKINEM, A. E.; HAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. Biological hydrogen sulfide production in an ethanol-lactate fed fluidized-bed bioreactor. **Bioresource Technology** V. 101, p. 276 – 284, 2010.

OKABE, S.; NIELSEN, P.H.; JONES, W.L.; CHARACKLIS, W.G. Sulfate product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. **Water Research** v. 29 p. 571–578, 1995.

OKABE, S.; NIELSEN, P.H.; CHARACKLIS, W.G. Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. **Biotechnology and Bioengineering** v. 40 p. 725–734, 1992.

OYEKOLA, O.O.; HARRISON, S.T.L.; VAN HILLE, R.P. Effect of culture conditions on the competitive interaction between lactate oxidizers and fermenters in biological sulfate reduction system. **Bioresource Technology** v. 104 p. 616–621, 2012.

OYEKOLA, O.O.; VAN HILLE, R.P.; HARRISON, S.T.L. Kinetic analysis of biological sulphate reduction using lactate as carbon source and electron donor: effect of sulphate concentration. **Chemical Engineering Science** v. 65 p. 4771–4781, 2010.

OYEKOLA, O.O.; VAN HILLE, R.P.; HARRISON, S.T.L. Study of anaerobic metabolism under biosulfidogenic conditions. **Water Research** v. 43 p. 3345 - 3354, 2009.

PATIDAR, S.K.; TARE, V.; Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1215–1222, 2005.

POSTGATE, J.R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2^a edição Cambridge University Press, New York, 1979.

POSTGATE, J. R. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 29, N° 4, 1965.

REIS, M.A.; ALMEIDA, J.S., LEMOS, P.C.; CARRONDO, M.J.; Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. **Journal of biochemical and microbiological technology and engineering**, Vol. 40, p. 593-600, 1992.

RODNEY, M.; DONLAN, J.; WILLIAM, C. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167–193, 2002.

SHENG, X.; TING, Y.; PEHKONEN,, S.O. The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. **Corrosion Science** v. 49, p. 2159–2176, 2007.

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

ZHANG, L.; SCHRYVER, P.; GUSSEME, B.; MUYNCK, W.; BOOM, N.; VERSTRAETE, W. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: A review. **Water Research** v. 42, p. 1–12, 2008.

ZHAO, Y.; REN, R.; WANG, A. contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. **Chemosphere** v. 72, p. 233–242, 2008.