

# **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS SULFETOGENICOS NO SOLO DO IFBAIANO CAMPUS CATU: DIAGNÓSTICO PRELIMINAR**

**Alexandra Souza de CARVALHO (1); Victória Maria de Almeida Santos CEDRAZ (2);  
Weldon Fernandes dos SANTOS (3)**

- (1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBaiano, Rua Barão de Camaçari, Catu-Bahia,  
e-mail: alexandrasc@eafcatu.gov.br
- (2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBaiano, Rua Barão de Camaçari, Catu-Bahia,  
e-mail: vick.cedraz@gmail.com
- (3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBaiano, Rua Barão de Camaçari, Catu-Bahia,  
e-mail: weldon\_gts15@hotmail.com

## **1 RESUMO**

A produção de gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) por bactérias redutoras de sulfato (BRS) é um problema mundial da indústria de petróleo e gás natural e as regiões circunvizinhas, gerando impactos ao meio ambiente. Os problemas de corrosão industrial estão associados à produção de sulfeto de hidrogênio (biossulfetogênese), além disso, o aumento do teor de enxofre no petróleo bruto e gás é importante. O presente trabalho tem como objetivo a detecção e caracterização preliminar de microrganismos sulfetogênicos, bem como a determinação da concentração de sulfeto presente no solo do Instituto Federal Baiano da cidade de Catu, interior da Bahia, por ser uma região circunvizinha da Indústria de Petróleo. Os microrganismos sulfetogênicos foram cultivados em meios de cultura específicos e posteriormente serão isolados os gêneros anaeróbios mais comuns através das técnicas microbiológicas usuais. A população microbiana total foi determinada através da técnica do número mais provável (NMP). Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) foi detectado nas diversas amostras de solo através do método do azul de metileno. As concentrações encontradas variaram de 10 a 100 ppm. Concentrações abaixo de 10 ppm foram encontradas na região anaeróbia de uma coluna de Winogradsky. A coluna serviu para os testes estáticos e preliminares.

Palavras-chave: biossulfetogênese, BRS, petróleo

## **2 INTRODUÇÃO**

### **2.1 BIOSSULFETOGENESE**

#### **2.1.1 Bactérias redutoras de sulfato**

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), descobertas por Beijerinck (1895) e que vêm sendo estudadas exaustivamente ao longo deste século, são microrganismos que realizam a redução desassimilatória de sulfato. Esse processo difere da redução assimilatória que é realizada por todas as plantas, fungos e a maioria das bactérias, onde os íons sulfato são reduzidos a sulfeto e este é incorporado às várias moléculas orgânicas

como aminoácidos e coenzimas. Na redução desassimilatória, o íon sulfato atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica, da mesma forma como atua o oxigênio na respiração convencional. Uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos microrganismos, porém, a maior parte é excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) livre. Algumas linhagens de bactérias redutoras de sulfato podem apresentar crescimento fermentativo na ausência de íons sulfato, analogamente ao crescimento fermentativo das leveduras na ausência de oxigênio. No entanto, nenhuma das linhagens até hoje estudadas se mostrou capaz de crescer utilizando o oxigênio como aceptor final de elétrons, e este, por sua vez desempenha sempre o papel de inibidor de crescimento. Desta forma essas bactérias são consideradas anaeróbias estritas (ALMEIDA, P.F., 2006). O grupo das bactérias redutoras de sulfato compreende 09 gêneros segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, que a não ser pela capacidade de reduzir os íons sulfato, são biologicamente distintos. Os 02 gêneros há mais tempo conhecidos são *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* e nestes foram distribuídas as espécies inicialmente isoladas. O gênero *Desulfovibrio* foi o mais estudado, e compreende nove espécies sendo *Desulfovibrio desulfuricans* o membro típico deste grupo (VOORDOUW, G., 2003). Ao longo dos anos, novos gêneros foram identificados, como por exemplo, *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus*, etc. Estas bactérias, em sua maioria gram-negativas, apresentam-se geralmente na forma de vibrios de 0,5 -1,0 mm, podendo também ocorrer na forma sigmóide; não esporulam e são móveis por meio de flagelo monotríquico. São mesofílicas com temperatura ótima de crescimento na faixa de 34 a 37°C, com tolerância máxima de 42 a 45°C, existindo também linhagens termofílicas com crescimento ótimo na faixa de 50 a 70°C. Normalmente utiliza-se como temperatura de incubação 30°C. A faixa de pH mais comumente empregada para crescimento é de 7,2 a 7,6. O crescimento das bactérias redutoras de sulfato mesofílicas é normalmente lento, a 30° C, levando de alguns dias até semanas de acordo com a espécie. Já no caso das bactérias redutoras de sulfato termofílicas o crescimento é mais acelerado levando em torno de 12 a 18 horas, a 55°C. Uma das razões do crescimento lento é que o  $\text{H}_2\text{S}$ , produto do metabolismo destas bactérias, reduz a taxa de crescimento e pode, quando em altas concentrações, levá-la a zero. Este fenômeno é devido à toxicidade intrínseca do  $\text{H}_2\text{S}$  aos organismos vivos. Sabendo-se que o crescimento dessas bactérias no cultivo em regime de batelada é frequentemente não exponencial, raramente referencia-se na literatura seu tempo de duplicação. No entanto, é possível generalizar, de forma qualitativa, que microrganismos produtores de acetato, como é o caso da maioria das espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*, parecem ser capazes de apresentar tempos de duplicação, a 30° C, em torno de 3 a 6 horas ou até menos. Já microrganismos consumidores de acetato, como as espécies de *Desulfobacter*, crescem mais lentamente, com tempos de duplicação em torno de 20 horas. Devido às incertezas introduzidas pela dependência do crescimento das bactérias redutoras de sulfato com o potencial de oxirredução, o pH e a composição do meio, além dos problemas causados pela acumulação dos íons sulfeto, o crescimento destas bactérias em regime contínuo tem sido preferido. A gama de substratos utilizados pelas bactérias redutoras de sulfato como fonte de energia para crescimento engloba lactato, citrato, formiato, piruvato, colina e certos alcoóis primários como metanol, etanol, propanol e butanol, e como aceptor final de elétrons o íon sulfato que pode ser substituído por tiosulfato, tetrationato, sulfito ou metabissulfito (ALMEIDA, P.F., 2006). Em adição aos substratos orgânicos, hidrogênio gasoso pode atuar como doador na cadeia de transporte de elétrons realizada por *Desulfovibrio*. Conforme foi verificado no mecanismo de reação do seu metabolismo, uma molécula de ATP é gerada ao nível do catabolismo do substrato orgânico e uma molécula de ATP é consumida na redução do íon sulfato. Desta forma se somente essas reações ocorressem a nível celular, os microrganismos não poderiam apresentar crescimento. No entanto, o que se observa é o crescimento dos microrganismos e a cadeia respiratória é o sistema alternativo de fosforilação mais provável para a geração de ATP. A maneira com que as bactérias redutoras de sulfato reduzem o íon sulfato a sulfeto e a natureza das enzimas envolvidas vêm despertando o interesse dos cientistas há anos. Os íons sulfato presentes no exterior da célula bacteriana ao entrarem reagem com ATP para formar Adenosinafosfossulfato (APS) mais pirofosfato (PP), reação esta que se processa preferencialmente para a direita quando o pirofosfato é removido como fosfato inorgânico (P). APS é então reduzida a sulfito ( $\text{SO}_3^{=}$ ) e AMP. O sulfito é convertido até metabissulfito ( $\text{S}_2\text{O}_5^{=}$ ) que é, então, reduzido a tritionato ( $\text{S}_3\text{O}_6^{=}$ ), passando por alguns intermediários ainda não completamente definidos, sendo o  $\text{S}_2\text{O}_4^{=}$  um dos mais prováveis. Parte do tritionato formado é convertido a tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{=}$ ) e parte usada para regenerar sulfito. O tiosulfato é então reduzido a sulfeto ( $\text{S}^{=}$ ) e outra parte é convertida a mais sulfito (CARNEIRA, 2003). O metabolismo oxidativo das bactérias redutoras de sulfato é conduzido em ambientes cujo potencial de oxirredução se encontre na faixa de -150 a -200 mV, uma vez que esses microrganismos não necessitam possuir co-fatores da cadeia de transporte de elétrons cujas formas estáveis só são encontradas em valores de potencial redox positivos. Sendo assim um dos pré-requisitos para o cultivo e

crescimento de bactérias redutoras de sulfato é que o potencial de oxirredução do ambiente esteja estabelecido inicialmente em torno de -100mV. Isto significa dizer que a simples exclusão do ar do sistema não é suficiente para garantir o crescimento. Verificou-se que um meio contendo lactato e sulfato, após ebulição, apresentou um Eh de aproximadamente +200mV, e quando da adição de quantidade suficiente de sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) para produzir no sistema uma concentração de 5mM, este valor foi reduzido para aproximadamente -220mV. É necessário então, em algumas situações, que seja adicionado um agente redutor, como o  $\text{Na}_2\text{S}$ , até que o crescimento vigoroso da cultura seja estabelecido e assim as próprias bactérias gerem  $\text{H}_2\text{S}$  suficiente para manter o potencial de oxirredução baixo (VOORDOUW, G., 2003).

Como acontece com quase todos os microrganismos, a concentração mínima das substâncias bactericidas e bacteriostáticas vai depender da natureza do meio onde a substância é adicionada e também do tamanho da cultura presente. As bactérias do gênero *Desulfotomaculum* são normalmente mais sensíveis aos inibidores. O gênero *Dessulfovibrio* apresenta extraordinária resistência aos inibidores convencionais como, por exemplo, fenóis, sais quaternários, corantes, antibióticos e metais. A ineficácia dos metais como inibidores de crescimento é em grande parte consequência da precipitação desses como sulfetos insolúveis. Na ausência de íons sulfeto esses metais são realmente bastante tóxicos aos microrganismos. O ar é o mais barato e o mais eficiente inibidor de crescimento das bactérias redutoras de sulfato. Estas bactérias, quando em contato com o oxigênio não serão mortas, porém permanecerão em fase lag até que se restabeleçam as condições de anaerobiose do sistema. As bactérias redutoras de sulfato são encontradas nos ambientes os mais diversos como solos, águas marinhas, poços artesianos, áreas geotérmicas, depósitos sulfurosos, esgoto, rumina de boi, vísceras de insetos, etc. Por tolerarem temperaturas na faixa de -5 a 75° C e valores de pH variando entre 5 a 9,5, esses microrganismos apresentam considerável adaptação às mais variadas condições ambientais. A única exceção é feita ao mais comum dos ambientes, o aeróbio. A necessidade de um baixo potencial de oxirredução restringe sua atividade a ambientes redutores como já citado. No entanto esses microrganismos podem sobreviver a longas exposições ao oxigênio, retomando sua atividade quando o ambiente redutor é restabelecido.

### 2.1.2 Fontes Antropogênicas

As principais atividades humanas emissoras de sulfeto de hidrogênio e de outros gases reduzidos de enxofre são: a exploração de gás natural e petróleo, o refino de petróleo, a queima de carvão, a produção de celulose e indústrias variadas. Apesar da dificuldade existente para quantificar as taxas de emissão de sulfeto de hidrogênio pelas diferentes atividades antropogênicas existentes, algumas estimativas podem ser deduzidas pela quantidade de enxofre liberado nesses processos. A queima do carvão gera quantidades apreciáveis de gases de enxofre, devido à existência do enxofre em sua composição que é um constituinte não-desejável, encontrando-se presente em quantidades que variam desde traços até maiores que 10% (em peso). O enxofre encontra-se presente no carvão na forma de sulfatos ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ) e enxofre orgânico (Mercaptana ou Tiol,  $\text{RSH}$ ; sulfeto ou tiol-eter  $\text{RSR}$ ; dissulfeto,  $\text{RSSR}$ ) e sistemas aromáticos que contém o anel do Tiofeno). O enxofre orgânico ocorre quimicamente ligado à parte orgânica da estrutura do carvão, cujas concentrações variam de 0,3 a 2,4% (em peso), constituindo cerca de 20 a 85% da quantidade total de enxofre presente no carvão. Sempre que o enxofre ou certos compostos de enxofre entrar em contato com materiais orgânicos a altas temperaturas há possibilidade de ser produzido o sulfeto de hidrogênio. Nas indústrias, o sulfeto de hidrogênio é normalmente um produto indesejável, embora seja um reagente importante ou intermediário em alguns processos. A exploração do petróleo propicia a emissão de sulfeto de hidrogênio para a atmosfera também como resultado de decomposição anterior pela ação de bactérias no subsolo oriundas de condições redutoras. Compostos reduzidos de enxofre (sulfeto de carbonila –  $\text{COS}$ , dissulfeto de carbono –  $\text{CS}_2$ , sulfeto de dimetila-  $\text{DMS}$ , dissulfeto de dimetila-  $\text{DMSD}$ , etc), são emitidos para atmosfera devido as fontes naturais, biogeoquímicas e fontes antropogênicas (CARVALHO, A.S., 2007).

### 2.1.3 Exposição Ambiental e Efeitos sobre a Saúde Humana

A exposição do homem ao  $\text{H}_2\text{S}$  pode decorrer por exposição profissional ou ambiental ou, até mesmo, natural. O grau de incômodo e de intoxicação depende dos níveis de exposição. Em áreas urbanas, as concentrações de  $\text{H}_2\text{S}$  encontram-se, geralmente, abaixo de 0,0015  $\text{mg}/\text{m}^3$  (1ppb), embora picos de concentração em torno de 0,20  $\text{mg}/\text{m}^3$  (0,13 ppm) tenham sido encontrados perto de fábricas de celulose e de papel. O valor limite de percepção do odor desagradável causado pelo  $\text{H}_2\text{S}$  é considerado pela OMS – Organização Mundial de Saúde como sendo na faixa de 0,0008 a 0,2  $\text{mg}/\text{m}^3$  (0,5 – 130 ppb). No entanto, em

tal faixa de valores, nenhum efeito biologicamente significativo no homem ou em animais foi observado. Irritação nos olhos pode ocorrer depois de várias horas de exposição ao sulfeto de hidrogênio a concentração de 16-32 mg/m<sup>3</sup> (10,5-21ppm). Quando inalado, o sulfeto de hidrogênio exerce uma ação irritante no trato respiratório, onde os maiores prejuízos são notados nas estruturas mais profundas (alvéolos pulmonares) (CARVALHO, A.S., 2007).

#### **2.1.4 Importância Industrial da Biosulfetogênese**

Os problemas de corrosão industrial estão associados à produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), ao entupimento das tubulações na formação do petróleo e a segurança ambiental. Além disso, o aumento do teor de enxofre no petróleo bruto e gás é importante. Estimou-se que cerca de 20% a 50% dos problemas que ocorrem nas companhias petrolíferas são devidas a corrosão por microrganismos (ALMEIDA, P.F., 2006). Muitas vezes, as perdas financeiras devido à manutenção de um equipamento deteriorado por biocorrosão são combinadas com as resultantes de biofouling. Sulfeto provoca corrosão de material de ferro e aço inoxidável em tanques, tubulações, e na produção do óleo. A formação de H<sub>2</sub>S por acidificação também causa toxicidade e a deterioração do gás e petróleo, diminuindo assim o valor desses produtos. Nos reservatórios de petróleo, a redução na permeabilidade pode ser induzida pelo crescimento de bactérias em rochas porosas (entupimento), levando à ineficiência da recuperação secundária de petróleo.

#### **2.1.5 Coluna de Winogradsky**

A coluna de Winogradsky é um sistema que permite demonstrar, de uma maneira simples, a enorme diversidade metabólica dos organismos procarióticos. A forma como os microrganismos ocupam zonas altamente específicas de acordo com a sua tolerância ao meio envolvente (microambiente) e às fontes de energia e carbono disponíveis, é bem patente nesse sistema. A coluna de Winogradsky ilustra, igualmente o papel dos microrganismos no estabelecimento dos ciclos dos elementos minerais como, por exemplo no ciclo do enxofre, essenciais à manutenção da vida na Terra. Este dispositivo, criado em 1880 pelo microbiologista russo *Sergei* Winogradsky para estudar microrganismos do solo é utilizado, tradicionalmente para isolar microrganismos anaeróbios (bactérias fototróficas verdes e púrpura e outros microrganismos anaeróbios). Uma das maneiras de desenvolver um sistema destes, consiste em colocar num recipiente transparente (coluna) uma determinada quantidade de lama recolhida no fundo de um lago ou rio, suplementada com celulose (e.g. folha de jornal), com uma fonte de sulfato e uma substância para tamponar o meio, i.e., para manter o pH aproximadamente constante. Em seguida, essa mistura é coberta com água do lago ou rio. Se esse recipiente for colocado num local onde apanhe bastante luz solar, ao fim de algumas semanas desenvolver-se-á ao longo da coluna, de uma forma estratificada, uma comunidade de microrganismos de acordo com as condições ambientais que naquela se estabeleceram. A coluna de Winogradsky ilustra, igualmente o papel dos microrganismos no estabelecimento dos ciclos dos elementos minerais como, por exemplo no ciclo do enxofre, essenciais à manutenção da vida na Terra. (GAMAZO, C., 2005)

O presente trabalho teve como objetivo a detecção e caracterização preliminar de microrganismos sulfetogênicos, bem como a determinação da concentração de sulfeto presente no solo do Instituto Federal Baiano da cidade de Catu, interior da Bahia, por ser uma região circunvizinha da Indústria de Petróleo.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Coleta das amostras**

Inicialmente foram coletadas amostras de sedimentos e água de um Lago do Campus Catu (07 coletas foram realizadas), as amostras foram armazenadas sob refrigeração à 4°C.

#### **3.2 Cultivo dos microrganismos**

Foram preparados meios de cultura específicos para o cultivo de microrganismos sulfetogênicos contendo em sua composição os nutrientes mínimos necessários para o crescimento microbiano (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fonte de enxofre, sais fosfatos e carbonatos e agentes redutores). Após o preparo,

autoclavou-se a 121°C durante 15 minutos. Pesou-se 1 g do solo para 10 mL de meio de cultura. As amostras foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C por 24h.

### 3.3 Caracterização dos microrganismos

Para identificarmos a morfologia da microbiota presente, colorações (Gram, Loeffler) foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico existente no Laboratório de Biologia do IF CATU. Para a identificação das espécies microbianas presentes, alguns testes bioquímicos foram realizados (motilidade, redução de nitratos e sulfatos, catalase e oxidase, utilização da uréia, pH, etc). O método convencional de cultivo através da técnica do número mais provável (NMP) foi utilizado para encontrar a população total de microrganismos sulfetogênicos originalmente presentes.

### 3.4 Determinação de sulfeto de hidrogênio

Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) produzido pelos microrganismos sulfetogênicos foi detectado utilizando-se o método do azul de metileno, este método baseia-se na reação entre sulfeto de hidrogênio e N,N'-dimetil-parafenilenodiamina-hidroclorídrico na presença de cloreto de ferro com formação de azul de metileno. A intensidade da cor do complexo é proporcional a concentração de sulfeto na amostra, esta é determinada pela medida da absorvância em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 650-660 nm. Retirou-se 3 mL da amostra de água. Adicionou-se 1,0 mL de acetato de zinco 1% para precipitação do sulfeto como sulfeto de zinco (ZnS), 0,3 mL NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> para precipitar o ZnS como hidróxido, 0,5 mL de solução de N,N'-dimetil-parafenilenodiamina e 0,3 mL cloreto férrico 2% em HCl 1:20, logo após aqueceu-se a mistura em banho-maria a 30 °C por 30 segundos e resfriou-se.

### 3.5 Construção da coluna de Winogradsky

Uma coluna de Winogradsky foi construída para simulação da microbiota presente no solo do IFBAIANO Catu. A coluna foi confeccionada com material de vidro com dimensões de 20x10x10 cm. A coluna foi preenchida com sedimento de um Lago do IFBAIANO-Catu, adicionou-se papel como fonte de celulose, tiosulfato de sódio como fonte de enxofre e sais de fosfato e carbonato. Ajustou-se o pH do meio para 6,8. A coluna foi completada com água do mesmo Lago. Deixou-se sob a presença de luz durante quatro semanas. Após este período, as amostras foram coletadas utilizando-se uma seringa descartável estéril.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A população microbiana total determinada pela técnica do NMP foi de aproximadamente 1x 10<sup>5</sup> NMP/mL. Este valor está de acordo com a população encontrada em campos de petróleo (CARVALHO, A.S., 2007).

O ambiente do Lago é um reservatório natural de substratos para o crescimento destes microrganismos.

Foram utilizados dez cultivos para os testes bioquímicos, sendo que a maioria foi positiva para a redução de sulfato principalmente, confirmando a presença de microrganismos sulfetogênicos.

Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) foi detectado em algumas amostras de solo e culturas através do método de azul de metileno. As concentrações encontradas variaram de 10 a 100 ppm. Concentrações abaixo de 10 ppm foram encontradas na região anaeróbia da coluna de Winogradsky. A coluna serviu para os testes estáticos. Estes valores estão de acordo com a literatura que prevê em áreas circunvizinhas à Indústria de Petróleo até 600 ppm de sulfeto.

Análises cromatográficas serão realizadas posteriormente, para serem avaliados os subprodutos orgânicos produzidos pelos microrganismos sulfetogênicos durante o seu metabolismo.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho desenvolvido teve como proposta avaliar através de um diagnóstico preliminar a microbiota sulfetogênica presente no solo do IFBAIANO-Catu. O estudo inicial indicou a presença desses microrganismos através da detecção de H<sub>2</sub>S produzido, portanto, a presença de sulfeto de hidrogênio servirá para o biomonitoramento ambiental da região. A construção da coluna

de Winogradsky é uma alternativa para simulação do ambiente encontrado no solo, além de ser de fácil execução. A Região de Catu encontra-se dentro da esfera de exploração terrestre da Petrobras, por isso, o estudo de microrganismos sulfetogênicos presentes no ambiente é de suma importância.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; CARVALHO, E.B.; SOUZA, E.R.; CARVALHO, A.S.; SILVA, C.H.T.P.; CARLTON, A. T. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. *Research Signpost*, Fort P.O., Trivandrum-695 023, 37, 2, 661, Kerala, 2005.

CARNEIRA, C.; MOURA, J.G.M. **Biogeociclos: uma visão molecular das enzimas e dos mecanismos envolvidos nos ciclos dos elementos**. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, Part II, p.47-55, 2003.

CARVALHO, A.S. **Otimização e Validação de Método Analítico para Determinação de Sulfeto em Matrizes Aquosas da Indústria do Petróleo**. 2007. 65p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GAMAZO, C., LÓPEZ-GOÑI, I. & DÍAZ, R. *Manual Práctico de Microbiología*. 3ª edição, Masson, Barcelona, 2005.

MARIANO, J. B. *Impactos Ambientais do Refino do Petróleo*. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2001.

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