

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

L.A. Bernardez<sup>1</sup>, C.L.S. Ramos<sup>1</sup>, L.R.P. de Andrade Lima<sup>2</sup>, P.F. Almeida<sup>1</sup>

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

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

### RESUMO

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

$$r_{SO_4^{2-}} = -10,9 \times 10^{-3} C_{SO_4^{2-}}^{1,1} \text{ e } r_{S^{2-}} = 3,0 \times 10^{-3} (60,0 - C_{S^{2-}})^{1,0}$$

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

## 1. INTRODUÇÃO

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

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



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

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

Como descrito na equação 1, durante o crescimento das bactérias redutoras de sulfato o pH aumenta devido a geração de íons do OH<sup>-</sup>. O potencial de oxidação e redução (redox) da solução aquosa diminui devido ao consumo de elétrons. A forma da curva de evolução temporal do potencial redox é característica do tipo de micro-organismo e geralmente as bactérias redutoras de sulfato podem crescer no meio de cultura na faixa de -100 a -500 mV (Eh). Mudando o pH os sulfetos dissolvidos podem ser encontrados como S<sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> ou H<sub>2</sub>S. Mudando o potencial redox da solução o sulfeto pode ser encontrado como SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, etc. O teste cinético apresentado neste estudo foi executado em uma temperatura de 32°C. A avaliação do efeito da temperatura na especiação do enxofre é importante para evitar ambigüidade nos resultados analíticos. Levando em consideração o equilíbrio iônico e o balanço de massa das espécies, assumindo que o sistema é diluído com força iônica nula, e usando a primeira (K<sub>1</sub>) e a segunda constantes da ionização (K<sub>2</sub>) do H<sub>2</sub>S para as temperaturas de 25 e 50°C os diagramas de especiação para o sulfeto foram calculados. No caso de uma temperatura de 25°C, as constantes de ionização são: K<sub>1</sub> = 10<sup>-7,045</sup> e K<sub>2</sub> = 10<sup>-14</sup> (g-mol/kg) (Millero, 1986). No caso de uma temperatura de 50°C, as constantes de ionização são: K<sub>1</sub> = 10<sup>-6,74</sup> e K<sub>2</sub> = 10<sup>-14</sup> (g-mol/kg) (Millero, 1986).

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

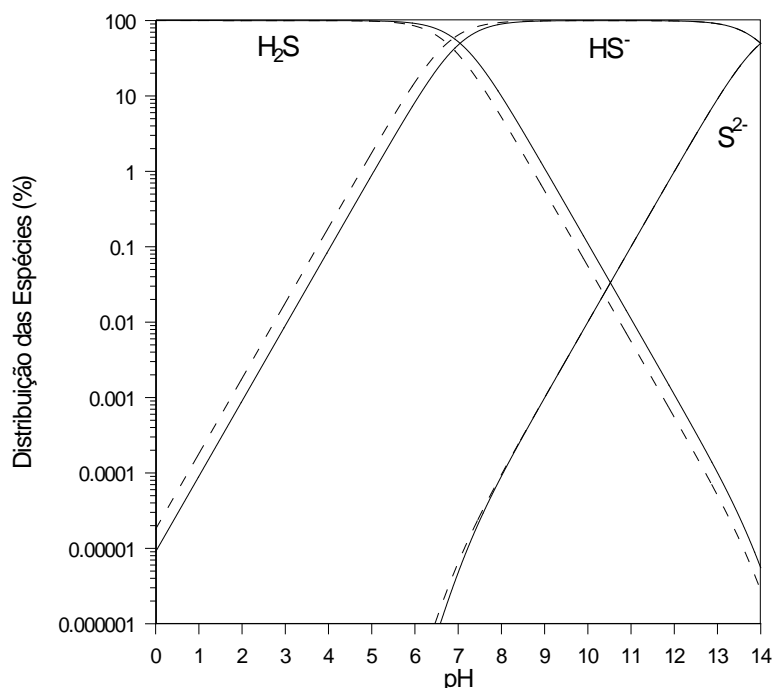


Figura 1: Diagrama de predominância das espécies em função do pH para sulfeto a 30 (linha contínua) e 50 °C (linha pontilhada)

A Figura 2 mostra o diagrama da predominância da espécie em função do potencial redox da solução e o pH para uma concentração inicial do sulfato de 1000 mg/l a 32°C. Observa-se que na faixa de pH entre 7,5 a 8,0 e ambiente redutor a espécie termodinamicamente predominante é  $HS^-$ .

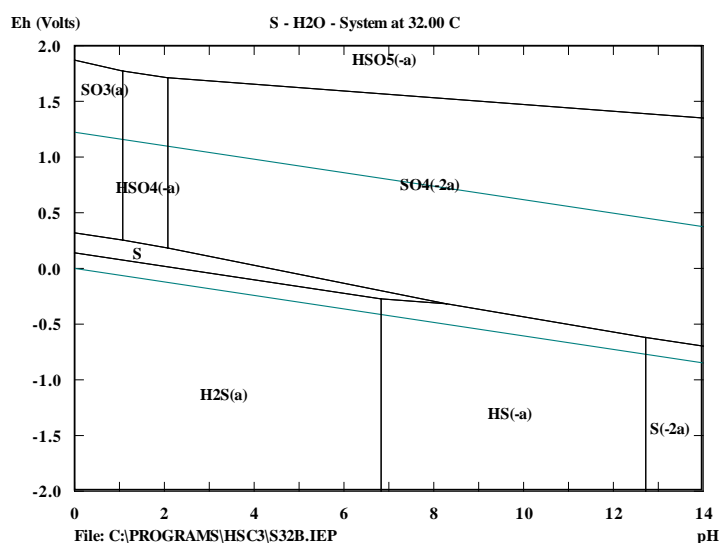


Figura 2: Diagrama Eh-pH para o sistema S-H<sub>2</sub>O a 32°C

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

## 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O biorreator de fluxo ascendente e leito fixo usado neste estudo foi feito com um cilindro graduado Pyrobras® de um litro (diâmetro 6 cm e altura 32 cm) com dez saídas laterais para amostragem em intervalos de 3,6 cm. Todas as saídas de amostragem foram fechadas durante o experimento usando septos do silicone. O biorreator foi preenchido com esferas de vidro de 3,0 milímetros de diâmetro para fornecer um suporte para o estabelecimento do biofilme. A porosidade do meio poroso foi de 40%. Depois de preenchido com o meio poroso o biorreator foi esterilizado em uma autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 121°C. A junção de vidro na parte superior do biorreator foi fechada com um selante de silicone para garantir que não haveria vazamentos de líquido ou de gás no biorreator. Tubos Tygon® foram usados para transferir o meio de cultura para a parte inferior do biorreator e para remover o efluente da parte superior deste. Para garantir um ambiente anaeróbico dentro do biorreator nitrogênio foi introduzido continuamente à parte inferior, com uma baixa vazão, antes e durante o carregamento do meio poroso. A Figura 3 mostra um diagrama da montagem experimental. O biorreator foi mantido a uma temperatura de 32°C usando uma caixa aquecida por uma lâmpada de 25 W e um controlador de tensão AC.

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

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

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

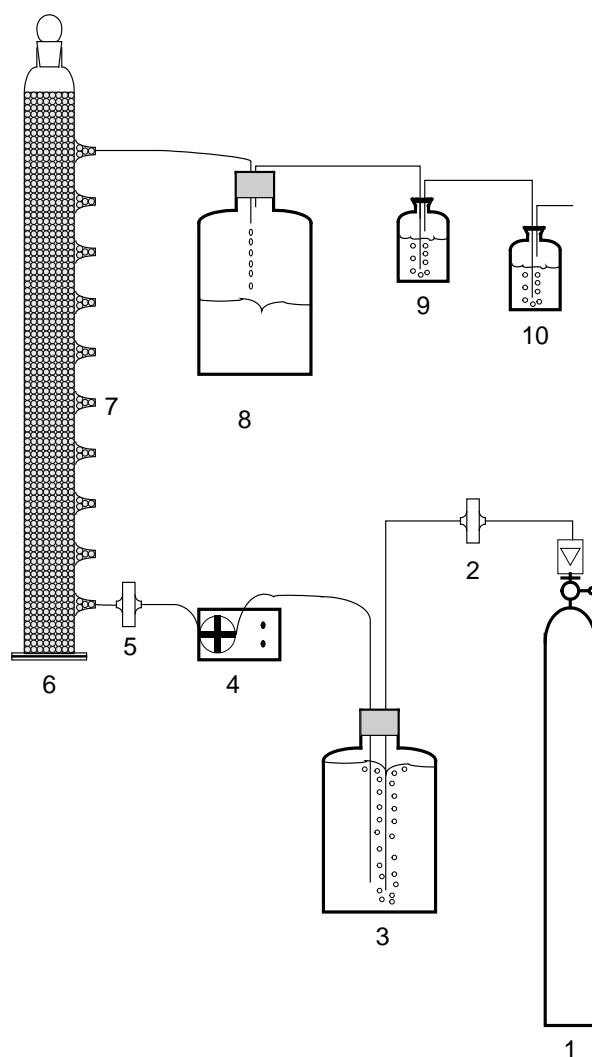


Figura 3: Diagrama esquemático da montagem experimental usada. Os números indicam: 1) Cilindro do nitrogênio, 2) porta-filtro, 3) recipiente do meio de cultura, 4) bomba peristáltica, 5) filtro, 6) biorreator de leito fixo, 7) pontos de amostragem, 8) recipiente de recepção, 9) primeiro recipiente de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

Uma cultura mista das BRS, que foi enriquecida a partir de água produzida em campos de petróleo da Bacia do Recôncavo, foi usada como inoculo. Dentro da câmara anaeróbica (Bactron VI, Shellab, Sheldon Manufacturing, Incorporation) a 38°C um volume do 100  $\mu$ L da cultura mista de BRS contendo cerca de  $2,0 \times 10^9$  NMP/mL foi inoculado e enriquecido em um meio de cultura padrão. O meio de Postgate modificado foi usado para o crescimento das BRS. O lactato do sódio foi usado como fonte de carbono e como potencial doador de elétron, pois suporta o crescimento de uma grande variedade de bactérias, apoiando uma diversidade microbiana. Neste meio a formação de um precipitado preto indica a formação de FeS.

A composição do meio de Postgate modificado contido em um litro: Ágar, 2,0 g (Difco);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g (Merk);  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,0g (suporte de J.T.);  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1,0 g (Merk);  $\text{CaCl}_2$ , 1,0 g (Vetec);  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , g 1,83 (Merk); fermento, 1,0 g (Merk); ácido ascórbico, 0,1 g (Merk); thioglycollate do sódio, 0,013 g (Vetec); citrato de sódio, 6,38 g (Synth); lactato do sódio 1,75 mL; NaCl (Quemis) 3,5%, resazurina, 2,0 mL (Vetec) 0,025% P/V,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g (Merk). Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e o pH foi ajustado para a faixa de 7,5 a 8,0 usando solução 5,0 M de HCl ou 0,1 M de NaOH. Após isto, a solução foi homogeneizada por agitação e esterilizada a 121°C por 30 minutos. Um meio de Postgate modificado, sem ágar, foi usado para permitir escoar a solução através do

biorreator. Este meio foi preparado em um frasco de dois litros, esterilizado por 30 minutos a 121°C, refrigerado à temperatura ambiente e em seguida purgado com nitrogênio por aproximadamente duas horas antes de usá-lo como uma alimentação para o biorreator. Para variar a concentração de sulfato no meio de cultura, a quantidade de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foi diminuída proporcionalmente. A concentração dos outros reagentes permaneceu inalterada. Para manter a condição anaeróbica durante a experiência e para impedir a contaminação do meio, nitrogênio foi injetado periodicamente.

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

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

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

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

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

Depois da inoculação das BRS e do período da incubação a atividade das bactérias e a produção de sulfetos iniciaram. Os perfis de concentrações do sulfato e do sulfeto em função do tempo são mostrados na Figura 4. A concentração de sulfato na solução diminui exponencialmente até aproximadamente 50 mg/l, e a concentração de sulfeto produzido aumentou alcançando um valor máximo igual a aproximadamente 50 mg/l. Ao longo da fase descontínua do experimento o pH do meio manteve-se relativamente constante em 7,5 e a conversão do sulfato chegou a cerca de 75% em um período de sete dias. Durante esta fase descontínua do experimento uma diminuição gradual no potencial redox da solução foi observada, como é mostrado na Figura 5.

Nota-se que as concentrações de sulfeto medidas representam apenas o íon S<sup>2-</sup> e não pode levar em consideração HS<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S e outras espécies gerados pelo equilíbrio iônico (ver Figuras 1 e 2). Isso explica o aparente desequilíbrio na massa de enxofre. Esta mesma observação foi

relatada em um estudo precedente (Baskaran and Nemati, 2006). Um valor do potencial redox igual a -313 mV é considerado o valor de maior eficiência para as BRS. Foi observado também que não houve precipitação de ZnS nos recipientes de proteção durante o experimento indicando que não houve formação de H<sub>2</sub>S.

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

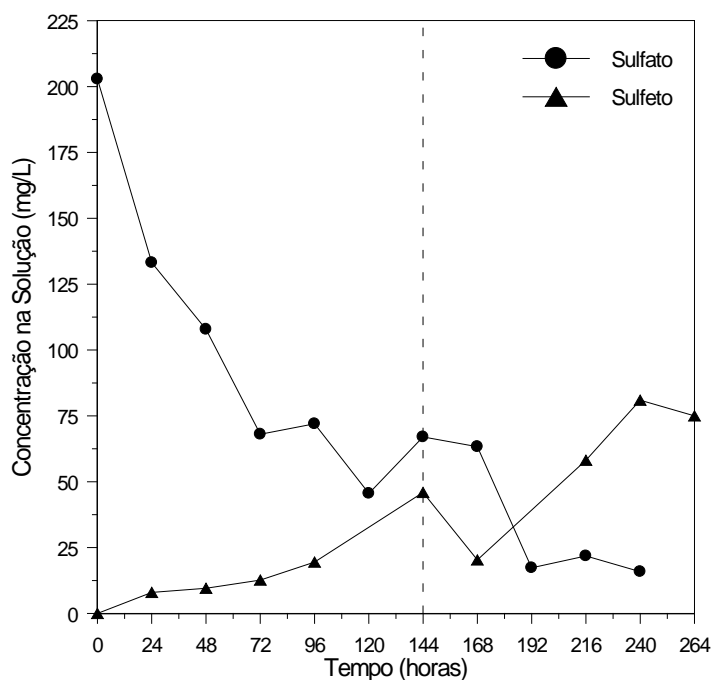


Figura 4: Evolução temporal das concentrações de sulfato e sulfeto em solução. A linha pontilhada indica o fim do regime descontínuo e o início da operação da bomba peristáltica.

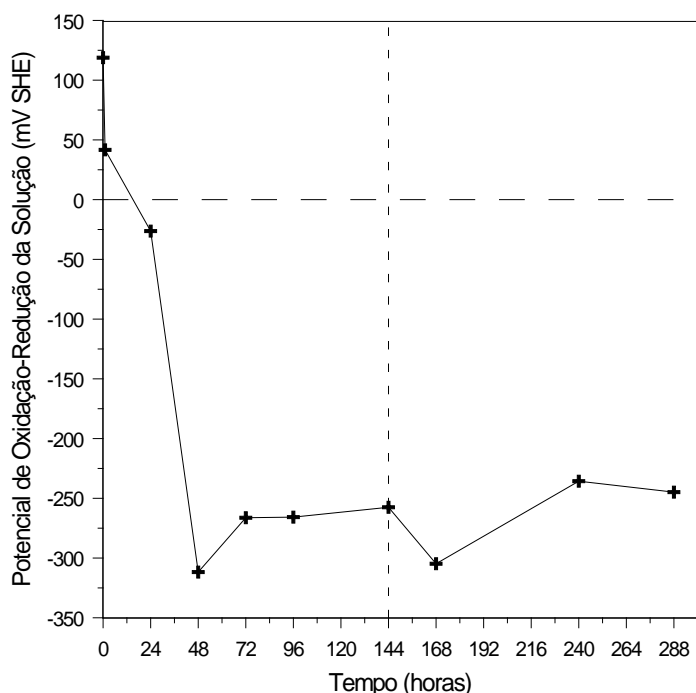


Figura 5: Evolução temporal do potencial redox da solução. A linha pontilhada indica o fim do regime descontínuo e o início da operação da bomba peristáltica.

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

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

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

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

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

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

As equações 2 e 4 foram integradas numericamente usando as condições iniciais dadas pelas equações 3 e 5 e o método de Runge-Kutta de quarta ordem. Os parâmetros cinéticos ( $k_{SO_4^{2-}}$ ,  $k_{S^{2-}}$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $C_{S^{2-},\infty}$ ) foram estimados através de um ajuste não linear usando o método dos mínimos



quadrados. A Figura 6 mostra os pontos experimentais e as curvas ajustadas para as concentrações de sulfato e sulfeto em solução.

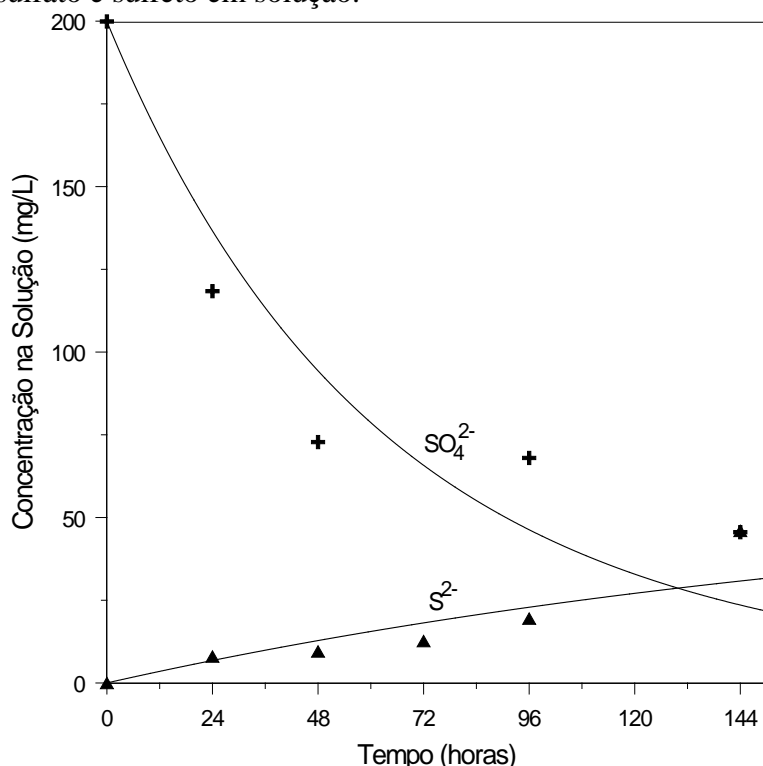


Figura 6: Ajuste do modelo cinético para a conversão do sulfato e sulfeto no regime descontínuo.

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

$$r_{SO_4^{2-}} = -10,9 \times 10^{-3} C_{SO_4^{2-}}^{1,1} \quad (\text{mg/L.h}) \quad (6)$$

$$r_{S^{2-}} = 3,0 \times 10^{-3} (60,0 - C_{S^{2-}})^{1,0} \quad (\text{mg/L.h}) \quad (7)$$

#### 4. CONCLUSÕES

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

#### 5. AGRADECIMENTOS

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

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baskaran, V., Nemati, M., Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir, *Biochem. Eng. J.*, 31, 148-159, 2006.
- Bernardez, L.A., de Andrade Lima, L.R.P., Almeida, P.F., The hydrodynamics of an upflow packed-bed bioreactor at low Reynolds number, *Braz. J. Pet. & Gas.*, 2, 114-121, 2008
- Elliott, P., Ragusa, S., Catcheside, D., Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage, *Water Res.*, 32, 3724-3730, 1998.
- Hammack, R.W., de Vegt, A.L., Schoeneman, A.L., The removal of sulfate and metals from mine waters using bacterial sulfate reduction: pilot plant results, *Mine Water Environ.*, 17(1), 8-27, 1998.
- Jong, T., Parry, D.L., Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in a bench scale upflow anaerobic packed bed reactor, *Water Res.*, 37, 3379-3389, 2003.
- Lenz, P., Vallero, M., Esposito, G., Zandvoort, M., Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 1, 311-325, 2002.
- Millero, F.J., The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide systems in natural waters. *Mar. Chem.*, 18, 121-147, 1986.
- Moosa, S., Harrison, S.T.L., Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage, *Hydrometallurgy*, 83, 214-222, 2006.
- Okabe, S., Nielsen, P.H., Characklis, W.G., Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 725-734, 1992.
- Okabe, S., Nielsen, P.H., Jones, W.L., Characklis, W.G., Sulfate product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures, *Water Res.*, 2, 571-578, 1995.