

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós Graduação em Microbiologia

**APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO CICLO DO
ENXOFRE NO TRATAMENTO DE EFLUENTES E
RECUPERAÇÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR**

Cíntia Dutra Leal

Belo Horizonte

2012

Cíntia Dutra Leal

**APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO CICLO DO
ENXOFRE NO TRATAMENTO DE EFLUENTES E
RECUPERAÇÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial.

Orientadora: Prof^a Juliana Calábria Araújo

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2012

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer sempre presente em minha vida, dando-me força, calma, paciência e sabedoria para seguir em direção a mais esta conquista.

Aos meus amados pais e familiares, que sempre me apoiaram para a continuidade de meus estudos desde o meu ingresso na graduação.

Ao meu querido Marcos, pelo carinho e paciência.

À Professora Dra. Juliana Calábria Araújo, pela orientação, sugestões e contribuições para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Vera Lúcia dos Santos e à Dra. Valéria Martins Godinho, pela atenção e disponibilidade em participarem da banca examinadora.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, por todos os ensinamentos passados.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, pela atenção.

Aos colegas do Curso de Especialização, por tornarem inesquecível e agradável essa jornada de aprendizado.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, pelo apoio, amizade e carinho, em especial aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Água e Esgoto.

RESUMO

O rápido crescimento urbano aliado a expansão de diferentes setores industriais, agricultura e mineração levam a inúmeros casos de poluição e degradação do meio ambiente. Pesquisas vem sendo realizadas na busca de soluções mais econômicas e ecologicamente corretas para a descontaminação das águas residuárias industriais e domésticas. O ciclo biológico do enxofre vem despertando grande interesse da comunidade científica, especialmente por causa da descoberta de muitos microrganismos capazes de reduzir a poluição causada pelo enxofre e promover a recuperação do enxofre elementar. Esses organismos são encontrados no fundo do mar, em colunas d'água de lagos e rios, bem como nos sedimentos e em outros ambientes caracterizados por condições extremas de salinidade, pH e temperatura. As bactérias desempenham importantes papéis nas reações oxidativas como nas redutivas do ciclo do enxofre. O ciclo bioquímico do enxofre inclui diversos processos essenciais, as reações que ocorrem nesse ciclo incluem a oxidação de sulfeto (H_2S) e enxofre elementar (S) à sulfato (SO_4^{-2}), a redução de sulfato (SO_4^{-2}) e enxofre elementar, desproporcionamento de enxofre à H_2S , oxidação ou redução de compostos orgânicos sulfurados e dessulfurilação. O tratamento de águas residuárias contendo compostos sulfurosos é, particularmente, difícil de ser realizado. Diversas pesquisas vem sendo realizadas sobre as propriedades metabólicas, filogenia e comportamento ecológico das bactérias envolvidas no ciclo biológico do enxofre. Este trabalho destaca o ciclo biológico do enxofre, bem como algumas aplicações dessas bactérias no tratamento de efluentes industriais e domésticos para remoção de sulfato e H_2S e recuperação do enxofre elementar.

ABSTRACT

Rapid urban growth combined with expansion of different industrial sectors, agriculture and mining lead to numerous cases of pollution and environmental degradation. Research is being conducted to find solutions more economical and ecologically correct for the decontamination of industrial and domestic wastewater. The biological cycle of sulfur is attracting great interest from the scientific community, especially because of the discovery of many micro-organisms capable of reducing pollution caused by sulfur and promote the elemental sulfur recovery. These organisms are found in the seabed in water column of lakes and rivers, in sediments and other environments characterized by extreme conditions of salinity, pH and temperature. Bacteria could play an instrumental role in the oxidative reactions such as reductive in the sulfur cycle. The biogeochemical sulfur cycle include numerous essential processes, the reactions that occur in this cycle include the sulfide (H_2S) and elemental sulfur (S) oxidation to sulfate (SO_4^{-2}), sulfate and elemental sulfur reduction, sulfur disproportionation to H_2S , organic sulfur compounds oxidation and reduction, and desulfurylation. The treatment of wastewater containing sulfur compounds is particularly difficult to perform. Several studies have been conducted on the metabolic properties, phylogeny and ecological behavior of bacteria involved in the biological sulfur cycle. This work highlights the biological sulfur cycle and some applications of these bacteria in the treatment of industrial and domestic effluents for sulfur and H_2S removal and elemental sulfur recovery.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VII
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO ENXOFRE.....	14
3.1.1 <i>Redução de sulfato e enxofre elementar a sulfeto</i>	17
3.1.1.1 Redução assimilativa e dissimilativa do sulfato	18
3.1.1.2 Redução do enxofre elementar	20
3.1.2 <i>Oxidação de sulfeto e enxofre</i>	20
3.1.2.1 Oxidação quimioautotrófica	21
3.1.2.2 Oxidação fotoautotrófica	22
3.1.3 <i>Desproporcionamento do enxofre</i>	23
3.1.4 <i>Oxidação e redução de compostos orgânicos sulfurados</i>	23
3.2 MICROBIOLOGIA	24
3.2.1 <i>Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e enxofre</i>	25
3.2.2 <i>Bactérias oxidadoras de sulfeto</i>	28
3.3 O ÍON SO_4^{2-} EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	32
3.3.1 <i>Sulfato em esgoto doméstico</i>	34
3.3.2 <i>Sulfato em efluentes industriais</i>	35
3.4 APLICAÇÃO DAS BRS PARA A REMOÇÃO DE SULFATO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS	36
3.5 OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DO SULFETO E RECUPERAÇÃO DE S	40
4 METODOLOGIA	44
5 CONCLUSÕES	45
6 PERSPECTIVAS.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ciclo resumido do Enxofre.....	9
Figura 3.1	Representação esquemática do ciclo redox do enxofre.....	15
Figura 3.2	Fotomicrografias de contraste de fase de bactérias redutoras de sulfato e enxofre. (a) <i>Desulfobacter postgatei</i> , (b) <i>Desulforomonas acetoxidans</i> e (c) <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	25
Figura 3.3	Bactérias púrpuras sulfurosas com grânulos de enxofre armazenados no interior das células. (a) Bactérias do gênero <i>Chromatium</i> e (b) <i>Thiospirillum jenense</i>	29
Figura 3.4	Micrografia de fase de células de <i>Ectothiorhodospira mobilis</i> com glóbulos de enxofre externos.....	29
Figura 3.5	Bactérias verdes sulfurosas. (a) <i>Chlorobium</i> sp. e (b) <i>Prosthecochloris aestuarii</i>	30
Figura 3.6	Bactérias sulfurosas incolores. (a) <i>Beggiatoa alba</i> . e (b) <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	31
Figura 3.7	Fotomicrografia de <i>Allochromatium vinosum</i> , cepa 21D, (a) livre de glóbulos de enxofre no início do experimento e (b) com glóbulos de enxofre.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Estados de Oxidação de importantes compostos sulfurados...	14
Tabela 3.2	Processos essenciais e procariotos no ciclo do enxofre.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ΔG^0	Varição da energia livre
AMP	Adenosina Monofosfato
APS	Adenosina 5`fosfosulfato
ASBBR	Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor)
ATP	Adenosina Trifosfato
AVT	Ácidos Voláteis Totais
BOE	Bactérias Oxidadoras de Enxofre
BOS	Bactérias Oxidadoras de Sulfeto
BPR	Barreiras permeáveis reativas
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DAM	Drenagem Ácida de Mina
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMS	Dimetilsulfeto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FISH	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (High Performance Liquid Chromatography)
mg.L⁻¹	Miligramas por Litro
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
nm	Nanometro
PAP	AMP-3-fosfato
PAPS	3`fosfoadenosina 5`fosfosulfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppi	Pirofosfato

RSH	Redução da Thioredoxina (Thioredoxin reduced)
RSSP	Oxidação da Thioredoxina (Thioredoxin oxidized)
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
STD	Sulfetos Totais Dissolvidos
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (Upflow Anaerobic Sludge Blanket)
UV	Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o meio ambiente tem sido constantemente afetado pela poluição urbana e industrial. O uso sustentável dos recursos naturais aliado ao desenvolvimento de tecnologias menos impactantes ao ambiente tem gerado uma série de discussões entre pesquisadores e a sociedade devido à dificuldade em se estabelecer um equilíbrio entre o desenvolvimento tecnológico e econômico sem prejudicar os ecossistemas.

O consumo de enxofre no país decorre, principalmente, de sua aplicação na agricultura na forma de fertilizantes (53%) e nas indústrias químicas (47%) para produção de ácido sulfúrico, sendo que 70% a 80% deste produto destinam-se à produção de fertilizantes. O enxofre é utilizado, ainda, em outros importantes setores industriais, tais como para a fabricação de pigmentos inorgânicos, papel celulose, borracha, bissulfeto de carbono, explosivos, açúcar e cosméticos. Portanto, grande parte do enxofre importado é lançada em nossos rios na forma de sulfato, contribuindo para a degradação dos cursos d'água brasileiros (SARTI, et al., 2008).

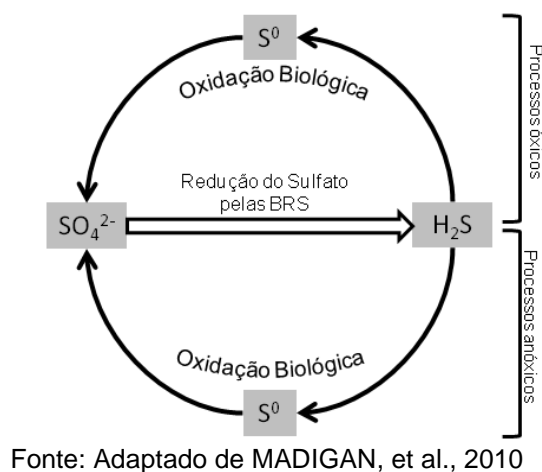
O ácido sulfúrico é utilizado em vários processos industriais, que resultam no aumento da concentração de sulfato em águas residuárias. A produção e descarga desse ânion são observadas em algumas indústrias como as de refino de petróleo, de produção de alimentos, no processamento de polpa de celulose e papel, em plantas de extração de carvão mineral e em jazidas de extração de minerais sulfetados. A utilização de tratamento químico em conjunto com tratamento biológico pode ser uma estratégia econômica e ambientalmente viável na remoção de poluentes em efluentes industriais (BARBOSA, 2009).

Os corpos hídricos são os que mais sofrem com os impactos provocados pela poluição, além do enxofre, as formas gasosas (ex. H_2S e compostos orgânicos sulfurosos voláteis, como as mercaptanas) também são prejudiciais, sendo tóxicas, corrosivas e apresentam forte odor. Assim, dentre os compostos presentes nas águas residuárias geradas em decorrência do crescimento econômico e populacional, compostos sulfurados tem tido uma atenção

especial dos pesquisadores quanto ao desenvolvimento, otimização de processos de remoção e recuperação do elemento enxofre a fim de diminuir o seu impacto sobre o meio ambiente.

O ciclo do enxofre é um processo natural, no qual várias espécies de microrganismos, por meio de reações de transformações sequenciais, convertem átomos de enxofre em uma variedade de estados de oxidação, o que colabora para este processo ser complexo. De um modo geral, as bactérias oxidadoras de enxofre (BOE) e sulfeto (BOS) produzem sulfato (SO_4^{2-}) e as bactérias redutoras de sulfato (BRS) usam o íon sulfato como acceptor de elétrons na respiração anaeróbia, produzindo sulfeto de hidrogênio (H_2S), conforme a Figura 1.1 (MOCKAITIS, 2008).

Figura 1.1: Ciclo resumido do Enxofre.



Fonte: Adaptado de MADIGAN, et al., 2010

As bactérias redutoras de sulfato formam um grupo grande e altamente diverso, sendo amplamente distribuídas na natureza. A utilização de BRS em processos biotecnológicos pode ser benéfica na remoção de sulfato, de metais e de matéria orgânica presentes em efluentes industriais. A remoção de metais pesados é uma das maiores vantagens dessa tecnologia. O H_2S , produto do metabolismo das BRS, pode reagir com os metais pesados presentes em efluentes ácidos, formando sulfetos metálicos insolúveis. A baixa solubilidade dos sulfetos metálicos formados permite a recuperação e reutilização desses metais de efluentes contaminados. Além da remoção de metais, o tratamento biológico de efluentes com BRS permite a redução dos valores de sulfato para

limites muito inferiores aos observados nos processos de tratamento químico (CORTÉS, 2005; BARBOSA, 2009).

A utilização de microrganismos para o tratamento de efluentes industriais com elevada concentração de sulfato tem sido aplicada em países como a Alemanha e Holanda (MORPER; FURST, 1991; SCHEEREN et al., 1992).

Dar e colaboradores (2005) estimaram que as bactérias redutoras de sulfato são responsáveis pela redução de 50% de compostos sulfurados presentes na matéria orgânica em sedimentos marinhos. Além disso, a presença desses microrganismos também tem sido demonstrada em outros ambientes, como sedimentos de lagos de água doce, em biofilmes anaeróbios e estações de tratamento de águas residuárias.

A digestão anaeróbia de resíduos poluentes vem sendo utilizada, com sucesso, para vários tipos de efluentes, tanto domésticos quanto industriais, em diversas partes do mundo. Os reatores são relativamente simples e utilizam pouco ou nenhum aditivo de alto conteúdo energético, podendo ser combinados com métodos de pós-tratamento do efluente para a recuperação de produtos úteis, como amônia, enxofre, ou algum outro, dependendo da natureza do efluente tratado (BERNI; BAJAY, 2003).

Borkenstein e Fischer (2006) em estudos biotecnológicos com as bactérias sulfurosas púrpuras em biorreatores para eliminar sulfeto de águas residuárias sintéticas e reciclar enxofre, conseguiram uma eficiência de 98,7% na remoção de sulfeto e 60,4% de recuperação de enxofre elementar.

Segundo Gadd (2004), um processo integrando às bactérias redutoras de sulfato como a biolixiviação por bactérias oxidantes de enxofre tem sido desenvolvido para a remoção de metais tóxicos contaminantes de solos. Nesse processo, as bactérias oxidantes de enxofre e ferro são empregadas para liberar metais dos solos pela quebra de minerais sulfetados e produção de ácido sulfúrico. Os metais são liberados na forma de uma solução ácida de

sulfato que permite tanto a remoção de uma grande proporção da acidez, quanto a dos metais, quase que plenamente, pela sulfatoredução bacteriana.

Neste trabalho, pretende-se revisar os processos bem como as bactérias envolvidas no ciclo do enxofre e discutir a utilização biotecnológica desses microrganismos no tratamento de águas residuárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral uma revisão bibliográfica atualizada sobre a microbiologia das bactérias envolvidas no ciclo do enxofre e suas aplicações no tratamento de efluentes, de forma a subsidiar o desenvolvimento de trabalhos experimentais futuros.

2.2 Objetivos específicos

Revisão de trabalhos científicos mostrando:

- As transformações do enxofre pelos microrganismos.
- As bactérias envolvidas nos processos essenciais do Ciclo do Enxofre.
- Aplicação de Bactérias Redutoras de Sulfato no tratamento de efluentes que contenham altas concentrações de SO_4^- .
- Aplicação do processo de oxidação biológica de H_2S para a recuperação do enxofre elementar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ciclo biogeoquímico do Enxofre

O enxofre é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre. Pode entrar no sistema solo-água-plantas por meio de intemperismo de rochas (sedimentares, ígneas ou metamórficas), por adições atmosféricas (associadas principalmente a regiões industrializadas ou grandes centros urbanos - SO_2 e H_2S), fertilizantes químicos (sulfato de amônio, sulfato duplo de potássio e magnésio), via corretivos (como o gesso), fosfato natural parcialmente acidulado e orgânicos ou dentre outras (BALIEIRO, et al., 2007). Os oceanos também são reservatórios significativos de enxofre da biosfera, na forma de sulfato (MADIGAN et al., 2010).

O enxofre apresenta um ciclo que passa entre o ar e os sedimentos, sendo que existe um grande depósito na crosta terrestre e um depósito menor na atmosfera. O enxofre pode ser adicionado também na ecosfera na forma reduzida (H_2S), como resultado da atividade vulcânica e do metabolismo microbiano.

Contudo, o aumento da atividade antrópica resultou em significativos desequilíbrios, mobilizando parte destes reservatórios, obtendo desta forma desagradáveis consequências como a chuva ácida, drenagem ácida de minas, odor incômodo, mortandade de peixes, corrosão e liberação de metais pesados (LENS; KUENEN, 2001).

O enxofre é um elemento essencial para os organismos vivos e compõe aproximadamente 1% do peso seco de uma célula bacteriana. Nas células, o enxofre é necessário para a síntese dos aminoácidos cisteína e metionina e também é componente de algumas vitaminas, hormônios e coenzimas. Esse elemento é muito importante em proteínas que possuem o aminoácido cisteína, pois é responsável pela formação das pontes dissulfeto entre polipeptídeos,

uma ligação de grande importância para a formação de estruturas espaciais (dobramentos) das proteínas (MAIER; PEPPER ; GERBA, 2000).

As transformações do enxofre na natureza são complexas, principalmente devido ao grande número de estados de oxidação que este elemento apresenta (Tabela 3.1). Ao todo, são nove estados de oxidação do enxofre na natureza, variando a valência deste composto de -2 até +6. Contudo, muitas destas espécies químicas apresentam-se na natureza em pequenas quantidades, já que algumas destas são intermediárias de reações bioquímicas, ou sua concentração está diretamente relacionada com as condições ambientais encontradas, como pH, potencial redox e temperatura (SANTANA, 2006).

Tabela 3.1: Estados de Oxidação de importantes compostos sulfurados

Composto	Estado de oxidação por átomo de S
S orgânico (R-SH)	-2
Sulfeto (H ₂ S)	-2
Enxofre elementar (S ⁰)	0
Tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)	+2 (média por S)
Dióxido de enxofre (SO ₂)	+4
Sulfito (SO ₃ ²⁻)	+4
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	+6

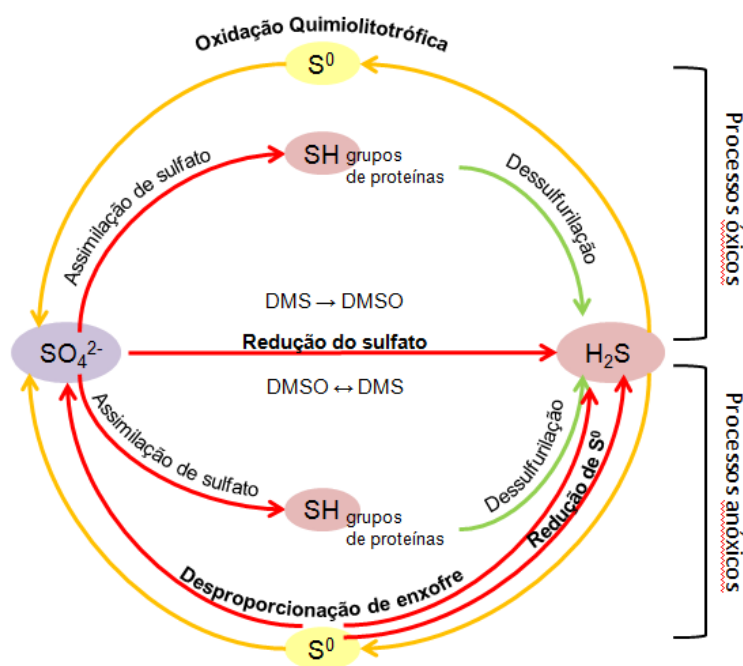
Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2010

Um composto cuja forma química é fortemente influenciada pelas condições ambientais é o sulfeto de hidrogênio (H₂S). Em sistemas aquáticos, a composição do sulfeto de hidrogênio é influenciada principalmente pelo pH, conforme as equações 3.1 e 3.2. Em sistemas com baixo valor do pH (< 3), a forma predominante é a forma não ionizada H₂S, enquanto que em valores superiores a 8, quase todo o sulfeto dissolvido esta presente na sua forma ionizada S⁻² (SANTANA, 2006).



Agentes biológicos e/ou químicos contribuem com a transformação do enxofre de um estágio para o outro. As bactérias desempenham importantes papéis tanto nas reações oxidativas como nas redutivas do ciclo do enxofre. O ciclo redox do enxofre relativo às suas transformações microbianas é apresentado na Figura 3.1.

Figura 3.1: Representação esquemática do ciclo redox do enxofre. As oxidações são indicadas pelas setas amarelas e as reduções, pelas vermelhas. As reações nas quais não ocorrem alterações redox estão em verde.



Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2010

Bactérias oxidadoras de sulfeto e de enxofre produzem sulfato, enquanto as bactérias redutoras de sulfato consomem o sulfato, produzindo o sulfeto de hidrogênio. Pelo fato de o sulfeto ser tóxico e também reagir com vários metais, a redução do sulfato é um importante processo biogeoquímico. O dimetilsulfeto é o principal composto orgânico sulfurado de importância ecológica na natureza.

O sulfato presente nas águas residuárias pode ser utilizado como acceptor final de elétrons na oxidação de compostos orgânicos. Esta etapa é denominada de redução dissimilatória do sulfato e é realizada pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), que são anaeróbias. Estas bactérias são

consideradas muito versáteis e podem utilizar grande variedade de substratos como, por exemplo: toda a cadeia de ácidos graxos voláteis, diversos ácidos aromáticos, hidrogênio, diversos alcoóis, açúcares, aminoácidos e outros compostos fenólicos (MADIGAN et al., 2010).

Estas bactérias podem ser divididas em dois grupos: (1) oxidadoras incompletas: que oxidam suas fontes de elétrons até acetato, excretando esse composto como produto final de seu metabolismo, e (2) oxidadoras completas: que oxidam suas fontes de elétrons completamente até CO_2 . Em adição, existem também BRS autótrofas, que são capazes de utilizar o hidrogênio como doador de elétrons. Apesar da grande variedade de doadores de elétrons oxidáveis pelas BRS, o produto final do seu metabolismo é sempre o H_2S . As BRS ainda podem utilizar o nitrato (NO_3^-) como acceptor de elétrons, reduzindo este até NH_3 (SANTANA, 2006).

Após a completa redução do sulfato pelas BRS, é necessário oxidar o H_2S formado até enxofre elementar, o que permitirá a eliminação da poluição oriunda dos compostos de enxofre.

3.1.1 Redução de sulfato e enxofre elementar a sulfeto

Segundo Madigan e colaboradores (2010) vários compostos sulfurados inorgânicos são importantes aceptores de elétrons na respiração anaeróbia. O sulfato, a forma mais oxidada do enxofre, é um dos principais ânions encontrados na água do mar, sendo reduzido por bactérias redutoras de sulfato, um grupo amplamente distribuído na natureza. O produto final da redução do sulfato é o sulfeto de hidrogênio (H_2S), um importante produto natural que participa de muitos processos biogeoquímicos.

Maier e colaboradores (2000) explicaram que existem três tipos de redução de enxofre. O primeiro é a redução assimilativa do sulfato, realizada para assimilar enxofre em componentes celulares e ocorre em condições

aeróbias ou anaeróbias. Ao contrário, existem dois caminhos dissimilatórios, sendo que ambos utilizam uma forma de enxofre inorgânico como acceptor final de elétrons. Neste caso, a redução do enxofre ocorre somente em condições anaeróbias.

3.1.1.1 Redução assimilativa e dissimilativa do sulfato

Muitos organismos, incluindo plantas, algas, fungos e a maioria dos procariotos, utilizam o sulfato como fonte de enxofre para as necessidades biossintéticas. A capacidade de utilizar o sulfato como um acceptor de elétrons nos processos geradores de energia, no entanto, envolve a redução em larga escala do SO_4^{2-} , processo restrito às bactérias redutoras de sulfato. Na redução assimilativa de sulfato, o sulfato formado é imediatamente convertido a enxofre orgânico, sob a forma de aminoácidos e outros compostos sulfurados orgânicos, enquanto, na redução dissimilativa de sulfato, o H_2S é excretado (MADIGAN et al., 2010).

Segundo Maier e colaboradores (2000), as células assimilam enxofre na forma de sulfato porque é a forma de enxofre mais disponível e pelo fato do sulfeto ser tóxico. A toxicidade do sulfeto pode ocorrer porque dentro da célula o sulfeto pode reagir com metais nos citocromos (proteínas de membrana). No entanto, sob condições controladas de redução de sulfato dentro da célula, o sulfeto pode ser removido imediatamente e incorporado a uma forma orgânica.

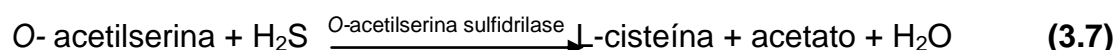
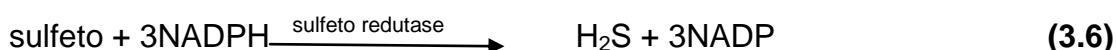
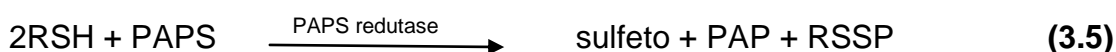
Nos processos de assimilação de sulfato para a biossíntese de moléculas orgânicas, o sulfato é transportado transmembrana para o interior da célula através de transporte ativo. Este mecanismo é diferente dos processos de redução dissimilativa, nos quais o sulfato é transportado unidirecionalmente para o citoplasma a partir de proteínas de membrana localizadas no periplasma bacteriano (BARBOSA, 2009).

Após o sulfato ser transportado para o interior da célula, o ATP é usado para converter o sulfato em adenosina 5`fosfosulfato (APS), uma molécula rica

em energia (Equação 3.3). Uma segunda molécula de ATP é utilizada para transformar a APS em 3'fosfoadenosina 5'fosfosulfato (PAPS) conforme equação 3.4 (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000).



Isso permite que a redução do sulfato a sulfeto e sulfito aconteça em duas etapas (Equações 3.5 e 3.6). Frequentemente, o aminoácido serina é utilizado para a remoção de sulfito, formando o aminoácido cisteína, que contém enxofre (Equação 3.7) (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000).



Por redução dissimilativa de sulfato entende-se a utilização conjunta da oxi-redução de compostos orgânicos ou hidrogênio molecular com a redução de sulfato como um acceptor externo de elétrons sob condições anaeróbias (PATRICIO, 2009). Este processo se diferencia em muito da redução assimilativa de sulfato, onde o mesmo é convertido a enxofre molecular na forma de aminoácidos e segue por diferentes vias bioquímicas.

Segundo Madigan e colaboradores (2010) na redução dissimilativa do sulfato, o sulfato presente na APS é reduzido diretamente a sulfito (SO_3^{2-}) pela enzima APS redutase, com a liberação de AMP. Durante essa redução, ocorrem as reações de transporte de elétrons, que estabelecem uma força próton motiva, que conduz a síntese de ATP, catalisada por uma ATPase. Um dos principais carreadores de elétrons envolvidos é o citocromo c_3 , um citocromo periplasmático de baixo potencial. O citocromo c_3 recebe os elétrons de uma hidrogenase periplasmática, transferindo-os a um complexo protéico associado a membrana. Esse complexo, denominado *Hmc*, carrega os elétrons através da membrana citoplasmática tornando-os disponíveis às enzimas

citoplasmáticas APS redutase e sulfito redutase. No final desse processo de redução dissimilativa o H₂S é excretado.

Outro aspecto relevante com relação à redução dissimilativa do sulfato é a importância geológica do processo, visto que o gás sulfídrico produzido pode reagir com metais presentes no ambiente levando a formação de sulfetos metálicos. Evidências dessa atuação podem ser remetidas à participação das BRS na formação, por exemplo, de depósitos de Pirita (FeS₂). O conhecimento desse processo permitiu investigar o uso dessas bactérias em processos de remediação de metais pesados no ambiente (PATRICIO, 2009).

3.1.1.2 Redução do enxofre elementar

Alguns organismos produzem H₂S durante a respiração anaeróbia, porém, são incapazes de reduzir sulfato, eles são redutores de enxofre elementar e realizam a reação conforme a equação 3.8. Os elétrons necessários a esse processo podem ser oriundos do H₂ ou de diferentes compostos orgânicos.



Segundo Madigan e colaboradores (2010) a fisiologia das bactérias que realizam a redução do enxofre ainda não é tão bem conhecida como a das bactérias redutoras de sulfato, mas sabe-se que os redutores de enxofre não possuem a capacidade de ativar o sulfato a APS e isso provavelmente as impede de utilizar o sulfato como aceptor de elétrons.

3.1.2 Oxidação de sulfeto e enxofre

O enxofre elementar (S^0) é quimicamente estável, sendo oxidado com facilidade por bactérias quimiolitotróficas oxidantes de enxofre. O S^0 é insolúvel e, portanto, as bactérias que o oxidam devem ligar-se aos cristais de enxofre para obter seu substrato.

Na presença de oxigênio, o sulfeto sofre imediata oxidação espontânea, em pH neutro. Bactérias quimiolitotróficas oxidantes de enxofre, a maioria das quais é aeróbia, podem catalisar a oxidação do sulfeto. Além disso, havendo disponibilidade de luz, a oxidação anóxica de sulfeto pode também ocorrer, catalisada por bactérias fototróficas sulfurosas púrpuras e verdes.

Segundo Maier e colaboradores (2000), a via de oxidação heterotrófica de enxofre ainda é incerta, mas, aparentemente, nenhuma energia é obtida neste processo. Os microrganismos quimiolitotróficos oxidantes de enxofre são predominantes na maioria dos ambientes e exigem um pH baixo para uma melhor atividade. Os microrganismos heterotróficos podem oxidar o enxofre em solos com pH neutro a alcalino e quando iniciam esse processo de oxidação, o pH diminui, tornando o ambiente mais favorável para a atividade quimiolitotrófica.

Os compostos sulfurados mais comumente utilizados como doadores de elétrons são o sulfeto de hidrogênio (H_2S), enxofre elementar (S^0) e tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$). A oxidação do enxofre elementar resulta na formação de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e, desse modo, a oxidação do enxofre caracteriza-se por promover uma diminuição do pH do ambiente. Algumas vezes, o enxofre elementar é adicionado a solos alcalinos, visando reduzir o pH, sendo tal processo baseado na natureza ubíqua dos tiobacilos, os quais realizam o processo de oxidação do S (MADIGAN et al., 2010).

3.1.2.1 Oxidação quimioautotrófica

Segundo Madigan e colaboradores (2010) são conhecidos vários sistemas de oxidação presentes em quimiolitotróficos do enxofre. O hidrogênio

(H₂) e os compostos sulfurados reduzidos (H₂S, S⁰, S₂O₃²⁻) são excelentes doadores de elétrons para o metabolismo energético de quimiolitotróficos. Os elétrons oriundos desses compostos são introduzidos em cadeias de transporte de elétrons, gerando uma força próton motiva. Os quimiolitotróficos do enxofre e do hidrogênio também são autotróficos e fixam CO₂ por meio do Ciclo de Calvin.

Tang e colaboradores (2009) explicaram que os microrganismos quimiolitotróficos oxidantes de compostos sulfurados, como as bactérias sulfurosas incolores, possuem diversas características morfológicas, fisiológicas e ecológicas, são capazes de crescer utilizando compostos de enxofre inorgânico, tais como H₂S, S⁰, S₂O₃²⁻, e em alguns casos utilizam compostos orgânicos de enxofre.

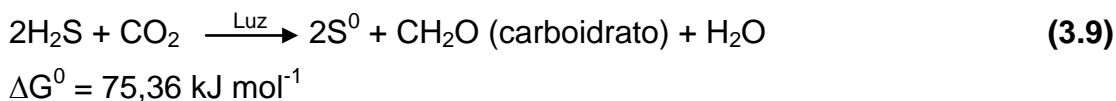
Segundo Maier, Pepper e Gerba (2000), a oxidação do enxofre é um processo quimiolitotrófico aeróbio e muitos microrganismos oxidadores de enxofre são microaerófilos. Esse processo de oxidação é muito importante, pois pode ser utilizado para a recuperação do enxofre elementar.

3.1.2.2 Oxidação fotoautotrófica

A oxidação fotoautotrófica do enxofre é realizada na fotossíntese anoxigênica pelas bactérias verdes e púrpuras do ciclo do enxofre. Estes organismos são encontrados no lodo, em águas paradas, fontes sulfurosas e lagos salinos. Embora a contribuição primária da fotossíntese anoxigênica seja pequena em comparação a fotossíntese aeróbia, esses microrganismos são extremamente importantes no ciclo do enxofre (MAIER, PEPPER e GERBA, 2000).

Tang e colaboradores (2009) explicaram que a oxidação fototrófica é um processo anaeróbio realizado pelas bactérias verdes, como a *Chlorobium*, e bactérias púrpuras, como por exemplo *Allochromatium*. Estas bactérias utilizam

o H₂S como doador de elétrons para a redução de CO₂, numa reação fotossintética chamada de van Niel, conforme descrito na equação 3.9.



Madigan e colaboradores (2010) caracterizam a oxidação fotoautotrófica em dois conjuntos distintos de reações: a reação em que a Luz é conservada como energia química e a reação de escuro, na qual o CO₂ é reduzido a compostos orgânicos, usando a energia armazenada. Esta energia é fornecida em forma de adenosina trifosfato (ATP). A maioria das bactérias púrpuras armazenam o enxofre elementar produzido em grânulos de S no interior da célula.

3.1.3 Desproporção do enxofre

A desproporção de compostos sulfurados, como o tiosulfato (S₂O₃²⁻), o sulfito (SO₃²⁻) e enxofre (S⁰), é uma estratégia adicional de produção de energia para determinados membros do grupo das bactérias redutoras de sulfato, como *Desulfovibrio sulfodismutan*.

Madigan e colaboradores (2010) explicaram que esse tipo de metabolismo permite que as bactérias redutoras de sulfato recuperem a energia a partir dos intermediários sulfurados produzidos na oxidação de H₂S pelos organismos quimiolitotróficos do enxofre, com os quais coexistem na natureza, formando também intermediários gerados em seu próprio metabolismo durante a redução do sulfato.

3.1.4 Oxidação e redução de compostos orgânicos sulfurados

As bactérias do ciclo do enxofre podem metabolizar, além dos compostos inorgânicos de enxofre, compostos orgânicos e esses compostos participam do ciclo biogeoquímico do enxofre.

O Dimetilsulfeto (DMS) é o principal composto orgânico sulfurado de importância ecológica, mas outros compostos orgânicos como o metanetiol (CH_3SH), dimetildissulfeto ($\text{H}_3\text{C-S-S-CH}$) e dissulfeto de carbono (CS_2) também interferem no ciclo global do enxofre. Algumas dessas substâncias possuem odor desagradável e altamente voláteis, podendo dessa forma, penetrar na atmosfera.

Segundo Madigan e colaboradores (2010), o DMS ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$) é produzido principalmente em ambientes marinhos como um produto de degradação do dimetilsulfoniopropionato, um importante soluto osmorregulador de algas marinhas. Esse composto pode ser utilizado como fonte de carbono e doador de elétrons pelos microrganismos, sendo catabolizado a dimetilsulfeto e acrilato. Este último composto, derivado do ácido graxo propionato, é utilizado no crescimento.

O DMS produzido em ambientes anóxicos pode ser transformado microbiologicamente pelo menos de três maneiras: (1) na metanogênese (produzindo CH_4 e H_2S), (2) como doador de elétrons na fixação fotossintética de CO_2 por bactérias fototróficas púrpuras, produzindo Dimetilsulfóxido (DMSO), e (3) como doador de elétrons no metabolismo energético de determinados quimiorganotróficos e quimilitotróficos (MADIGAN et al., 2010).

3.2 Microbiologia

A compreensão da biologia e ecologia dos microrganismos associados ao ciclo do enxofre é extremamente importante para a aplicação biotecnológica dessas bactérias no tratamento de efluentes. Os processos bioquímicos

essenciais ocorridos no ciclo do enxofre e alguns exemplos de microrganismos envolvidos são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Processos essenciais e procaríotos no ciclo do enxofre

Processo	Exemplo de organismo
Oxidação de sulfeto/enxofre	$(\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-})$
Aeróbio	Quimiolitotróficos de enxofre (<i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , muitos outros)
Anaeróbio	Bactérias fototróficas púrpuras e verdes, alguns quimiolitotróficos
Redução de sulfato (anaeróbio)	$(\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S})$
	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i>
Redução de enxofre (anaeróbio)	$(\text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S})$
	<i>Desulfuromonas</i> , várias <i>Archaea</i> hipertermófilas
Desproporcionamento do enxofre	$(\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-})$
	<i>Desulfovibrio</i> e outros
Oxidação/redução dos compostos orgânicos sulfurados	$(\text{CH}_3\text{SH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S})$ $(\text{DMSO} \rightarrow \text{DMS})$
Dessulfurilação	$(\text{S-orgânico} \rightarrow \text{H}_2\text{S})$ Vários organismos são capazes de realizar

Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2010

3.2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e enxofre

Filogeneticamente, a maioria das bactérias redutoras de sulfato (BRS) e enxofre pertencem ao grupo de *Deltaproteobacteria*. Porém, o gênero *Archaeoglobus* pertence ao domínio *Archaea* e *Thermodesulfobacterium* é uma

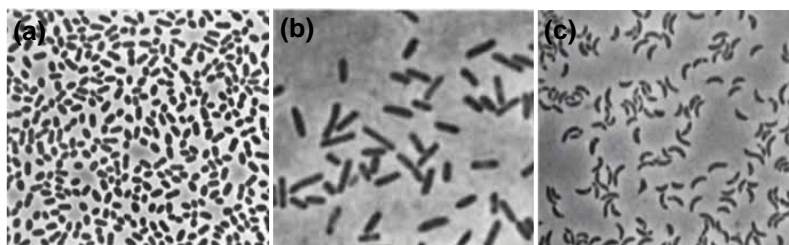
bactéria hipertermofílica de ramificação precoce. Os gêneros *Sulfospirillum* e *Campylobacter* são membros de *Epsilonproteobacteria* (MADIGAN et al., 2010).

As BRS foram reunidas fisiologicamente por sua capacidade de utilizar formas oxidativas de enxofre, ao invés do oxigênio, como acceptor final de elétrons, tendo como produto dessa reação o gás sulfídrico (H_2S). Esse processo é denominado de “respiração do sulfato” ou também de redução dissimilativa do enxofre.

As BRS são amplamente distribuídas em ambientes aquáticos e terrestres que se tornam anóxicos em decorrência de processos de decomposição microbiana. As bactérias redutoras de enxofre podem ser encontradas nos mesmos habitats que as BRS, frequentemente formando associações com bactérias que oxidam H_2S a S^0 , como as bactérias verdes sulfurosas.

São conhecidos mais de 40 gêneros desses organismos, os principais são *Desulfobacter*, *Desulfuromonas* e *Desulfovibrio* (Figura 3.2), sendo o último o gênero mais estudado. As bactérias redutoras de sulfato são divididas em dois subgrupos: o Grupo I, que é incapaz de oxidar acetato a CO_2 , e o Grupo II, que é capaz de realizar tal oxidação.

Figura 3.2: Fotomicrografias de contraste de fase de bactérias redutoras de sulfato e enxofre. (a) *Desulfobacter postgatei*, (b) *Desulfuromonas acetoxidans* e (c) *Desulfovibrio desulfuricans*.



Fonte: <http://202.114.65.51/fzjx/wsw/newindex/tuku/MYPER/b08/673.htm>. Acesso em 17/02/2012

Segundo Madigan e colaboradores (2010), as bactérias redutoras de sulfato do Grupo I são, em sua maioria, Gram-negativas, podem ter a morfologia de bacilos, vibriões ou células ovoides, algumas possuem flagelo e

são móveis. Os gêneros pertencentes a esse grupo são: *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobotulus*, *Desulfofustis*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonile*, *Desulfobacula*, *Archeoglobus* (domínio *Archaea*), *Desulfobulbus*, *Desulforhopalus*, *Thermodesulfobacterium*.

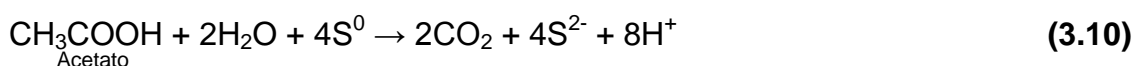
O gênero *Desulfovibrio* é o mais estudado devido principalmente a sua ampla distribuição geográfica e facilidade de cultivo em condições laboratoriais (BARBOSA, 2009). É comumente encontrado em habitats aquáticos ou solos encharcados, contendo matéria orgânica em abundância e concentrações suficientes de sulfato. Estas bactérias são predominantemente Gram-negativas, possuem morfologia de bacilos curvos com flagelação polar, não possuem esporos, são usualmente mesófilas, porém, há espécies termófilas. Possuem desulfoviridina, uma proteína que assume um papel importante no mecanismo de redução do sulfito (ALMEIDA, 2005, BARBOSA, 2009, MADIGAN et al., 2010; OLIVEIRA, 2011). Segundo Voordouw (1995), o gênero *Desulfovibrio* possui um genoma pequeno, como por exemplo os genomas de *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas*, que possuem o genoma de 1,7 e 1,6 Mbp, respectivamente.

O gênero *Desulfotomaculum* é o único do Grupo I que é, filogeneticamente considerado um membro de *Bacteria* Gram-positivas, (VOORDOUW, 1995; MADIGAN et al., 2010), compreende bacilos retos ou curvos, móveis por flagelação peritríquia ou polar, formadores de endósporos e a desulfoviridina é ausente (MADIGAN et al., 2010).

Os gêneros pertencentes ao Grupo II são: *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfarculus*, *Desulfacinum*, *Desulforhabdus* e *Thermodesulforhabdus*. Esses gêneros são formados por bactérias Gram-negativas, com exceção do gênero *Desulfonema*, que é composto por bactérias Gram-positivas. Possuem diversas morfologias (bacilos, células esféricas, filamentosas, em cubos, cocos e vibriões). Essas bactérias especializaram-se na oxidação de ácidos graxos, particularmente o acetato, reduzindo sulfato a sulfeto. O gênero mais estudado do Grupo II é o *Desulfobacter*, bacilos sem esporos e quando móveis, possuem flagelo polar único (MADIGAN et al., 2010).

Os gêneros *Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Sulfurospirillum* e *Campylobacter* pertencem ao grupo das bactérias redutoras dissimilativas de enxofre. Possuem morfologia de bacilos ou vibriões. O gênero mais estudado desse grupo é *Desulfuromonas*, que possuem morfologia de bacilos retos, flagelo único lateral, não possuem esporos, são Gram-negativos e são anaeróbios obrigatórios (MADIGAN et al., 2010).

Segundo Maier, Pepper e Gerba (2000), *Desulfuromonas acetooxidans* é um exemplo de bactéria que cresce em compostos pequenos de carbono, como o acetato, etanol e propanol, usando o enxofre elementar como o acceptor final de elétrons (Equação 3.10).



3.2.2 Bactérias oxidadoras de sulfeto

Segundo Santana (2006), após a completa redução do sulfato pelas BRS, é necessário oxidar o H₂S formado até enxofre elementar, o que permitirá a eliminação da poluição oriunda dos compostos de enxofre. Uma grande variedade de bactérias é capaz de oxidar o sulfeto até o enxofre elementar ou até o sulfato.

As bactérias aeróbias responsáveis pela oxidação do sulfeto utilizam o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons e os elétrons derivados da oxidação de enxofre são usados para a transformação de energia da cadeia respiratória e redução de dióxido de carbono (GARCIA, 2009).

Tang, Baskaran e Nematí (2009) comentaram que a conversão do sulfeto a enxofre elementar ou ácido sulfúrico depende da concentração de oxigênio. As reações utilizadas pelas bactérias aeróbias autotróficas para gerar energia de compostos inorgânicos sulfuro-reduzidos, no qual o oxigênio é o acceptor de elétrons, são apresentadas nas equações 3.11, 3.12 e 3.13.



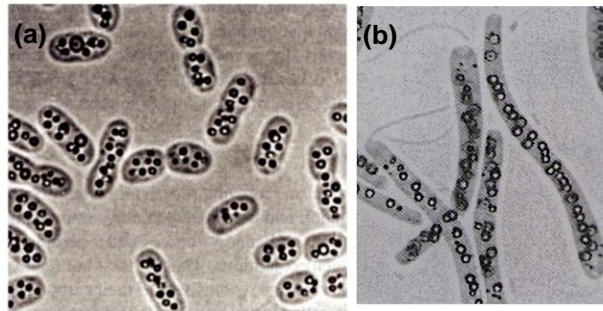
Em condições anaeróbias, algumas bactérias oxidadoras de sulfeto também podem crescer na presença de tiosulfato, que atua como doador de elétrons, e com nitrato ou outros compostos nitrogenados como aceptores de elétrons, que são metabolizados a sulfato e nitrogênio, respectivamente (GARCIA, 2009).

As bactérias púrpuras sulfurosas são organismos fototróficos anoxigênicos que utilizam o sulfeto de hidrogênio e outros compostos reduzidos do enxofre como doador de elétrons para a redução de CO_2 na fotossíntese. Esses microrganismos são geralmente encontrados em regiões anóxicas e iluminadas de lagos e outros habitats aquáticos onde há acúmulo de H_2S , como também em fontes sulfurosas, onde o H_2S produzido geoquímica ou biologicamente pode promover a formação de florescimentos de bactérias púrpuras sulfurosas.

Segundo Madigan e colaboradores (2010), todas as bactérias púrpuras sulfurosas descobertas até o momento são *Gammaproteobacteria*. Os principais gêneros são: *Ectothiorhodospira*, *Thiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Chromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thioflavicoccus*, *Thiorhodococcus*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Thiohalocapsa*, *Thiococcus*, *Thiospirillum*, *Thiorhodovibrio*, *Thiolamproyum*, *Lamprobacter*, *Lamprocystis*, *Thiodictyon* e *Thiopedia*.

De acordo com Holt (1994), durante a oxidação do sulfeto, glóbulos de enxofre são armazenados pelas células internamente e externamente, além de polissacarídeos, poli- β -hidroxibutirato, e polifosfato. A maioria das bactérias púrpuras estoca grânulos de enxofre dentro da célula (Figura 3.3). Esses grânulos desaparecem à medida que essas bactérias realizam a oxidação completa até sulfato.

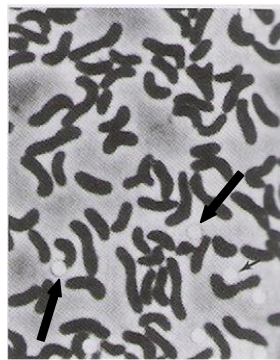
Figura 3.3: Bactérias púrpuras sulfurosas com grânulos de enxofre armazenados no interior das células. (a) Bactérias do gênero *Chromatium* e (b) *Thiospirillum jenense*.



Fontes: <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%2011/deep.html>, Acesso em 17/02/2012, e Adaptado de MADIGAN et al.,2010

Os gêneros *Ectothiorhodospira* e *Halorhodospira* apresentam interesse especial. Contrariamente às outras bactérias púrpuras sulfurosas, esses organismos oxidam o H_2S e produzem S^0 externamente à célula (Figura 3.4). Muitas espécies desses gêneros são halofílicas ou alcalifílicas, estando entre os organismos mais extremos em relação a tais características, dentre todas as bactérias conhecidas. Esses organismos são geralmente encontrados em lagos salgados, lagos ricos em carbonato e salinas (MADIGAN et al., 2010).

Figura 3.4: Micrografia de fase de células de *Ectothiorhodospira mobilis* com glóbulos de enxofre externos, indicados pelas setas. As células apresentam largura aproximada de 0,8 μm .



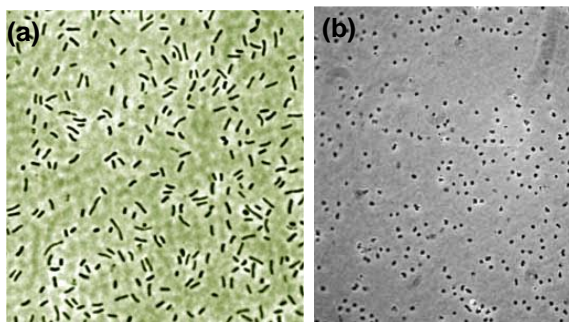
Fonte: Adaptado de MADIGAN et al.,2010

As bactérias verdes sulfurosas constituem um grupo filogeneticamente distinto, composto por bactérias fototróficas e anoxigênicas, anaeróbias obrigatórias. Essas bactérias possuem as bacterioclorofilas *a*, *c*, *d* ou *e*. Esses pigmentos atuam somente em reações de captação de luz e ficam armazenados nos clorossomos.

Sakurai e colaboradores (2010) explicaram que as sulfobactérias verdes utilizam vários compostos de enxofre, como o sulfeto, o enxofre elementar e o tiosulfato como doadores de elétrons para o crescimento fotoautotrófico.

Os principais gêneros de bactérias verdes sulfurosas (Figura 3.5) são *Chlorobium*, *Chloabaculum*, *Prosthecochloris* e *Chloroherpeton*. As bactérias dos gêneros *Chlorobium* e *Chloabaculum* são bacilos retos ou curvos, alguns ramificantes, possuem coloração verde ou marrom e algumas contêm vesículas de gás. O gênero *Prosthecochloris* inclui bactérias esféricas e ovais, imóveis, possuem coloração verde ou marrom e formam prostecas. *Chloroherpeton* apresenta bactérias verdes, em forma de bacilos e são móveis por deslizamento (MADIGAN et al., 2010).

Figura 3.5: Bactérias verdes sulfurosas. (a) *Chlorobium* sp. e (b) *Prosthecochloris aestuarii*.

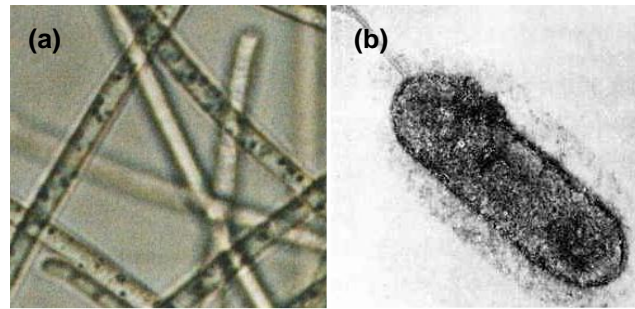


Fonte: <http://genome.jgi-psf.org/chlpb/chlpb.home.html>. Acesso em 17/02/2012

As bactérias sulfurosas incolores são outro grupo de bactérias que também oxidam compostos sulfurados reduzidos. São chamadas de incolores devido a ausência do pigmento bacterioclorofila. Podem ser quimiolitotróficas obrigatórias (*Thiobacillus* e *Thiomicrospira*), quimiolitotróficas facultativas (*Sulfolobus*, *Thermotrix* e *Thiobacillus*) e quimiolitotróficas heterotróficas (*Beggiatoa* e *Thiobacillus*).

Pérez e Villa (2004) explicam que as bactérias incolores apresentam diversidade morfológica, fisiológica e ecológica. São de grande interesse sanitário devido à capacidade de oxidar e remover sulfeto presente em reatores anaeróbicos. Os gêneros mais estudados em sistemas de tratamento de esgoto são o *Beggiatoa* e *Thiobacillus* (Figura 3.6).

Figura 3.6: Bactérias sulfurosas incolores. (a) *Beggiatoa alba*. e (b) *Thiobacillus thiooxidans*.



Fonte: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Beggiatoa> e http://geo.web.ru/db/msg.html?mid=1161842&uri=part_6_2_1.htm. Acesso em 17/02/2012.

Os organismos do gênero *Beggiatoa* são bactérias filamentosas, deslizantes e oxidantes de enxofre. São encontrados na natureza principalmente em habitats ricos em H_2S , como fontes sulfurosas, sedimentos ricos em algas em decomposição, camadas de lodo e águas poluídas por esgoto. Em tais ambientes, os filamentos de *Beggiatoa* apresentam-se preenchidos por grânulos de enxofre (MADIGAN et al., 2010).

O gênero *Thiobacillus* apresenta bactérias bacilares e Gram-negativas. Friedrich (1998) citado por Garcia (2009) explicou que esse gênero utiliza compostos inorgânicos como fonte de energia e CO_2 como fonte de carbono, crescem lentamente e são muito pequenos, o que dificulta a identificação em cultivos puros. Neste gênero, destaca-se a espécie *Thiobacillus denitrificans*, uma bactéria oxidadora de enxofre, anaeróbia facultativa, litoautotrófica obrigatória, que transitoriamente deposita grânulos de enxofre intracelular. Esta bactéria difere também por sua habilidade de também crescer anaerobicamente com tiosulfato, como doador de elétrons, e com nitrato, comoceptor de elétrons.

3.3 O íon SO_4^{2-} em águas residuárias

O estudo da redução de sulfato das águas residuárias é de suma importância ambiental, visto que diversos processos industriais geram este tipo de resíduo. A presença do íon sulfato nos recursos hídricos pode reduzir o pH, promovendo a morte de seres sensíveis a esta alteração, além de ser digerido anaerobiamente nos corpos hídricos formando o gás sulfídrico que apresenta uma toxicidade elevada.

Segundo Silva (2005), a forma mais estável e difundida dos compostos de enxofre é o íon sulfato, e este pode ser encontrado nos mais diversos tipos de águas residuárias, desde o esgoto sanitário, na concentração de 20 a 50 mg.L⁻¹ até em descartes industriais, em concentrações que podem variar entre 12.000 a 35.000 mg.L⁻¹.

Conforme Mockaitis (2008), as emissões de águas contaminadas por sulfato podem ter duas origens, naturais ou antropogênicas. As emissões naturais são oriundas principalmente de águas oceânicas e de sais minerais inorgânicos presentes no solo, nos quais o sulfato pode ser dissolvido pela percolação de águas pluviais e carregado para camadas inferiores do solo, onde podem sofrer biotransformações pelas BRS, produzindo desta maneira sulfetos, que combinados com metais pesados assumem uma forma insolúvel. Estes sulfetos insolúveis podem ser reoxidados por águas subsuperficiais (por exemplo percolação de água pluvial), gerando águas ricas em sulfato.

As emissões antropogênicas compreendem desde as águas de esgoto doméstico, até emissões industriais de compostos de enxofre (enxofre, sulfitos, sulfatos, etc.) que podem vir a serem convertidos a sulfato no meio ambiente durante o ciclo biogeoquímico do enxofre. Dentre as emissões industriais de compostos de enxofre, podem-se destacar as indústrias de papel, de processamento de alimentos, de explosivos, de xenobióticos em geral, como tensoativos, e também atividades que fazem a combustão de combustíveis fósseis. Outra forma conhecida de emissão de sulfato no ambiente também é por meio de atividades de mineração, principalmente em águas de drenagem, que apresentam características ácidas, resultado da degradação microbiana de minerais (MOCKAITIS, 2008).

É importante ressaltar que o excesso do íon sulfato no solo e na água provoca diversos impactos ambientais. No solo observa-se tanto problemas de acidez como de solubilização de metais pesados. Nos recursos hídricos, os impactos são mais evidentes, pela própria presença de metais pesados, como pela elevação da acidez da água.

3.3.1 Sulfato em esgoto doméstico

O esgoto doméstico pode ser entendido como toda água residuária gerada pelas atividades e necessidades humanas em uma residência e que fluem através da rede de esgoto. Podem igualmente ser lançada diretamente no ambiente ou redirecionadas para estações de tratamento. Segundo von Sperling (2005), os esgotos domésticos contêm aproximadamente 99,9% de água. A fração restante inclui sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como microrganismos. Portanto, é devido a essa fração de 0,1% que há a necessidade de se tratar os esgotos.

Os principais constituintes orgânicos são: proteínas, açúcares, óleos e gorduras, microrganismos, sais orgânicos e componentes dos produtos saneantes. Os principais constituintes inorgânicos são sais formados de ânions (cloretos, sulfatos, nitratos, fosfatos) e cátions (sódio, cálcio, potássio, ferro e magnésio).

Segundo Naval e colaboradores (2002), dentre os vários compostos existentes em águas residuárias, o enxofre é um dos mais importantes nutrientes para o metabolismo de microrganismos. No esgoto o enxofre é originário das fezes e águas de abastecimento e está presente principalmente como sulfatos e sulfetos inorgânicos e enxofre orgânico.

3.3.2 Sulfato em efluentes industriais

Segundo von Sperling (2005), os despejos industriais apresentam uma ampla variedade das suas características qualitativas, o que dificulta uma generalização dos valores mais comuns. As características dos efluentes industriais são inerentes a composição das matérias primas, das águas de abastecimento e do processo industrial. A concentração dos poluentes nos efluentes é em função das perdas no processo ou pelo consumo de água. As principais características são a presença de compostos orgânicos, como solventes e pigmentos, ácidos e/ou bases e metais pesados.

Os diversos ramos industriais têm apresentado efluentes com concentrações de poluentes acima dos limites permitidos. O sulfato é um desses compostos e devido à dificuldade em diminuir sua concentração na própria fonte geradora é necessário conhecer o limite máximo que uma estação de tratamento de esgotos pode receber sem reduzir seu desempenho operacional (SENA e RIVELI, 2002).

Diversas águas residuárias contêm concentrações de sulfato mais elevadas do que o esgoto sanitário. Além do sulfato, outros compostos de enxofre podem estar presentes. A contaminação de águas residuárias industriais com compostos de enxofre pode ocorrer devido ao uso de matérias primas sulfurosas aplicadas aos processos, como, por exemplo, nas indústrias alimentícias e de papel e celulose, ou devido ao uso de águas contendo sulfato, por exemplo, a água do mar (SILVA, 2005).

von Sperling (2005) explica que, em termos do tratamento biológico dos despejos industriais, aspectos como a biodegradabilidade, tratabilidade, concentração de matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes e toxicidade assumem grande importância.

3.4 Aplicação das BRS para a remoção de sulfato em águas residuárias

A redução de sulfato para sulfeto em sistemas de tratamento de águas residuárias é um problema universal, devido aos maus odores, perigos à saúde e corrosão, sendo que este fenômeno ocorre mais amplamente em condições de clima quente. Altas concentrações de sulfato em reatores anaeróbios causa toxicidade às bactérias anaeróbias, além disso, provoca uma variação na rotina metabólica da digestão anaeróbia, pois as bactérias redutoras do sulfato irão competir pelo mesmo substrato com as bactérias anaeróbias envolvidas na metanogênese (NAVAL et al., 2002).

Pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de utilizar os processos sulfetogênicos, ou seja, processos nos quais as bactérias redutoras de sulfato (BRS) utilizam o íon sulfato como acceptor final de elétrons, como alternativa biotecnológica no tratamento de águas residuárias contaminadas com formas oxidadas do enxofre.

No Brasil, os processos físicos e químicos utilizados, para remoção de sulfato incluem desde alternativas de menor custo, como precipitação com sais de cálcio, a processos mais caros como osmose reversa, eletrodialise e nanofiltração. Processos de precipitação química resultam em grande quantidade de resíduos sólidos devido à quantidade de reagente a ser empregada. Esses resíduos devem ser adequadamente dispostos, incorporando custos para classificação, manuseio e destinação (SILVA et al., 2002).

Os tratamentos biológicos possuem baixo custo e apresentam-se como uma alternativa aos processos físico-químicos no tratamento de águas residuárias com altas concentrações de sulfato.

Silva e colaboradores (2002) avaliaram a remoção biológica de sulfato a partir de um efluente industrial rico em sulfato utilizando um reator anaeróbio de leito fixo, onde a biomassa é imobilizada em um meio suporte. O biorreator possuía um volume de 94,2 L e foi preenchido com espuma de poliuretano. As

matrizes de poliuretano foram inoculadas com biomassa retirada da estação de tratamento da indústria e lodo proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico.

O bioreator foi instalado em uma indústria química que produz peróxidos orgânicos e que gera um efluente com concentrações de sulfato entre 12.000 a 35.000 SO_4^{2-} mg L^{-1} . Parte desse conteúdo de sulfato é gerado nos processos produtivos, especificamente, nas etapas finais, quando o sulfato de sódio é adicionado para remover água do produto e no processo com sulfeto de sódio, utilizado para manter o oxigênio ativo no produto final.

Os experimentos foram conduzidos em três diferentes fases: na fase 1, o reator foi operado continuamente para aclimatizar a biomassa para o esgoto, a fase 2 consistia de uma operação em batelada, enquanto que na fase 3 o reator foi operado semi-continuamente.

Segundo Silva e colaboradores (2002), a operação desse reator anaeróbio de leito fixo apresentou ótimos resultados, com uma eficiência de remoção máxima de sulfato de 97%. As condições de operação do reator favoreceram a predominância das bactérias redutoras de sulfato e bactérias sulfurosas púrpuras fototróficas anoxigênicas.

Sarti e colaboradores (2008) utilizaram um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (ASBBR- Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor) em carvão mineral e recirculação de líquido durante a fase reacional para a remoção biológica do sulfato.

Esse reator foi concebido para promover a redução do sulfato presente em água residuária industrial rica em sulfato, proveniente de uma indústria química que tem como principal atividade a fabricação de óleo para acabamento de couros animais, processo este baseado na sulfonação de óleos vegetais (arroz, soja e milho). A reação completa de sulfonação ocorre na presença de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e amônia (líquido) em reator operado em batelada e sob temperatura controlada. No final do processo de sulfonação,

ocorre a lavagem do óleo produzido com água, cujo objetivo principal é a eliminação dos ácidos livres.

O inóculo utilizado no reator ASBBR foi de lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB instalado na Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários do Campus da Universidade de São Paulo (São Carlos-SP). Para completar o volume a ser tratado pelo reator adicionou-se esgoto sanitário (rede coletora pública) e a bomba de recirculação foi acionada. A cada batelada ou ciclo, o reator era realimentado totalmente com esgoto sanitário.

O monitoramento do reator ASBBR foi realizado durante 275 dias (92 ciclos) por meio de análises físico-químicas (afluente e efluente) tais como Demanda Química de Oxigênio (DQO) total e filtrada, Nitrogênio Amoniacal (NH_4^+), Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), pH, Ácidos Voláteis Totais (AVT) como ácido acético, alcalinidade, determinação de sulfetos totais dissolvidos (STD) e concentrações de sulfato.

Sarti e colaboradores concluíram que a aplicação de tratamento biológico em efluente industrial contendo elevadas concentrações de sulfato forneceu resultados expressivos em termos de redução de sulfato (88 a 92%), o que permite vislumbrar a possibilidade de uso de reator anaeróbio ASBBR para tal finalidade e, no futuro, a aplicação em larga escala no tratamento de outras águas residuárias ricas em sulfato.

Os autores constataram, no entanto, a formação de altas concentrações de compostos reduzidos de enxofre e de DQO residual para concentrações de sulfato superiores a $2,0\text{g SO}_4^{2-}$. Por essa razão, a aplicação desse processo em escala industrial torna necessária a implantação de sistema de tratamento complementar para adequar os efluentes aos padrões de emissão.

Gilbert e colaboradores (2002) aplicaram as BRS para o processo de biorremediação *in situ* de águas provenientes da drenagem ácida de mina. Os autores utilizaram uma técnica recente, que consiste na imobilização de BRS em barreiras permeáveis reativas (BPR).

A mineração, de um modo geral, tem sido fonte de severo impacto ambiental, dentre os quais, a Drenagem Ácida de Mina (DAM), que é resultado da oxidação natural de minerais sulfetados quando expostos à ação combinada de água e oxigênio, podendo ser acelerada na presença de alguns microrganismos. Esses efluentes são geralmente caracterizados pela elevada acidez e por conter metais e sulfatos. Quando não controlada, a drenagem ácida pode fluir até os corpos d'água adjacentes causando mudanças substanciais no ecossistema aquático, constituindo-se em uma fonte difusa de poluição.

A DAM é considerada um dos problemas ambientais mais graves associados à extração mineral, estando geralmente relacionada com as atividades de mineração de carvão, lignita e de sulfetos polimetálicos ou de metais e minerais radioativos que tenham sulfetos associados.

A técnica utilizada por Gilbert e colaboradores (2002) baseia-se em instalar no aquífero uma barreira de material apropriado, capaz de induzir físico-quimicamente os processos biológicos envolvidos para remediar águas subterrâneas contaminadas, utilizando as BRS. Uma vez instalada, a barreira, teoricamente, não necessita de manutenção.

Nesse experimento, as BRS utilizadas foram provenientes de amostras orgânicas ambientais (sedimento de riachos, lodo e esgoto), acompanhada de fontes de carbono e nutrientes. Os autores optaram por culturas mistas, uma vez que os resultados obtidos pela técnica BPR em laboratório mostraram que essas se adaptam mais rápido às condições ambientais que as culturas puras.

Em sua pesquisa, Gilbert e colaboradores (2002) citaram diversos outros trabalhos que utilizaram essa técnica e compara os resultados alcançados pelos diversos autores na remoção de sulfato e precipitação de metais.

Os autores concluíram que as BRS são mais aplicáveis nesse processo de biorremediação do que os outros grupos de bactérias. Os autores destacaram ainda que é necessário complementar as fontes de carbono e

outros nutrientes e controlar condições, como o pH, para o sucesso da barreira permeável reativa, baseando-se em estudos laboratoriais.

3.5 Oxidação biológica do sulfeto e recuperação de S

O sulfeto (H_2S) é um constituinte comum de muitos despejos industriais gerados em processos industriais que utilizam compostos reduzidos de enxofre ou matérias primas ricas em SO_4^{2-} . Este ânion corresponde ao último estado de oxidação do enxofre, e um dos maiores impactos associado ao tratamento biológico destes despejos refere-se ao seu descarte em corpos receptores d'água.

Dentre os principais problemas associados à emissão do sulfeto de hidrogênio do sistema de tratamento de águas residuárias está a corrosão da estrutura dos reatores, além da toxicidade e a liberação de odores ofensivos para a atmosfera.

Sob condições de anaerobiose, o sulfato é utilizado pelas Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) como aceptor final de elétrons durante a oxidação da matéria orgânica, resultando na produção de sulfeto (H_2S). A utilização de processos biológicos envolvendo bactérias fotossintéticas anoxigênicas, para a remoção de compostos reduzidos de enxofre, é uma alternativa bastante atrativa em relação aos métodos clássicos citados na literatura. Estes microrganismos, por serem fotossintéticos, obtêm energia da luz, contribuindo não apenas para a oxidação do H_2S a S^0 , mas também para a remoção da matéria orgânica e recuperação de S^0 .

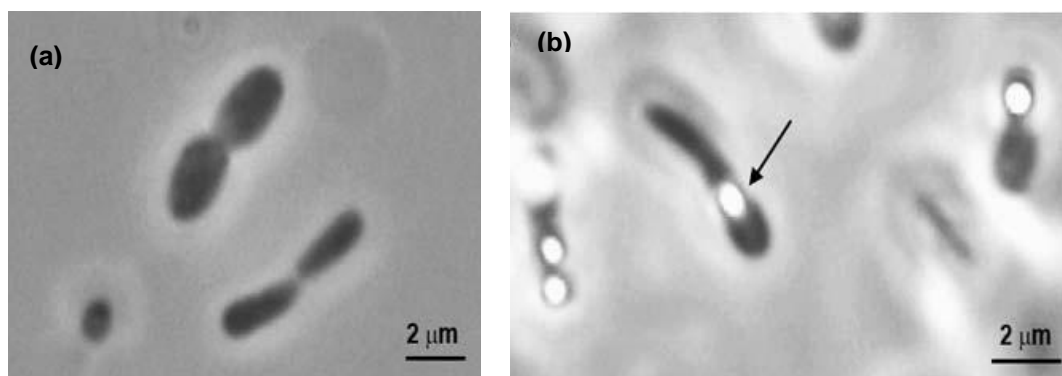
Borkeinstein e Fischer (2006) investigaram a remoção de sulfeto e a recuperação de enxofre elementar pela bactéria sulfurosa púrpura *Allochromatium vinosum*, cepa 21D, que foi utilizada como um biocatalisador para oxidar o sulfeto em enxofre elementar. Essa bactéria foi modificada geneticamente, tendo o gene *dsrB* inativado, sendo portanto, incapaz de

continuar a oxidar enxofre armazenado em glóbulos dentro da célula até sulfato. Este processo foi induzido em reatores em batelada, inoculados com sulfeto e operados com baixa concentração de oxigênio.

Segundo os autores, a vantagem de se utilizar as bactérias anaeróbias fototróficas ao invés das bactérias fototróficas aeróbias (por exemplo *Thiobacillus*) é a redução de custos do processo, porque não há necessidade de aeração.

No início desse experimento, as células de *Allochromatium vinosum* estavam livres de glóbulos de enxofre (Figura 3.7a). O sulfeto convertido em enxofre elementar foi depositado em numerosos glóbulos de enxofre no interior das células (Figura 3.7b).

Figura 3.7: Fotomicrografia de *Allochromatium vinosum*, cepa 21D, (a) livre de glóbulos de enxofre no início do experimento e (b) com glóbulos de enxofre.



Fonte: Borkeinstein; Fischer (2006) modificado.

No final de cada etapa, 2 litros de meio (contendo células com glóbulos de enxofre) foram retirados e transferidos para o decantador para determinar a quantidade de enxofre produzido. Após 7 dias, o sobrenadante foi retirado e as células sedimentadas foram secadas a 80°C durante 2 dias, para evaporar o restante do conteúdo de água e destruir as células. O material seco foi utilizado para quantificar o enxofre produzido. O enxofre elementar foi extraído das células com clorofórmio e separado por HPLC de fase reversa. O resultado foi analisado por luz UV com comprimento de onda de 263 nm.

A bactéria *Allochromatium vinosum*, cepa 21D, foi capaz de remover sulfeto com uma taxa de remoção de 49,3 µM/h e uma eficiência máxima de remoção sulfeto de 98,7%. A média de remoção do sulfeto em todo o experimento foi de 91,7%. Além disso, não foi produzido sulfato devido à incapacidade genética do microrganismo. No final da pesquisa, Borkeinstein e Fischer (2006) conseguiram reciclar 871,6 mg de enxofre elementar, a partir de 1.443 mg de sulfeto adicionado, o que corresponde a 60,4% de reciclagem.

Segundo Vanini e colaboradores (2008), devido ao alto valor comercial do S⁰, há interesse em induzir a oxidação biológica parcial do sulfeto para recuperação deste elemento ou para remoção do mesmo de águas residuárias. As vantagens da oxidação parcial são a insolubilidade do enxofre elementar, sendo mais fácil separá-lo do efluente; o baixo consumo de oxigênio requerido no processo e menor consumo energético.

Em suas pesquisas, Vanini e colaboradores (2008), utilizaram um biorreator de membrana para a oxidação de sulfeto. Este experimento teve como finalidade selecionar novos microrganismos capazes de oxidar os compostos de enxofre reduzidos de forma eficiente. A comunidade microbiana foi caracterizada e selecionada pela construção de bibliotecas de genes 16S rRNA e triagem posterior dos clones. A técnica de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) foi utilizada para avaliar a diversidade de bactérias.

O experimento de oxidação do sulfeto a enxofre elementar procedeu de forma eficiente, os pesquisadores conseguiram 76% de conversão. A análise de biblioteca de clones e os experimentos de FISH revelaram que a unidade taxonômica dominante no biorreator era constituída por *Gammaproteobacteria* pertencentes à família *Halothiobacillaceae*. Outros grupos, em menor quantidade, foram detectados e pertencem aos grupos *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Clostridia*, *Mollicutes*, *Sphingobacteria*, *Bacteroidetes* e *Chlorobia*.

Vanini e colaboradores (2008) concluíram que a seleção e a utilização de bactérias presentes em águas residuárias em estações de tratamento são uma alternativa eficiente para a remoção de sulfeto.

Segundo Pérez e Villa (2004), o processo conhecido como dessulfurização tem sido aplicado para a remoção de sulfeto e se utiliza microrganismos capazes de oxidar compostos reduzidos de enxofre transformando-os em compostos de fácil eliminação.

A dessulfurização pode ser entendida como o processo realizado por diversos microrganismos para transformar compostos orgânicos de enxofre em H₂S. Esse processo possui uma série de vantagens como o baixo custo operacional e menor consumo energético, além de poder ser operado a temperatura ambiente.

Segundo Pérez e Villa (2004), os microrganismos utilizados para esse processo são alguns tipos de bactérias do enxofre incolores, pertencentes aos gêneros *Beggiatoa*, *Sulfolobus*, *Lectosprillum* e *Thiobacillus*, sendo esse último o mais estudado. Os autores destacaram que para a remoção de sulfeto em biogás, os microrganismos autotróficos pertencentes ao gênero *Thiobacillus* tem apresentado grande aplicação, pelo fato destes organismos utilizarem o dióxido de carbono do biogás para suprir suas necessidades de carbono.

Dessa forma, a dessulfurização biológica com microrganismos fototróficos, heterotróficos e autotróficos tem sido amplamente utilizado para a remoção de enxofre e é considerada pelos autores o processo biológico mais adequado para o tratamento do biogás.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi elaborado em Belo Horizonte/MG. Foi realizada uma pesquisa exploratória por meio de revisão bibliográfica elaborada a partir de levantamento da literatura sobre o tema em questão, principalmente em artigos científicos. O material para pesquisa foi obtido na Biblioteca da Universidade Federal de Minas Gerais, constituído principalmente de livros, dissertações, teses e artigos e consulta em bases de dados na internet, principalmente no Portal de Periódicos CAPES.

5 CONCLUSÕES

Com base na literatura pesquisada, existe um grande interesse no desenvolvimento de alternativas ecologicamente corretas e de custo reduzido para o tratamento das águas residuárias. A utilização dos microrganismos envolvidos no ciclo do enxofre são uma alternativa sustentável para o desenvolvimento de biotecnologias para o tratamento de efluentes.

A oxidação biológica de compostos reduzidos de enxofre, segundo os estudos laboratoriais citados no presente trabalho, demonstrou ser um processo viável para aplicação em escala real para a remoção do sulfeto e recuperação do enxofre elementar.

A aplicação das bactérias redutoras de sulfato é uma etapa importante no processo de remoção dos compostos sulfurosos de águas residuárias, pois, uma vez que os compostos são reduzidos, podem ser utilizados no metabolismo das bactérias oxidadoras de sulfeto e enxofre, para a remoção de H_2S e recuperação do enxofre elementar, que apresenta grande valor comercial.

A utilização de bactérias fotossintéticas anoxigênicas apresenta vantagens em relação às bactérias fototróficas aeróbias, pois, por serem fotossintéticas, obtêm energia da luz, contribuindo não apenas para a oxidação do H_2S a S^0 , mas também para a remoção da matéria orgânica e recuperação de S^0 . Além disso, não há necessidade de aeração, o que reduz muito os custos do processo de tratamento.

Portanto, a remoção de compostos de enxofre das águas residuárias deve ser realizada de maneira a tornar possível o descarte de efluentes com a qualidade adequada e a produção de enxofre elementar, de maneira a direcionar os sistemas de tratamento para recuperação de subprodutos e assim torná-los mais sustentáveis do ponto de vista ambiental e econômico

6 PERSPECTIVAS

O conhecimento construído através desta revisão bibliográfica poderá servir como base para a continuação do trabalho em um futuro projeto de pesquisa.

Considerando a potencial aplicabilidade das bactérias do ciclo do enxofre estudadas para o tratamento de efluentes que possuem compostos sulfurosos, é relevante aprofundar os estudos envolvidos no ciclo natural do enxofre, bem como na microbiologia e bioquímica dos microrganismos envolvidos nesse ciclo.

Além disso, conhecer a fisiologia das bactérias do ciclo do enxofre é fundamental para estabelecer condições de uso desses microrganismos em reatores em escala real.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. K. **Detecção de bactérias redutoras de sulfato em sedimento de mina de urânio**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais). Comissão Nacional de Energia Nuclear. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. 2005.

BALIEIRO, F. C. et al. A fumigação-extração na determinação do enxofre na biomassa microbiana do solo: revisão de literatura e estudo de caso. **Embrapa Solos**. Rio de Janeiro. 2007.

BARBOSA, L. P. **Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na biorremediação de efluentes ácidos contendo metais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto. 2009.

BERNI, M. D.; BAJAY, S. V. Geração de energia e a digestão anaeróbica no tratamento de efluentes: estudo de caso na indústria de papel. In **3º. Encontro de Energia no Meio Rural**, Campinas, São Paulo. 2003.

BORKENSTEIN, C. G.; FISCHER, U. Sulfide removal and elemental sulfur recycling from a sulfide-polluted medium by *Allochromatium vinosum* strain 21D. **International Microbiology**. 9, 253-258. 2006.

CORTÉS, O. E. J. **Avaliação técnica da utilização de H₂S no tratamento de efluentes líquidos ácidos contendo metais pesados**. Dissertação (Mestrado em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo). – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2005. 105 p.

DAR, S. A.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Approach to Determine the Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in Complex Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology** . 71, 2325- 2330. 2005.

GARCIA, G. P. P. **Caracterização dos Microrganismos Oxidadores de Sulfeto e Metano em Reator UASB**. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente, Saneamento e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

GILBERT, O. et al. Treatment of acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria using permeable reactive barriers: A review from laboratory to full-scale experiments. **Environmental Science & Bio/Technology**. 1: 327-333, 2002.

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bactriology**. Baltimore. 9 ed. 1994. ISBN 978-0-683-00603-2.

LENS, P.N.L.; KUENEN, J.G. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. **Water Science Technol** 44: 57–66. 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1129p. ISBN 9788536320939.

MAIER, R. M., PEPPER, I. L., GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2000. 598 p. ISBN 9780123705198.

MOCKAITIS, G. **Redução de sulfato em biorreator operado em batelada alimentada sequenciais contendo biomassa granulada com agitação mecânica e "Draft-Tube"**. 2008. 348p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2008.

MORPER, M.; FURST, P. Biological removal of heavy metals from printed circuit board and electroplating wastewaters in Metex process systems. **Linder Reports on Science and Technology**. v. 49, p. 40-42, 1991.

NAVAL, L. P. et al. Estudo do provável efeito inibitório do enxofre (sulfato e Sulfeto), em um reator UASB, tratando esgoto doméstico em Escala real. **XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. México, Cancún, 2002.

PATRÍCIO, I. C. **Caracterização bioquímica e molecular de bactérias redutoras de sulfato isoladas na RPPN do Caraça, MG**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto. 2009.

PÉREZ, H.; VILLA, P. Desulfuración biológica: Uma alternativa para el tratamiento de emisiones de gases a la atmosfera. **AIDIS**, v.5, n.3, p.22-27, 2004.

SAKURAI, H. et al. Inorganic sulfur oxidizing system in Green sulfur bacteria. **Photosynth Res.** 104, 163-176. 2010.

SANTANA, F. B. **Eliminação Autotrófica de Nitrogênio via Integração dos Ciclos do Nitrogênio e Enxofre em Reator SBR.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

SARTI, A. et al. Remoção de sulfato de águas residuárias industriais em reator anaeróbio de leito fixo operado em bateladas sequenciais. **Eng. Sanit. Ambient.** vol.13, nº1, pp. 15-22. 2008. ISSN 1413-4152.

SCHEEREN, P.J.H. et al, New biological treatment plant for heavy metal-contaminated groundwater. **Trans. Instn. Min. Metall.**, v. 110, p. 190-199, 1992.

SENA, H. C., PIVELI, R. P. Influência de altas concentrações de sulfato na remoção Carbonácea, nitrificação e digestão anaeróbia em estações de Tratamento de esgoto. **XXVIII Congresso Interamericano Ingenieria Sanitária y Ambiental.** Cancun. México. 2002.

SILVA, A.J., VARESCHE, M.B., ZAIAT, M. **Sulphate removal from industrial wastewater using a pack-bed anaerobic reactor.** *Process Biochem*, 927–935. 2002.

SILVA, A. J. **Biossulfatação com posterior oxidação parcial do sulfeto em reatores operados em bateladas sequenciais.** Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2005.

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, n.1, p.1-22. 2009.

VANNINI, C. et al. **Sulphide oxidation to elemental sulfur in a membrane bioreactor: performance and characterization of the selected microbial sulphur-oxidizing community.** *Systematic and Applied Microbiology*, 31 (6–8) pp. 461–473. 2008

von Sperling, M. **Introdução à qualidade da água e ao tratamento de esgotos.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais. 3. ed. 2005. 452p.

VOORDOUW, G. The Genus *Desulfovibrio*: The Centennial. **Applied and Environmental Microbiology**. Aug., p. 2813–2819, vol. 61, n°. 8. 1995.