UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

KALLY ALVES DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA BIOGÊNESE DE SULFETO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO, BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E NITRATO

Rio de Janeiro – RJ
Outubro de 2009

KALLY ALVES DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA BIOGÊNESE DE SULFETO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO, BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E NITRATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadores:
Magali Christe Cammarota, D.Sc.
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc.

Rio de Janeiro – RJ
Outubro de 2009

KALLY ALVES DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA BIOGÊNESE DE SULFETO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE NITRATO, BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E NITRATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências

Banca Examinadora:

Rio de Janeiro, 02 de outubro de 2009

_____

Magali Christe Cammarota, D.Sc.
(orientadora e presidente da banca, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ/RJ)

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc.
(orientadora, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ/RJ)

_____

Maria Bernadete Amâncio Varesche, D.Sc.
(Universidade de São Paulo, USP/SP)

_____

Walter Barreiro Cravo Júnior, D.Sc.
(Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC/RJ)

_____

Eduardo da Silva Torres, D.Sc.
(Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, ANP)

_____

Francisca Pessôa de França, D.Sc.
(Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ/RJ)

_____

Juacyara Carbonelli Campos
(Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ/RJ)

Rio de Janeiro – RJ
Outubro de 2009

S725a Sousa, Kally Alves de.

Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato / Kally Alves de Sousa. -- 2009.
141 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2009.

Orientadores: Magali Christe Cammarota e Eliana Flávia Camporese Sérvulo.

1. Nitrato. 2. Bactérias Redutoras de Sulfato. 3. Bactérias Redutoras de Nitrato. 4. Produção Biogênica de Sulfeto – Teses.I. Cammarota, Magali Christe e Sérvulo, Eliana Flávia Camporese (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título.

CDD: 660.2844

Aos meus sobrinhos:
alegrias do "meu eu inconstante"

AGRADECIMENTOS

À Profª Magali Christie pelo constante apoio, orientações, dedicação e paciência ao longo deste trabalho.

À Profª Eliana Flávia, pelas orientações, pelo acolhimento e pelo constante apoio.

Aos amigos dos laboratórios E-107, E-109 e E-115: Douglas, Tatiana, Thaís, Patrícia, Cristiane, Mariana, Rayane, Diego, Fábio, Edgard, Fernanda, Teresa, Flávia, Camila, Jamille, Diogo, Aike, Rafael (Brinco), Rafael, João, Suzana, Leandro, Michael, Sandro, Daniela Rosa, Sandro, pelo apoio, amizade e inesquecíveis momentos de descontração.

Aos amigos que conheci no laboratório, mas que serão para a vida toda: Thiago, Ulrich, Verônica e João Felipe, por todo o incentivo, amizade e companheirismo.

Aos companheiros e amigos de república: Gra, Claudinha e Diego, sem vocês essa trajetória teria sido mais árdua e, claro à Iracema, pelo sempre acolhimento.

Aos técnicos e funcionários da EQ/UFRJ, em especial ao Paulinho pela constante ajuda durante todo o trabalho experimental.

Ao Laboratório Multi-Usuário de Microscopia Eletrônica (LABMIC) da COPPE/UFRJ, pela realização das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório Microscopia Eletrônica do CCS, em especial a Karen pela gentileza e imprescindível colaboração na preparação dos cupons para microscopia eletrônica;

À minha família, que mesmo longe, sempre se fez presente em todos os momentos.

À minha família “carioca”: Leila, Tião, Robson e Fernando.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Petrobras e ao Cenpes/Petrobras pelo fornecimento das águas produzidas e das culturas de BRS.

À todos que colaboram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

"Essa vida é uma mistura de algo puramente fantástico, calidamente ideal e, ao mesmo tempo, palidamente prosaico e comum, para não dizer vulgar até o inverossímil"

Fiódor Dostoiévski, Noites Brancas, 1848.

RESUMO

SOUSA, Kally Alves de. Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Neste trabalho avaliou-se o efeito da aplicação de nitrato na redução da produção biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato (BRN) e sulfato (BRS) em meio constituído de água produzida. Para tanto, empregaram-se um consórcio enriquecido de BRS isolado de campo de petróleo *offshore* e uma cultura pura de BRN (*Halomonas halodenitrificans*). Em ensaios preliminares, realizados com o intuito de se testar a sensibilidade do consórcio enriquecido de BRS e da cultura de BRN aos constituintes da água produzida, verificou-se que a água produzida, mesmo sem diluição, permitiu o crescimento de BRS e BRN. Um planejamento experimental completo 2^k com três pontos centrais verificou a influência das concentrações de BRS, BRN e nitrato na produção de sulfeto de hidrogênio. Os ensaios foram conduzidos a 30ºC, em meio constituído de água produzida (MAP) suplementada com sais essenciais e ácidos orgânicos de cadeia curta como fonte de carbono na seguinte concentração: ácido lático (60,8 g/L), ácido propiônico (50,0 g/L) e ácido butírico (44,6 g/L), sendo a produção de sulfeto medida no 7º, 14º e 28º dia de incubação. O planejamento experimental estabeleceu que as melhores condições para mitigação de sulfeto foram aquelas relacionadas aos pontos centrais, ou seja, concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e concentração inicial de nitrato de 427,5 mg/L em tempo inferior a 14 dias de processo. Esta condição foi reproduzida em um sistema agitado, constituído de um biorreator anaeróbio de volume útil de 1,1 L, operado em bateladas de 10 dias com meio MAP a 30ºC e 250 rpm sob diferentes condições. Os dados obtidos no sistema agitado confirmaram as constatações encontradas nos ensaios estáticos do planejamento experimental, ou seja, a ocorrência de uma relação direta entre as concentrações iniciais de micro-organismos e do íon nitrato disponível, seu modo de aplicação e tempo de permanência no sistema. Verificou-se que na presença de BRS e BRN e mediante aplicação única ou intermitente de 427,5 mg/L de nitrato, caso o sistema a ser tratado esteja sujeito à ocorrência de espécies de BRS que utilizem o nitrato como aceptor final de elétrons, a aplicação de nitrato pode apenas inibir a redução de sulfato e não a atividade das BRS, ocorrendo o aumento da produção de sulfeto após o esgotamento da fonte de nitrato. Os ensaios agitados comprovaram também a intensificação das taxas de corrosão em sistemas com uso intermitente de nitrato para mitigação de *souring*. Taxas de corrosão nos ensaios sem nitrato foram de 0,09 mm/ano, enquanto nos sistemas com nitrato foram de 0,38 mm/ano.

Palavras-chave: nitrato, bactérias redutoras de sulfato, bactérias redutoras de nitrato, produção biogênica de sulfeto

ABSTRACT

SOUSA, Kally Alves de. Evaluation of the biogenesis of sulfide under different concentrations of nitrate-reducing bacteria, sulfate-reducing bacteria and nitrate. Rio de Janeiro, 2009. Thesis (Ph.D. in Chemical and Biochemical Processes). School of Chemistry. Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

This work evaluated the effect of nitrate on the reduction of biogenic sulfide production under different initial concentrations of nitrate-reducing bacteria (NRB) and sulfate-reducing bacteria (SRB) in medium consisting of water produced. To this end, it used a SRB enriched consortium isolated from *offshore* oil field and a pure culture of NRB (*Halomonas halodenitrificans*). In preliminary tests, performed in order to test the sensitivity of the consortium enriched from SRB and culture NRB in constituents of the water produced, it was found that the water produced, even without dilution, allowed the growth of SRB and NRB. A complete experimental design 2^k with three centrals points assessed the influence of concentrations of SRB, NRB and nitrate in the production of hydrogen sulfide. The tests were carried out at 30 °C in medium consisting of water produced (MAP) supplemented with essential salts and organic acids short chain as a carbon source in the following proportion: lactic acid (60.8 g/L), propionic acid (50,0 g/L) and butyric acid (44.6 g/L), and the production of sulfide measured at 7, 14 and 28 days of incubation. The experimental design established that the best conditions for mitigation of sulphide were those related to central points, ie, initial concentrations of NRB and SRB 10^4 MPN/mL and initial concentration of nitrate of 427.5 mg/L in time less than 14 days of process. This condition was reproduced in a agitated system, consisting of an anaerobic bioreactor with 1.1 L working volume, operated in batches of 10 days with medium MAP at 30 ^oC and 250 rpm under different conditions. Data from the agitated system confirmed the findings found in the static testing of the experimental design, ie, the occurrence of a direct relationship between the initial concentrations of microorganisms and nitrate ions available, their mode of application and time spent in the system. It was found that the presence of SRB and NRB and single or intermittent addition of 427.5 mg/L nitrate, if the system being treated is subject to the occurrence of species of SRB using nitrate as final electron acceptor, the application of nitrate can only inhibit sulfate reduction and not the activity of SRB, the increase occurring in the production of sulfide after the exhaustion of the source of nitrate. The agitated tests also confirmed the intensification of corrosion rates in systems with intermittent use of nitrate for souring mitigation. Corrosion rates in tests without nitrate were 0.09 mm/year, while in systems with nitrate were 0.38 mm/year.

Keywords: nitrate, sulphate-reducing bacteria, nitrate-reducing bacteria, biogenic production of sulfide

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo..... 19

Figura 2.2 - Bioquímica da redução do sulfato. (a) Duas formas de sulfato ativo podem ser produzidas: adenosina 5'-fosfosulfato (AFS) e fosfoadenosina 5'–fosfosulfato (FAFS). (b) Esquema das reduções assimilativa e desassimilativa ou dissimilativa de sulfato..... 25

Figura 2.3 - Possível rota da redução desassimilativa do sulfato..... 26

Figura 2.4 - Mecanismo de Acidificação Biogênica (*Souring*) segundo o Modelo de Zona de Mistura..... 29

Figura 2.5 - Redução desassimilativa do nitrato (desnitrificação)..... 38

Figura 2.6 - Possível rota do transporte de elétrons durante a desnitrificação em *Pseudomonas stutzeri*..... 39

Figura 2.7 - Possível modelo para a interação simbiótica entre BRS e BRN-OS..... 42

Figura 3.1 - Biorreator anaeróbio de bancada utilizado nos experimentos..... 58

Figura 3.2: Disposição dos corpos-de-prova dentro do reator nos ensaios de biocorrosão..... 59

Quadro 3.1 - Condições operacionais dos experimentos em biorreator utilizando meio MAP..... 60

Figura 4.1 - Probabilidade normal dos resíduos para as respostas Y1(A), Y2(B) e Y3(C)..... 78

Figura 4.2 - Diagrama de Pareto para a resposta Y1 – 7 dias de incubação..... 79

Figura 4.3 - Gráfico das médias para a resposta Y1 – 7 dias de incubação..... 80

Figura 4.4 - Diagrama de Pareto para a resposta Y2 – 14 dias de incubação..... 82

Figura 4.5 - Gráfico das médias para a resposta Y2 – 14 dias de incubação..... 83

Figura 4.6 - Produção de sulfeto sob diferentes condições iniciais de BRS, BRN e nitrato a 7, 14 e 28 dias de incubação. A e B..... 85

Figura 4.6 - Produção de sulfeto sob diferentes condições iniciais de BRS, BRN e nitrato a 7, 14 e 28 dias de incubação. C e D..... 86

Figura 4.7 - Estimativa da variação das populações de BRS e BRN a 7 dias de incubação no planejamento experimental..... 88

Figura 4.8 - Consumos de nitrato e sulfato a 7 dias de incubação no planejamento experimental..... 88

Figura 4.9 - Produção de sulfeto e nitrito e os valores de potencial redox a 7 dias de incubação no planejamento experimental..... 89

Figura 4.10 - Estimativa das variações das populações de BRS e BRN a 14 dias de incubação no planejamento experimental..... 93

Figura 4.11 - Consumos de nitrato e sulfato a 14 dias de incubação no planejamento experimental..... 94

Figura 4.12 - Produção de nitrito e sulfeto e valores de potencial redox final a 14 dias de incubação no planejamento experimental..... 94

Figura 4.13 - Estimativa das variações das populações de BRS e BRN a 28 dias de incubação no planejamento experimental..... 97

Figura 4.14 - Consumos de nitrato e sulfato a 28 dias de incubação no planejamento experimental..... 97

Figura 4.15 - Produção de nitrito e sulfeto e valores de potencial redox a 28 dias de incubação no planejamento experimental..... 98

Figura 4.16 - Variação da concentração de BRS, sulfato e sulfeto total durante o ensaio Controle (batelada 1) - concentração inicial de BRS de 10^4 NMP/mL e ausência de BRN e nitrato..... 102

Figura 4.17 - Variação das concentrações de BRS, BRN, sulfato e sulfeto total durante a batelada 2 – concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeção única de 427,5 mg/L de nitrato..... 104

Figura 4.18 - Variação das concentrações de BRS, BRN, sulfato e sulfeto total durante a batelada 3 – concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeções intermitentes de nitrato..... 107

Figura 4.19 - Variação das concentrações diárias de sulfeto total, nitrato consumido e nitrito durante as bateladas 1 (A - concentração inicial de BRS de 10^4 NMP/mL e ausência de BRN e nitrato) e 2 (B - concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeção única de 427,5 mg/L de nitrato)..... 109

Figura 4.19 - Variação das concentrações diárias de sulfeto total, nitrato consumido e nitrito durante a batelada 3 (C - concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeções intermitentes de nitrato)..... 110

Figura 4.20 - Micrografia Eletrônica de Varredura dos biofilmes formados pela

exposição de cupons de aço carbono à água de produção na presença de BRS e ausência de nitrato e BRN (batelada 4 - Controle). (A) Aumento: 5000 X. (B) Aumento: 7000X. (C) Aumento: 7000 X. (D) Aumento: 7000 X..... 115

Figura 4.21 - Gráfico de EDS dos produtos de corrosão formados sobre os corpos de prova expostos à água de produção na presença de BRS e ausência de nitrato e BRN (batelada 4- Controle)..... 115

Figura 4.22 - Micrografia Eletrônica de Varredura dos biofilmes formados pela exposição de cupons de aço carbono à água de produção na presença de BRS e BRN e de injeções intermitentes de nitrato (batelada 5) (A) Aumento: 3000 X. (B) Aumento: 8000X. (C) Aumento: 2000 X. (D) Aumento: 7000 X..... 116

Figura 4.23 - Gráfico de EDS dos produtos de corrosão formados sobre os corpos de prova expostos à água de produção presença de BRS e BRN e de injeções intermitentes de nitrato (batelada 5)..... 117

Figura 4.24 - Corpos de prova utilizados nos ensaios de perda de massa na batelada 4. (A) visão dos corpos de prova antes do ensaio; (B) visão dos corpos de prova ao final do ensaio..... 118

Figura 4.25 - Corpos de prova utilizados nos ensaios de perda de massa na batelada 5. (A) visão dos corpos de prova antes do ensaio; (B) visão dos corpos de prova ao final do ensaio..... 118

Figuras 4.26 - Superfície dos corpos de prova antes de serem submetidos às condições da batelada 4 (A) (Aumento 50 X) e da batelada 5 (B) (Aumento 50 X)..... 120

Figura 4.27 - Superfícies metálicas de duas áreas distintas (A e B), dos corpos de prova após os ensaios de avaliação da corrosão por pite na batelada 4 (Aumento de 200 X)..... 120

Figura 4.28 - Imagem representativa do corte transversal de um pite..... 121

Figuras 4.29 - Superfícies metálicas, de duas áreas distintas (A e B), dos corpos de prova após os ensaios de avaliação da corrosão por pites na batelada 5 (Aumento de 200 X - A) e (Aumento de 100 X - B)..... 121

LISTAS DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição do Meio Constituído de Água Produzida (MAP)..... 49

Tabela 3.2 - Composição do Meio Postgate E Modificado para BRS..... 50

Tabela 3.3 - Composição do Meio 1 DSMZ para Manutenção de BRN..... 51

Tabela 3.4 - Composição Química do Meio para Quantificação de BRN..... 51

Tabela 3.5 - Composição dos Meios para os Testes de Sensibilidade do Consórcio Enriquecido de BRS..... 53

Tabela 3.6 - Composição Química dos Meios para os Testes de Sensibilidade da BRN..... 54

Tabela 3.7 - Especificação, Níveis e Respectivos Valores das Variáveis do Processo..... 55

Tabela 3.8 - Matriz do Planejamento com Valores Reais e Codificados das Variáveis..... 56

Tabela 3.9 - Composição Química da Solução Salina Redutora 68

Tabela 3.10 - Classificação da taxa de corrosão do aço carbono..... 70

Tabela 4.1 - Caracterização físico-química da água produzida..... 72

Tabela 4.2 - Testes de sensibilidade do consórcio enriquecido de BRS à água produzida..... 73

Tabela 4.3 - Testes de sensibilidade da cultura de BRN à água produzida..... 74

Tabela 4.4 - Resultados do planejamento experimental aos 7, 14 e 28 dias de incubação para a produção de sulfeto (mg/L)..... 75

Tabela 4.5 - Coeficientes de regressão para as respostas Y1, Y2 e Y3..... 76

Tabela 4.6 - Análise da variância para as respostas Y1, Y2 e Y3..... 77

Tabela 4.7 - Variáveis relacionadas à biocorrosão medidas nos corpos de prova após 10 dias de exposição..... 113

SUMÁRIO

RESUMO..... vi
ABSTRACT..... vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... viii
LISTA DE TABELAS..... xi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... 14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 18
2.1. Recuperação Secundária do Petróleo e o Desenvolvimento de *Souring*..... 18
2.2. Mecanismos de Acidificação de Reservatórios de Petróleo..... 21
2.2.1. Acidificação biogênica (*souring*)..... 22
2.2.2. Caracterização e metabolismo de BRS..... 23
2.2.3. Modelos de previsão de *souring*..... 28
2.2.4. Mecanismos de controle e prevenção do *souring*..... 31
2.3. O Uso do Nitrato como Tecnologia Alternativa para Controle de *Souring*..... 35
2.3.1. Caracterização e metabolismo de BRN..... 37
2.3.2. A injeção de nitrato e os principais mecanismos envolvidos..... 40
2.3.2.1.Competição entre BRN e BRS por fontes de carbono..... 40
2.3.2.2.Oxidação biológica do sulfeto por ação de BRN-OS..... 41
2.3.2.3.Inibição das BRS pelo aumento do potencial redox do meio..... 43
2.3.2.4. Substituição do aceptor final de elétrons por BRS..... 44
2.3.3. Dosagens recomendadas de nitrato para mitigação de H_2S em reservatórios..... 45
2.3.4. Limitações do uso de nitrato para controle de *souring*..... 46
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL..... 48
3.1. Culturas Microbianas..... 48
3.2. Meios de Cultura..... 48
3.2.1. Meio constituído de água produzida (MAP)..... 48
3.2.2. Meio de cultura para BRS..... 49
3.2.3. Meio de cultura para BRN..... 50
3.3. Coleta e Caracterização Físico-Química da Água Produzida..... 51
3.4. Testes de Sensibilidade das Culturas Microbianas à Água Produzida..... 52
3.4.1. Sensibilização do consórcio enriquecido de BRS..... 52

3.4.2. Sensibilização da cultura de BRN..... 53
3.5. Planejamento Experimental..... 54
3.5.1. Avaliação da produção de sulfeto..... 56
3.5.2. O efeito de outros parâmetros na produção de sulfeto..... 57
3.6. Efeito do Nitrato em Sistema Agitado..... 57
3.7. Procedimentos Analíticos..... 61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 72
4.1. Caracterização Físico-Química da Água Produzida Utilizada no Estudo..... 72
4.2. Sensibilização das Culturas Microbianas à Água Produzida..... 73
4.2.1. Cultura de BRS..... 73
4.2.2. Cultura de BRN..... 74
4.3. Planejamento Experimental..... 74
4.3.1. Produção biogênica de sulfeto: tratamento estatístico dos dados..... 74
4.3.2. O estudo da influência de outros parâmetros na produção biogênica de sulfeto..... 87
4.4. Produção de Sulfeto em Sistema Agitado..... 101
4.4.1. Atividade de BRS planctônicas e geração de sulfeto na ausência de nitrato – ensaio Controle..... 101
4.4.2. Atividade de BRS e geração de sulfeto na presença de BRN mediante uma única injeção de nitrato..... 103
4.4.3. Atividade de BRS e geração de sulfeto na presença de BRN mediante injeções intermitentes de nitrato..... 106
4.4.4. Avaliação comparativa da biogênese de sulfeto..... 108
4.4.5. Avaliação da biocorrosão em aço carbono em sistema submetido ao tratamento com nitrato..... 112
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... 123
5.1. Conclusões..... 123
5.2. Sugestões..... 124
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 125
7. ANEXOS..... 140

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A recuperação primária do petróleo, basicamente, diz respeito ao deslocamento do mesmo para fora do reservatório, seja pela pressão interna de gases, seja pelo uso de equipamentos que promovam sua elevação artificial. A baixa eficiência de extração pelos métodos de recuperação primária, que recuperam no máximo 30% do óleo contido no reservatório, acabou tornando-se fator importante para mitigar a pouca disponibilidade de petróleo no mercado (DAVIDOVA et al., 2001).

Sendo assim, em função da depleção dos reservatórios, técnicas especiais para a otimização da recuperação primária são necessárias. Essas técnicas são denominadas de recuperação secundária e terciária. Na recuperação secundária do petróleo, os principais métodos são a injeção de água ou gás e a reinjeção de água produzida, em poços adjacentes aos produtores. Já a terciária emprega metodologias mais avançadas para a recuperação de reservatórios que não respondem bem às técnicas primárias e secundárias. Os procedimentos terciários de recuperação de petróleo incluem processos químicos, térmicos e de deslocamento miscível de fluidos, sendo utilizados quando a alta viscosidade do óleo no reservatório ou elevadas tensões interfaciais entre o fluido injetado e óleo não permitem satisfatória recuperação pelos processos primários e secundários (VIEIRA, 2003).

Os campos marítimos, denominados *offshore*, fazem uso de água do mar para a recuperação secundária de óleo, devido a sua disponibilidade, ou da reinjeção de água produzida para manter a pressão do reservatório (BØDTKER et al., 2009; HUBERT et al., 2003). No entanto, esses fluidos injetores apresentam concentração de sulfato em torno de 3.000 mg/L e representam um problema para a indústria petrolífera, devido a acidificação dos reservatórios (*souring*) e o desenvolvimento da biocorrosão.

Tais processos se iniciam a partir da redução de sulfato a sulfeto por bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ambientes anaeróbios. O sulfeto é uma forma de enxofre energeticamente estável e, sob condições anaeróbias, é altamente reativo, corrosivo e tóxico

(MOHAN et al., 2005; COLLERAN; FINNEGAN; LENS, 1995). Por isso, a biogênese de gás sulfidrico causa efeitos adversos à saúde e problemas operacionais.

A acidificação de reservatórios associada à injeção de água do mar ou à reinjeção de água produzida pode resultar não só em corrosão, como também na obstrução dos poços injetores e produtores pela deposição de FeS, na redução da produtividade dos poços e na contaminação do petróleo produzido. A possibilidade de ocorrência de todos esses problemas impulsionou estudos sobre possíveis soluções para os mesmos (LYSNES et al., 2009; KASTER et al., 2007, REMPEL; EVITTS; NEMATI, 2006).

A inibição das BRS por molibdato e outros inibidores é uma possibilidade, que na maioria dos casos não é aplicável em maior escala devido ao alto custo (LENS et al., 1995). A aplicação de biocidas tem sido a forma de controle mais adotada, embora nem sempre satisfatória, quer pelo elevado custo de aplicação quer pela baixa eficiência alcançada. A seleção de estratégias como a nanofiltração para dessulfatação do fluido injetor e a esterilização com radiação ultravioleta também esbarram em altos custos de implantação e na inviabilidade de aplicação em grande escala (ENERGY INSTITUTE, 2003).

Uma alternativa promissora que vem sendo cada vez mais explorada no controle da atividade de BRS e, conseqüentemente, na redução da produção de H_2S, tem sido a aplicação de nitrato. O seu uso em substituição aos biocidas normalmente empregados representa redução nos custos de aplicação e redução de agressões ao ambiente. O uso de nitrato para a redução ou eliminação da produção de H_2S é ainda pouco explorado na literatura cientifica especializada. No entanto, tal estratégia de controle da produção de H_2S vem sendo avaliada em sistemas de injeção para a recuperação de petróleo em reservatórios maduros por grandes empresas petrolíferas, especialmente na Noruega e Canadá (B∅DTKER et al., 2009; B∅DTKER et al., 2008; DINNING et al., 2005; DUNSMORE et al., 2004).

A aplicação de nitrato favorece a atividade de bactérias redutoras de nitrato (BRN), pois a redução do nitrato concede aos micro-organismos ganho energético consideravelmente maior do que a redução do sulfato. Assim, a presença de nitrato estimula o crescimento de BRN, que em número maior podem competir mais intensamente por fontes de carbono, dificultando o crescimento das BRS. Algumas espécies de BRN também são capazes de oxidar sulfetos (BRN-OS), o que resulta na remoção de sulfeto do ambiente e no aumento do potencial redox, inibindo ainda mais o crescimento das BRS. Existem também BRS capazes

de utilizar o nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons, o que favorece a redução de sulfeto (VOORDOUW, 2008; HUBERT; VOORDOUW, 2007; GARCIA-DE-LOMAS et al., 2007; GREENE et al., 2003; ENERGY INSTITUTE, 2003).

Não há dúvidas quanto a efetiva ação do nitrato na inibição seletiva de BRS e, principalmente, no controle da produção do sulfeto biogênico. Adicionalmente, seu uso é mais vantajoso do que o tratamento com biocidas, convencionalmente adotado. Entretanto, o tratamento com nitrato está condicionado ao custo, em especial ao modo de aplicação, uma vez que dependendo do sistema a ser tratado poderá ser necessária a adição de sais de fósforo ou potássio e/ou biomassa exógena a fim de garantir a eficácia do processo biológico. O tratamento com nitrato também vai depender se as células no sistema estão na forma planctônica ou séssil já que no segundo caso as células encontram-se imersas em uma matriz exopolimérica, dificultando a difusão de nutrientes e biocidas (BEER; STOODLEY, 2006; SCHWERMER et al., 2008; LENS et al., 1995).

Ademais, há que se considerar que o nitrato, e os intermediários de sua redução, particularmente o nitrito, são agentes que podem propiciar a corrosão de metais existentes nos sistemas. Na verdade, o efeito do tratamento com nitrato ainda não foi devidamente estabelecido, sendo que a atividade microbiana específica e as características do sistema a ser tratado deverão ser estudadas caso a caso (B∅DTKER et al., 2008).

Em resumo, o *souring* e os problemas de biocorrosão associados ao crescimento de BRS constituem uma problemática para as indústrias petrolíferas. Por isso, a produção intensiva de gás sulfídrico em reservatórios de petróleo tem incentivado a investigação científica. Uma estratégia de controle vem a ser o emprego de nitrato para estimular o desenvolvimento de BRN e inibir a ação das BRS. No entanto, esta prática ainda é incipiente na indústria petrolífera, com o agravante de que nas indústrias que aplicam a tecnologia não há preocupação com os subprodutos ou metabólitos gerados pelos micro-organismos atuantes e seus efeitos a longo prazo. Por exemplo, se no reservatório se estabelecer um consórcio microbiano com espécies de BRS capazes de utilizar nitrato como aceptor final de elétrons, esta população continuará crescendo. E, por um imprevisto qualquer, ao se suprimir a injeção de nitrato no reservatório, haverá um aumento considerável da produção de gás sulfídrico.

Assim sendo, o presente estudo teve como meta oferecer subsídios para o controle dos danos microbiológicos (*souring*) em reservatórios de petróleo, apresentando um referencial

teórico e metodológico dos procedimentos de aplicação de nitrato em sistemas anaeróbios para a mitigação do sulfeto gerado. Para tal, o objetivo principal foi avaliar a biocompetição entre um consórcio microbiano enriquecido de BRS e uma cultura pura de BRN, ambos mesófilos, em água produzida sob diferentes condições ambientais. Assim, delimitaram-se como objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento do consórcio microbiano enriquecido de BRS e da cultura pura de BRN, ambos mesófilos, em meio constituído de água produzida;

- Analisar a biogênese de sulfeto, através de planejamento experimental, em meio constituído de água produzida na presença de diferentes concentrações de BRS, BRN e nitrato de sódio sob condição de mesofilia a intervalos de 7, 14 e 28 dias;

- Avaliar o comportamento das populações planctônicas e sésseis de BRS e BRN em um biorreator anaeróbio mediante condição de tratamento com nitrato de sódio, previamente estabelecida no planejamento experimental;

- Analisar os efeitos corrosivos associados ao tratamento com nitrato de sódio em um biorreator anaeróbio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Recuperação Secundária do Petróleo e o Desenvolvimento de *Souring*

A recuperação secundária representa um recurso para a otimização da extração do petróleo, aplicável quando a energia estocada no reservatório é gasta. Em campos de petróleo marítimos (*offshore)*, o principal método de recuperação secundária é a injeção de água do mar para aumentar a pressão interna do reservatório e deslocar o óleo existente no poço de injeção em direção aos poços produtores, como apresentado na Figura 2.1.

A escolha da água do mar, em campos *offshore*, se deve à sua disponibilidade. No entanto, esta escolha pode afetar a qualidade do petróleo produzido, além de conferir um sério risco às atividades operacionais da plataforma. A concentração de sulfato (SO_4^{2-}) presente na água do mar, cerca de 3000 mg/L, estimula a atividade de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que reduzem o sulfato a sulfeto (S^{2-}).

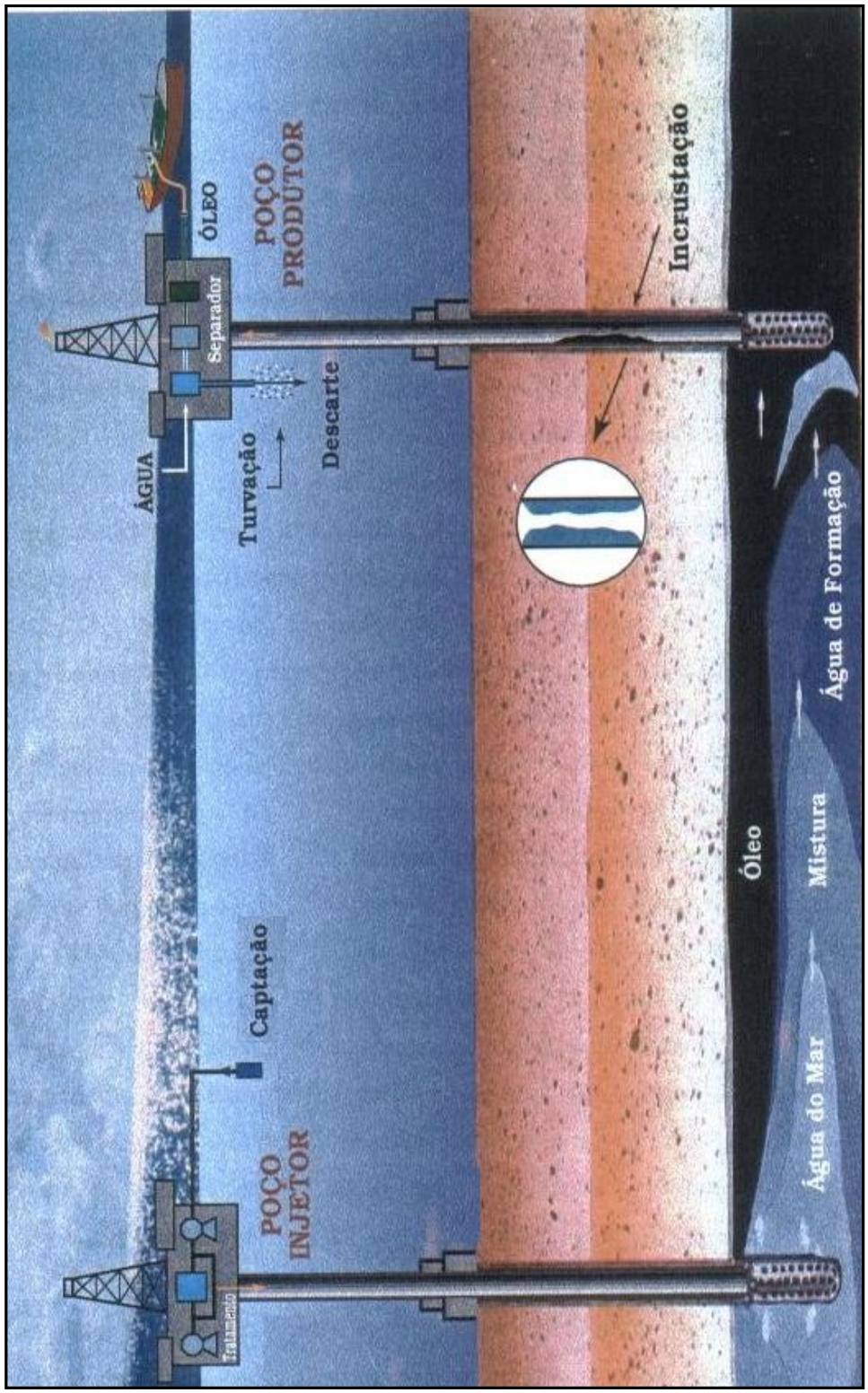


Figura 2. 1:. Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo
Fonte: Oliveira (1997) apud Vieira (2003)

Adicionalmente, a injeção de água do mar nos reservatórios também promove simultaneamente a redução da salinidade e da temperatura da água de formação, o que pode contribuir para o crescimento microbiano (DUNSMORE; EVANS, 2005).

Penna; Oliveira; Silva (2003) reafirmam as considerações anteriores e acrescentam que a água do mar utilizada em processos de recuperação secundária de petróleo em campos *offshore*, em geral, contém BRS adaptadas a um ambiente relativamente superficial (temperaturas em torno de 20ºC), de pressão moderada. Quando introduzidas no reservatório, as BRS passam a enfrentar consideráveis elevações de temperatura e pressão. No entanto, a injeção de água do mar fria e desaerada promove uma redução da temperatura do reservatório na região do poço injetor, estabelecendo condições de potencial redox (abaixo de –100 mV) e pH (6,0 – 9,0) adequadas à atividade de BRS, além do aumento da disponibilidade de sulfato. A inundação do reservatório com água do mar também promove um aumento da zona de mistura com a água de formação, o que assegura condições ideais de crescimento em termos de fontes de carbono devido à presença de hidrocarbonetos.

O sulfeto gerado pela atividade microbiana durante a produção do petróleo constitui um importante problema para as indústrias petrolíferas devido ao desenvolvimento da acidificação biogênica, também denominada de *souring*. A acidificação biogênica implica em aumento da biocorrosão; redução da qualidade dos hidrocarbonetos produzidos; redução da produtividade dos poços pela geração de incrustantes como FeS (*biofouling*) e riscos ambientais devido à toxicidade do sulfeto (TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009; MAXWELL; SPARK, 2005; FAUQHAR, 1997).

Vale ressaltar que em alguns campos *offshore* é comum a reinjeção da água produzida durante o processo de produção de petróleo. A reutilização da água produzida é justificada como alternativa de manejo, uma vez que sua disposição sem tratamento prévio acarreta sérios danos ambientais. Em regiões nas quais a legislação ambiental é mais restritiva, como nos campos do Mar do Norte, este procedimento é adotado. Embora a reinjeção represente uma alternativa ambientalmente correta, a sua reutilização como fluido injetor pode intensificar o *souring*, pois a água produzida constitui fonte de nutrientes para o desenvolvimento de BRS, além de reintroduzir micro-organismos já adaptados às condições do reservatório (DINNING et al., 2005; VOORDOUW; JACK, 2005; DINNING et al., 2004; JENNEMAN et al., 2004; ROBINSON, 2003; HSI et al., 1994).

O risco de intensificação de *souring* em decorrência da associação, durante o processo de recuperação secundária do petróleo, da água do mar e da água produzida foi investigado por Lyses et al. (2009) e por Dunsmore e Evans (2005). Os autores descrevem que este procedimento, praticado em alguns campos do Mar do Norte, potencializa o processo de acidificação, uma vez que converge para elevados valores de concentração de sulfato e BRS, e valores ótimos de salinidade, concentração de ácidos graxos voláteis e temperatura para a atividade microbiana.

As próximas seções descrevem os mecanismos que governam o surgimento de *souring* em reservatórios de petróleo e sua relação com o metabolismo de BRS, bem como os modelos atuais de previsão de *souring*.

2.2. Mecanismos de Acidificação de Reservatórios de Petróleo

A acidificação de reservatórios de petróleo tem sido atribuída a vários mecanismos, bióticos e abióticos, dentre os quais se destacam, segundo Fauqhar (1997): 1) a dissolução de materiais piríticos; 2) a redução termoquímica do sulfato; 3) a oxidação termoquímica de compostos orgânicos de enxofre; 4) reações de oxi-redução com bissulfito de amônia (sequestrante de H_2S presente em alguns sistemas); e, por fim, 5) a geração microbiológica de sulfeto. O autor destaca ainda que a geração de sulfeto por ação microbiana seria a principal responsável pela formação de *souring*, como comprovam estudos realizados no Mar do Norte.

As considerações a seguir, retiradas de Fauqhar (1997), sustentam a afirmação anterior e descartam os mecanismos abióticos de formação de *souring*:

1) Normalmente, a quantidade de pirita é mínima na rocha do reservatório;

2) Para que ocorra redução termoquímica do sulfato são necessárias temperaturas na faixa de 80ºC a 120ºC, mesmo na presença de catalisadores. Campos de petróleo do Mar do Norte, por exemplo, apresentam temperaturas inferiores a essa faixa;

3) A oxidação termoquímica de compostos orgânicos de enxofre ocorre a temperaturas superiores ou iguais a 80ºC. Outro fator limitante seria a quantidade desses compostos no reservatório, pois é necessária uma quantidade mínima para que ocorra a conversão a H_2S;

4) Os níveis residuais de bissulfito de amônia presentes no sistema não são capazes de contribuir significativamente para a formação de H_2S.

O mecanismo microbiológico de geração de H_2S, como dito anteriormente, é o que melhor explica o fenômeno. Este mecanismo baseia-se no consumo de íons sulfato através de metabolismo desassimilativo de bactérias redutoras de sulfato (BRS). A seguir é apresentada a descrição da dinâmica do processo.

2.2.1. Acidificação biogênica (*souring*)

O principal mecanismo de produção de H_2S em reservatórios de petróleo a temperaturas abaixo de 80ºC está vinculado ao metabolismo de BRS, uma vez que a própria condição do reservatório oferece ambiente favorável para o desenvolvimento desses micro-organismos. Alia-se à condição do reservatório, a introdução inadvertida de íons sulfato, através da injeção de água do mar durante operações de recuperação secundária de petróleo, os quais servem como aceptores finais de elétrons para as BRS (HUBERT et al., 2003; DAVIDOVA et al., 2001; MCINERNEY; BHUPATHIRAJU; SUBLETTE, 1992).

Para Farquhar (1997), as hipóteses para explicar a acidificação biogênica de reservatórios estão relacionadas com a injeção de água do mar e sua interface com a água de formação, em conjunto com a presença de uma população de BRS, nutrientes e condições físicas na rocha do reservatório que promoveriam a máxima redução de sulfato.

Segundo Kane e Surinach (1997) apud Nascimento (2006), como conseqüências do desenvolvimento de *souring* em reservatórios, destacam-se: a) a redução da qualidade do petróleo produzido e, conseqüente, aumento dos custos com refino; b) a redução da produtividade dos poços; c) a obstrução dos poços injetores e produtores pela geração de FeS; d) a necessidade do uso de produtos químicos para a redução de H_2S até níveis aceitáveis; e) geração de incrustantes como o sulfeto de ferro, levando ao plugueamento de poços; f) o aumento das taxas de corrosão pelo mecanismo de despolarização catódica; g) problemas associados à segurança e meio ambiente e h) paralisação da produção de óleo devido a um ou mais dos fatores anteriormente enumerados.

Os problemas acima mencionados justificam a implementação de formas de controle do processo de acidificação em reservatórios de petróleo. Agências como a EPA

(Environmental Protection Agency) e API (American Petroleum Institute) determinam, através de regulamentações, cargas mássicas diárias de H_2S nos fluidos (NASCIMENTO, 2006). A NACE (National Association Corrosion) estipula em 0,05 psi a pressão parcial máxima de H_2S nos fluidos exportados (KHATIB; SALANITRO, 1997). Os riscos associados a toxicidade do sulfeto de hidrogênio são avaliados através de limites de exposição TWA (Time Weighted Average), ou seja, para uma exposição diária de 8 horas, a média ponderada no tempo não deve ultrapassar 10 mg/L (ROCHA, 2006).

2.2.2. Caracterização e metabolismo de BRS

As BRS representam um grupo de micro-organismos capazes de utilizar o sulfato, em condições anaeróbias, como aceptor final de elétrons para o processo de respiração anaeróbia. Em culturas puras, desenvolvem-se em ambientes em que o potencial de oxi-redução (E_h) esteja abaixo de –100 mV. Como doadores de elétrons, utilizam quase todos os compostos orgânicos, desde ácidos orgânicos de cadeia curta até hidrocarbonetos do petróleo, embora algumas espécies também sejam capazes de utilizar H_2 (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; BARTON; TOMEI, 1995; POSTGATE, 1984).

Taxonomicamente, por um longo período, foram divididas em dois grandes gêneros: *Desulfovibrio* e *Desulfomaculum*, mas novos gêneros vêm sendo identificados (*Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desufolbulbus*, *Desulfuromonas*, *Desulfosarcina*, *Desulfomicrobium*, *Thermodesulfobacterium*). Estes gêneros incluem representantes terrestres e aquáticos, com espécies halofílicas que chegam a tolerar salinidades superiores a 18% (FAUQUE, 2005).

Destacam-se, assim, representantes isolados em reservatórios de petróleo, como por exemplo: *Desulfovibrio bastinii* (SRL4225 = DSM 16055 = ATCC BAA-903) e *Desulfovibrio gracilis* (SRL6146 = DSM 16080 = ATCC BAA-904), isolados de um campo de petróleo no Congo (MAGOT et al., 2004); *Desulfovibrio capillatus* (MET2 = DSM 14982 = CIP107483), isolado de um reservatório no Golfo do México (MIRANDA-TELLO et al., 2003a) e *Desulfovibrio vietnamensis* (DSM 10520), isolado em fluidos de produção de campos *offshore* no Vietnã (NGA et al., 1996).

Quanto à temperatura, a maioria das BRS é classificada como mesófila, com um ótimo de crescimento entre 25 e 40ºC, mas algumas espécies podem tolerar até –5ºC (psicrofílicas), enquanto outras podem apresentar crescimento ótimo em temperaturas superiores a 75ºC (hipertermofílicas). Com relação aos valores de pH, crescem em valor ótimo de 7,2; entretanto, encontram-se espécies que toleram ambientes altamente ácidos (pH 4,0) e alcalinos (pH 9,5). Deve-se destacar ainda a capacidade das BRS suportarem altas pressões, como valores em torno de 10^5 kPa (espécies barofílicas). Todas essas características demonstram a habilidade desse grupo de micro-organismos para crescer em condições extremas e sua adaptabilidade a vários ambientes naturais (POSTGATE, 1984; BARTON; TOMEI 1995).

Tratando-se de metabolismo, vários compostos inorgânicos sulfurados constituem importantes aceptores de elétrons para as BRS. Mais de 20 gêneros são conhecidos coletivamente pela capacidade de reduzir sulfato ou compostos reduzidos de enxofre (como por exemplo, sulfito e tiossulfato) e podem ser divididos em dois grandes grupos: Grupo 1 - BRS que utilizam o lactato, piruvato, etanol e determinados ácidos graxos como doadores de elétrons, sendo o produto final da oxidação o acetato, onde se destacam os gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobotulus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Thermodesulfobacterium*; e Grupo 2 - BRS que oxidam ácidos graxos, particularmente o acetato, na redução do sulfato a sulfeto, sendo destacados os representantes dos gêneros *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococus*, *Desulfonema* e *Desulfosarcina*. A principal diferença entre esses grupos se baseia na capacidade dos indivíduos do Grupo 2 em oxidar completamente ácidos graxos, lactato, succinato e benzoato até CO_2 (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Embora esses micro-organismos sejam capazes de utilizar uma variedade de compostos inorgânicos sulfurados, no presente estudo dar-se-á ênfase somente ao uso do sulfato (SO_4^{2-}), a forma mais oxidada do enxofre.

Ressalta-se, no presente momento, a distinção entre a redução assimilativa do sulfato e a redução desassimilativa do sulfato, sendo a última restrita às BRS. Na redução assimilativa o sulfato é incorporado como fonte de enxofre para os processos de biossíntese, enquanto que na redução desassimilativa o sulfato é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia, com conseqüente excreção de H_2S (POSTGATE, 1984).

A redução do SO_4^{2-} a H_2S é um processo complexo. Numa primeira etapa, tanto para o processo assimilativo quanto para o processo desassimilativo, ocorre a ativação dos íons

sulfato por ATP (Figura 2.2). A enzima ATP sulfurilase catalisa a ligação do íon sulfato ao fosfato da molécula de ATP, formando adenosina fosfosulfato (AFS) com a liberação de pirofosfato (PPi). Na redução desassimilativa, a AFS é reduzida a sulfito (SO_3^{2-}) pela ação da enzima AFS redutase, com a liberação de AMP (adenosina monofosfato). Na redução assimilativa, outro P é incorporado a AFS, formando fosfoadenosina fosfosulfato (FAFS) e, a partir desse momento, os sulfatos podem ser reduzidos. Em ambos processos, o sulfito é o primeiro produto da redução, e uma vez formado é transformado em sulfeto por intermédio da enzima sulfito redutase (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

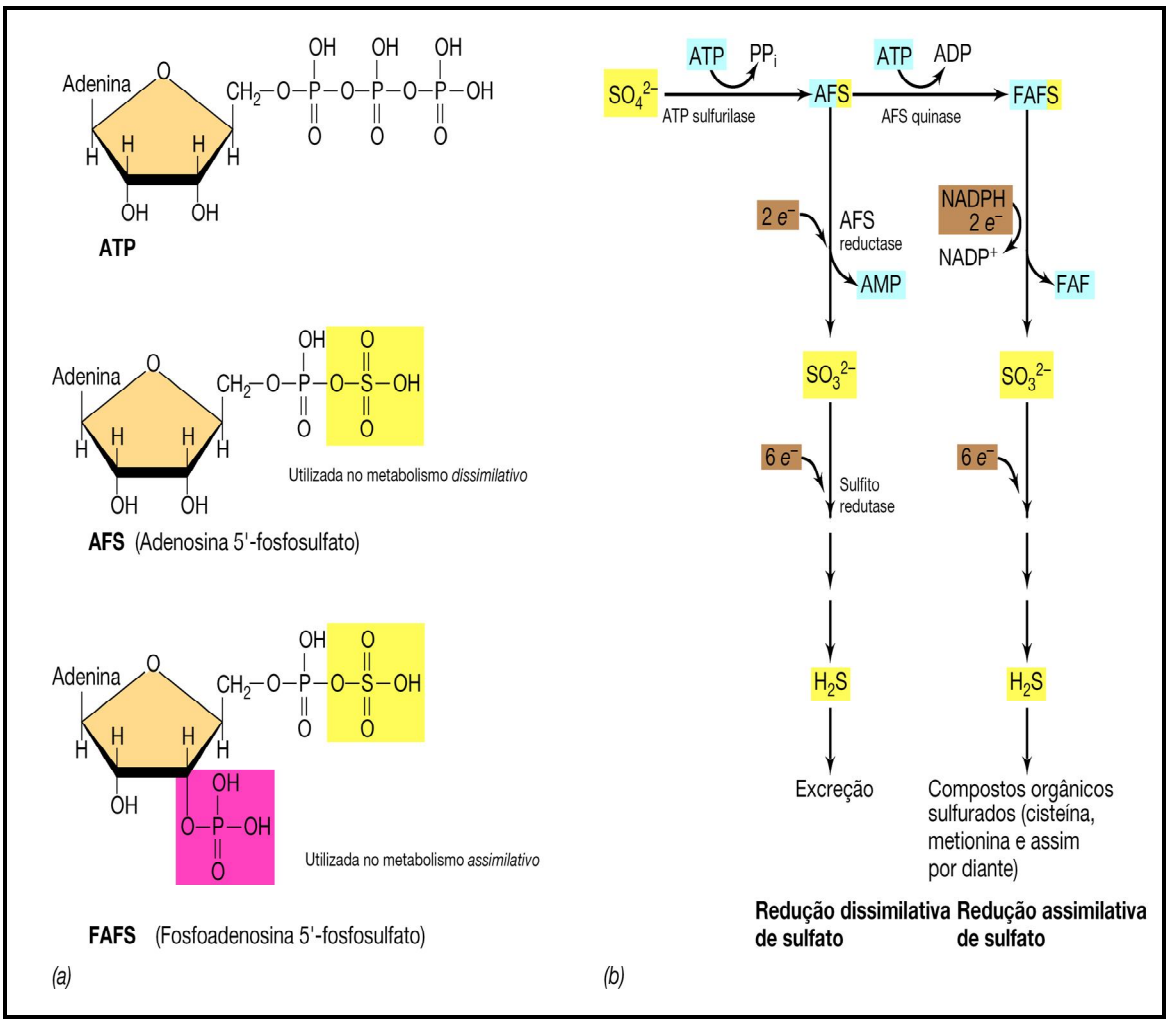


Figura 2.2: Bioquímica da redução do sulfato. (a) Duas formas de sulfato ativo podem ser produzidas: adenosina 5'-fosfosulfato (AFS) e fosfoadenosina 5'–fosfosulfato (FAFS). (b) Esquema das reduções assimilativa e desassimilativa ou dissimilativa de sulfato.
Fonte: Madigan, Martinko; Parker (2004).

No processo de redução desassimilativa, o sulfito é reduzido a sulfeto (S^{2-}) em uma série de etapas. Bioquimicamente, pouco se sabe sobre essas etapas. Postgate (1984) propôs o seguinte mecanismo: o sulfito seria convertido a metabissulfito ($S_2O_5^{2-}$) com conseqüente redução a tritionato ($S_3O_6^{2-}$). Durante a conversão do metabissulfito, intermediários como o ditionato ($S_2O_4^{-2}$) seriam formados. Parte do tritionato seria convertida a tiossulfato ($S_2O_3^{2-}$) e parte se regeneraria a sulfito. Por fim, o tiossulfato sofreria redução, dando origem ao sulfeto, e ainda converter-se-ia novamente a sulfito. A Figura 2.3 a seguir esquematiza a rota proposta por Postgate (1984).

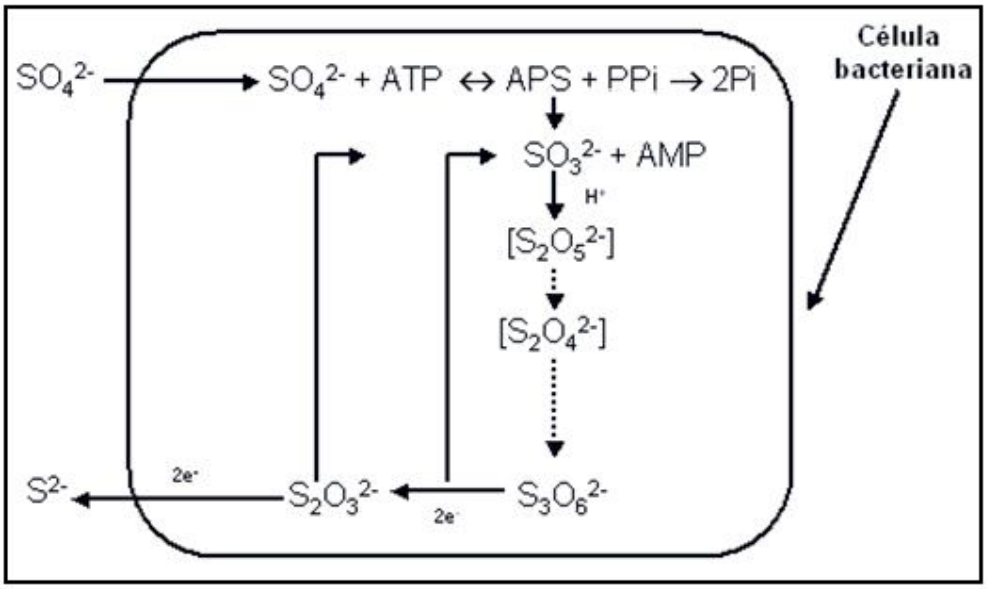


Figura 2.3: Possível rota da redução desassimilativa do sulfato.
Fonte: Postgate (1984)

O principal carreador de elétrons do processo de redução desassimilativa do sulfato é o citocromo c_3 (citocromo periplasmático de baixa massa molecular), que recebe os elétrons de uma enzima hidrogenase periplasmática, transferindo-os para um complexo protéico aderido à membrana plasmática. Este complexo, denominado Hmc, por conseguinte, transporta os elétrons para o interior da célula e os disponibiliza para as enzimas ATP sulfurilase e sulfito redutase (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

O sulfeto produzido pelas BRS através do processo desassimilativo é excretado no ambiente. De acordo com Lens et al. (1998), em valores de pH acima de 6,0 o sulfeto de

hidrogênio existe principalmente na forma dissociada (HS^-). No entanto, em valores de pH entre 6,0 a 9,0 uma mistura de H_2S e HS^- pode coexistir na solução, decaindo o nível de H_2S à medida que ocorre o aumento do pH. Valores de pH acima de 8,5 promovem a dissociação de HS^- em S^{2-}, sendo essa espécie predominante em valores de pH acima de 10. Entretanto, determinadas concentrações podem ter efeito tóxico ou inibitório sobre a própria atividade das bactérias. O exato mecanismo de inibição das BRS por sulfeto ainda não foi completamente entendido, existindo diferentes explicações para este mecanismo. A inibição/toxicidade parece se relacionar diretamente com o sulfeto de hidrogênio não dissociado que, como molécula neutra, pode atravessar sem obstáculos a membrana celular e reagir com os componentes celulares (WEIJMA; BOTS; TANDLINGER, 2002 apud VIEIRA, 2003; POL HULSHOFF; LENS; STAMS, 1998;).

Segundo Barton e Tomei (1995), concentrações próximas de 16 mM (544 mg/L) de sulfeto podem inibir o crescimento e a cinética de BRS. No entanto, a concentração mínima inibitória/tóxica de sulfeto para as BRS também pode ser afetada por condições de temperatura, pH, pressão e concentração de íons fósforo (OKABE; CHARACKLIS, 1992 apud BARTON; TOMEI, 1995). Já para Dunsmore e Evans (2005), o sulfeto pode ser tóxico na faixa de 150 – 300 mg/L, dependendo do gênero e do estado em que se encontra a bactéria (planctônica ou séssil). Este valor não se refere à concentração total de sulfeto, mas sim ao sulfeto não dissociado que, por conseguinte, é dependente dos valores de pH. O'Flaherty; Colleran (1998) apud Tang; Baskaran; Nemati (2009) descrevem que o aumento nos valores de pH, na faixa de 6,8 a 8,5, permitem que as BRS tolerem maiores concentrações de sulfeto.

Outro pressuposto atribui a inibição das BRS por sulfeto à sua reação com metais como ferro e, sua precipitação, na forma de sulfetos metálicos. Os íons ferro presentes no reservatório são resultado do processo corrosivo de equipamentos de produção de petróleo e sua combinação com o sulfeto produz sulfeto de ferro (FeS), um precipitado de coloração negra. O sulfeto de ferro formado diminui a disponibilidade de ferro para o metabolismo das BRS, uma vez que o mesmo constitui um importante componente de ferrodoxinas e citocromos, que realizam o transporte de elétrons no processo de redução do sulfato (MADIGAN, MARTINKO; PARKER, 2004). Adicionalmente, o sulfeto de ferro pode depositar sobre as superfícies sólidas, resultando na formação de incrustrações, o que intensifica o surgimento de biofilme (*biofouling)*. Biofilmes podem ser definidos como uma estrutura complexa constituída de agregados de células microbianas inseridas em uma matriz polimérica extracelular, principalmente polissacarídeos, e compostos inorgânicos, sendo seu

principal constituinte a água, que corresponde a cerca de 95% de sua massa (BEER; STOODLEY, 2006; LEWANDOWSKI; STOODLEY; ROE, 1995).

2.2.3. Modelos de previsão de *souring*

A necessidade de compreensão dos mecanismos que determinam a produção de H_2S em reservatórios de petróleo *offshore* levou à idealização de modelos que pudessem estimar a relação entre a disponibilidade de íons sulfato e sua redução por BRS, bem como as condições em que ocorre o fenômeno. A literatura reporta dois modelos para a previsão de *souring*, a saber: o Modelo da Zona de Mistura e o Modelo de Biofilmes.

O Modelo de Zona de Mistura, descrito por Ligthelm et al., (1991) e citado no trabalho de Jordan e Walsh (2004), é utilizado pela Shell U.K. Exploration and Production Ltd (Reino Unido). Este modelo assume que a atividade bacteriana é inicialmente limitada à região do reservatório, onde ocorre o contato entre a água do mar injetada e a água de formação. Recentemente, o modelo incorporou também a região próxima ao poço injetor. Segundo as considerações deste modelo, a zona de contato entre a água do mar injetada e a água de formação oferece todas as condições nutricionais necessárias para o crescimento de micro-organismos. Tais considerações se sustentam por testes em laboratório e se apóiam fundamentalmente no fato de que as BRS estão sempre presentes na frente de contato, introduzidas pela injeção de água do mar ou já residentes na própria água de formação do reservatório. Estudos de Ligthelm et al. (1991) apontaram que a geração de H_2S é devido à atividade de BRS nesta zona e que o acúmulo de H_2S é proporcional ao tamanho da zona. A Figura 2.4, extraída de Sanders (1998), esquematiza a situação proposta pelo Modelo de Zona de Mistura.

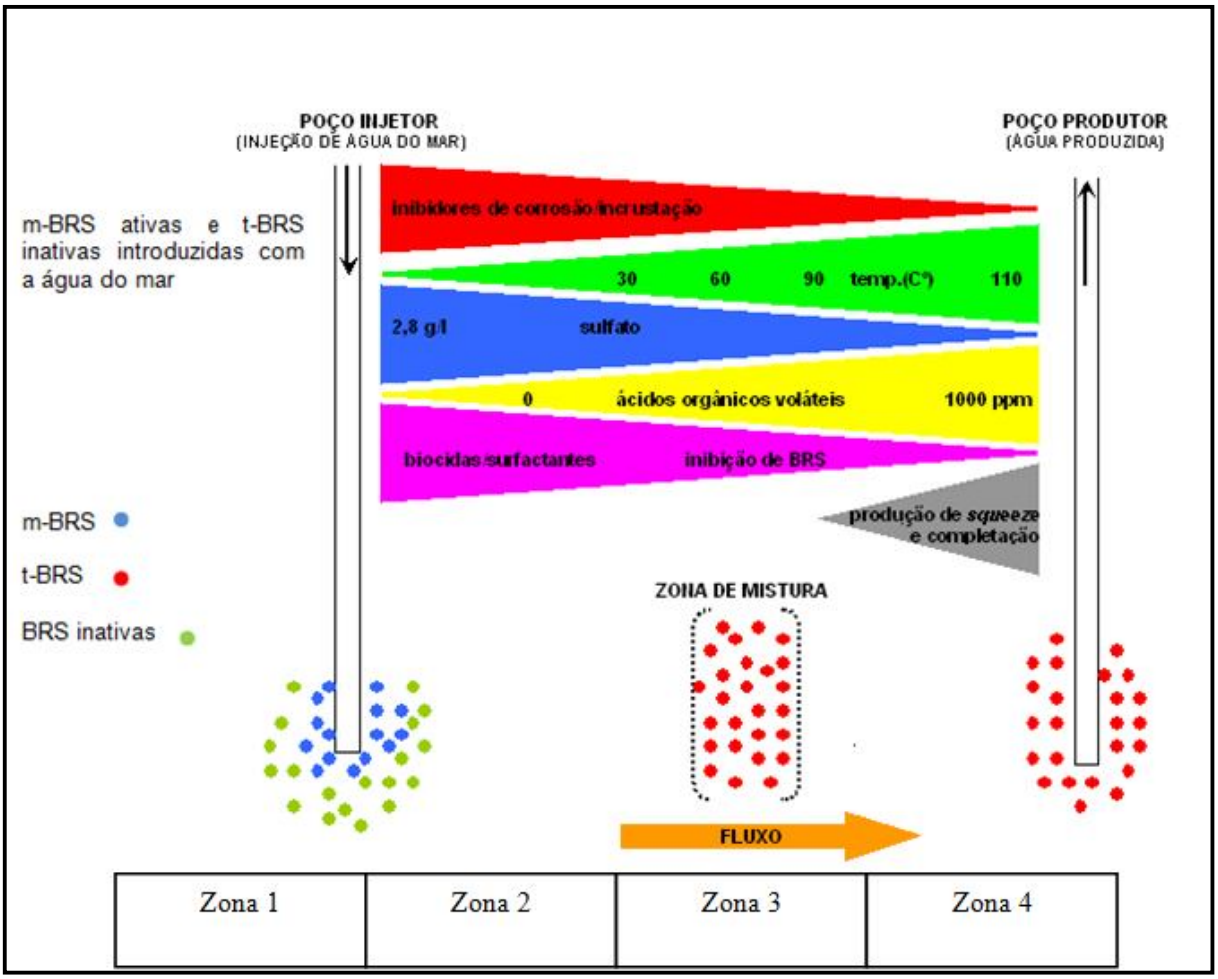


Figura 2.4: Mecanismo de Acidificação Biogênica (*Souring*) segundo o Modelo de Zona de Mistura
Fonte: Sanders (1998)

Segundo o modelo de Zona de Mistura, BRS mesófilas ativas são introduzidas com a injeção da água do mar, colonizando as regiões próximas ao poço injetor. Algumas BRS nativas, presentes na rocha do reservatório, podem ao mesmo tempo serem estimuladas por essa água injetada. Além disso, BRS termófilas, na forma de endósporos, também acabam sendo introduzidas (Zona 1). Nesta região, a atividade das BRS mesófilas é limitada pela disponibilidade de nutrientes e pelo tratamento com biocidas. Afastando-se da região do poço injetor, ocorre gradual adaptação ou mutação das BRS mesófilas em BRS termófilas e ainda a ativação das BRS termófilas, na forma de endósporos, pelo aumento de temperatura e disponibilidade de nutrientes (Zona 2). Nessas duas zonas a produção de sulfeto é limitada pelas baixas concentrações de nutrientes. Na Zona 3 ocorre uma expansão da geração de H_2S por BRS termófilas, que crescem e agregam-se nesta região de condições ideais de temperatura e concentrações de sulfato, ácidos graxos e sulfeto. Nesta região, a produção de

sulfeto é limitada por nutrientes e pela toxicidade do sulfeto gerado. Na Zona 4, a permanência em altas temperaturas e pressões pode não inibir o crescimento de BRS termófilas, mas caso ocorra muito crescimento dessas bactérias na Zona 3, concentrações tóxicas de sulfeto podem limitar a produção adicional de sulfeto nas condições adversas da Zona 4, o que provoca a migração de bactérias termófilas esporuladas com os fluidos produzidos. Vale destacar que na Zona 4 o limite de toxicidade de sulfeto para as BRS termófilas é de 100 mg/L.

Já o Modelo de Biofilmes proposto por Tyrie (1993) e também relatado em Jordan e Walsh (2004), é empregado por operadoras como Statoil Limited (Reino Unido) e BP Amoco Corporation (Reino Unido e Estados Unidos), considera que o crescimento bacteriano está localizado principalmente na região imediatamente adjacente aos poços injetores. Assim sendo, o H_2S formado seria resultado da atividade do biofilme aderido a esses poços. Bactérias já estariam presentes no reservatório, embora em número inicialmente insignificante, e outras tantas seriam introduzidas pela água de injeção. Tal modelo assume que o deslocamento do H_2S em direção aos poços produtores é assegurado pela água de injeção.

A principal contestação deste modelo é assumir que toda a atividade microbiológica está concentrada nas imediações do poço injetor e que a água do mar conteria todos os nutrientes necessários ao crescimento microbiano, tais como sulfato, fosfato, nitrogênio como nitrato, e carbono orgânico. Tyrie (1993) indica a possível disponibilidade de uma fonte de carbono alternativa para as BRS, decorrente da oxidação de óleo residual por outras bactérias existentes no reservatório. O modelo se sustenta em investigações realizadas em fluxos invertidos dos poços injetores, onde os níveis de *souring* foram mais elevados do que os registrados nos poços produtores.

Considerações de Sunde et al. (1993), através de modelagem matemática, demonstraram a aplicabilidade do Modelo de Biofilmes para explicar a geração de *souring* nas plataformas Gullfasks (Mar do Norte, Noruega). Segundo os autores, a taxa e extensão da acidificação do reservatório são essencialmente estabelecidas por três parâmetros: a) a disponibilidade de nutrientes diretamente relacionada à quantidade de biomassa no biofilme e, subseqüentemente, à taxa de produção de H_2S; b) a capacidade de adsorção de H_2S pela rocha do reservatório e c) o regime de fluxo no reservatório.

Para Dunsmore e Evans (2005), embora os modelos de previsão apresentem distinções e limitações, podem ser aplicáveis como estratégias de controle de *souring*. Entretanto, sua aplicação está diretamente vinculada às características do reservatório, ou seja, a escolha deve ser pelo modelo que melhor se aplica àquela situação pontual. Vale destacar que certos campos de petróleo exibem perfis ou condições nos quais a aplicação combinada dos dois modelos é oportuna para explicar os mecanismos que regem a acidificação.

2.2.4. Mecanismos de controle e prevenção do *souring*

Os problemas gerados pela acidificação de reservatórios têm levado, nos últimos anos, à busca por medidas de controle e prevenção do *souring*, onde se destacam: a remoção de íons sulfato por membranas de nanofiltração, a esterilização da água do mar com radiação ultravioleta, a aplicação de biocidas e agentes bioestáticos, o controle dos níveis de oxigênio na água injetada e o uso de inibidores de corrosão. Os benefícios, desvantagens e riscos associados a cada uma dessas tecnologias são apresentados a seguir.

- Remoção de sulfato (dessulfatação) da água do mar por processo de nanofiltração

O uso de membranas para remoção de sulfato foi iniciado em 1980 pela empresa Marathon na plataforma de Brae, localizada no Mar do Norte. A partir de então, este método tem sido proposto como alternativa de controle do *souring* (JORDAN; WALSH, 2004). Para Rizk et al. (1998), a tecnologia de membranas de nanofiltração tem sido empregada com sucesso em alguns campos *offshore*, sendo responsável pela redução de sulfato de cerca de 2.600 mg/L para valores inferiores a 50 mg/L. Jordan e Walsh (2004) também citam que os sistemas atuais são capazes de reduzir o sulfato de fluidos injetores de 2.700 mg/L para 40-50 mg/L.

Pouco se relata da aplicação da tecnologia de membranas de nanofiltração em campo, mas o método torna-se inviável pelos custos e tempo de implantação e, principalmente, pelo grande volume de água utilizada como fluido injetor.

Um outro fator a se considerar é que, embora a dessulfatação permita reduzir consideravelmente os níveis de sulfato, o metabolismo das BRS não é afetado. Neste caso, as

BRS continuam a reduzir o sulfato, mesmo em baixas concentrações e, conseqüentemente, produzem sulfeto. Estudos nos campos de Mars (Golfo do México) indicaram que a introdução de sulfato, mesmo em níveis considerados baixos, foi suficiente para a geração de 10 ppm(v) de H_2S nos reservatórios (JORDAN; WALSH, 2004).

- Esterilização da água do mar com radiação ultravioleta (UV)

Recentemente, a radiação UV tem sido amplamente empregada como agente esterilizante no tratamento de águas residuárias e águas destinadas ao consumo humano (MUNSHI et al., 1999). A radiação UV, normalmente em comprimento de onda de 220 a 300 nm, promove a alteração da molécula de DNA, e sob prolongada exposição causa a morte do micro-organismo. Com a mesma finalidade, o controle de *souring* pode ser feito através da esterilização da água do mar por radiação ultravioleta (LABAS; MARTÍN; CASSANO, 2005; CLARK; LUPPENS; TUCKER 1984). No entanto, deve-se considerar que a ação da radiação UV é direta na célula microbiana, não tendo ação residual, ou seja, as BRS já presentes no poço vão continuar em atividade, gerando sulfeto. Adicionalmente, há de se considerar a relevância de dois outros aspectos: a existência de formas latentes (endósporos) de BRS e a inviabilidade econômica da aplicação do método em grande escala.

- Emprego de biocidas

Biocidas são regularmente aplicados pela indústria de petróleo e gás para controlar, principalmente, a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) (MALI et al., 2003). A prevenção e controle do *souring* seriam uma finalidade subseqüente (THORSTENSON et al., 2002). A literatura descreve casos de sucesso de aplicação de biocidas, como a experiência no campo de Skjold (Mærsk Olie og Gas AS, Dinamarca), no qual foi aplicado o biocida sulfato de tetraquishidroximetil fosfônio (THPS) (LARSEN; SANDERS; TALBOT, 2004). No entanto, o controle dos níveis de H_2S era influenciado pela dosagem de THPS nos poços injetores e produtores, e foi obtido para curtos tempos de transporte da água injetada. Ressalta-se que a eficiência dessa aplicação em reservatórios com elevado tempo de trânsito da água ainda não foi bem esclarecida.

Em geral, a eficiência do tratamento com biocidas é limitada, posto que efetivamente tem pouca ação sobre os biofilmes dentro dos reservatórios ou nas superfícies metálicas de equipamentos industriais (GARDNER; STEWART, 2002), e tipicamente depende das condições do reservatório, tais como temperatura, permeabilidade, composição da água e ainda resistência dos micro-organismos pelo uso prolongado da técnica (KJELLERUP et al., 2005). A possibilidade de levar ao surgimento de linhagens de BRS resistentes aos biocidas também é mencionada por Hubert et al. (2005) e Garden e Stewart (2002).

Hitzman e Dennis (1998) fazem considerações interessantes sobre o uso de biocidas pela indústria petrolífera. Para os autores, o emprego de biocidas pode ser considerado como um tratamento preventivo ou de remediação. Como metodologia de prevenção, o sistema é tratado para eliminar toda contaminação que pode ser introduzida no início das operações de perfuração. Embora se considere que reservatórios "virgens" sejam isentos de atividade microbiológica, existem grandes evidências da presença de micro-organismos nativos. Assim, a contaminação introduzida pela perfuração pode acarretar profundas mudanças no reservatório e provocar o crescimento de micro-organismos produtores de sulfeto. A aplicação de biocida com finalidade preventiva pode não ter sucesso sobre BRS presentes na água de formação. Entretanto, mesmo que o reservatório originalmente não esteja contaminado, o tratamento com biocidas para o controle microbiano em poços de perfuração e fluidos injetores pode ser um procedimento ineficaz.

Ainda conforme Hitzman e Dennis (1998), a eficácia do biocida está diretamente relacionada ao seu caráter extremamente reativo, que acaba resultando na sua rápida inativação dentro do reservatório. Assim, é necessário administrar uma alta quantidade do produto para alcançar resultados mais eficientes. Como mostram Eckford e Fedorak (2002a), a quantidade requerida de biocida para uma operação de injeção, em que a água produzida é separada e reciclada, pode ser maior que 100.000 L / ano. De modo que a opção pelo emprego de biocida deve levar em conta a relação custo-benefício e que aplicações específicas, como a prevenção de formação biogênica de sulfeto, podem não ser adequadas. Em adição, os biocidas apresentam riscos tanto para os trabalhadores da indústria petrolífera quanto para o meio ambiente, devido à sua alta toxicidade.

- Emprego de agentes bioestáticos

Agentes bioestáticos promovem a inibição do crescimento sem que haja a morte das células. Frequentemente, a inibição é provocada pela interferência na síntese protéica, em decorrência de ligação do agente aos ribossomos. Um agente bioestático a base de antraquinona foi desenvolvido para atuar no controle de BRS, apresentando maior especificidade para este grupo microbiano do que os biocidas convencionais (JORDAN; WALSH, 2004). O emprego da técnica motivou o registro da patente US 5.500.368 por Tatnall em 1999, que propõe o método como alternativa viável de controle da produção de sulfeto, tendo como pressuposto a inibição do citocromo *c*, importante carreador da rota de transporte de elétrons durante a redução do sulfato. Destaca-se também uma importante particularidade da antraquinona que, diferentemente dos biocidas, é considerada atóxica pela sua elevada biodegradabilidade.

Larsen; Sanders; Talbot. (2004) apresentam experiências brasileiras bem sucedidas do uso combinado de antraquinona com biocidas a base de THPS (Sulfato de Tetrakis Hidroximetil Fosfônico) para controle do *souring*. A desvantagem do método relaciona-se ao altíssimo custo de implementação.

- Controle dos níveis de oxigênio no fluido injetor

O controle dos níveis de oxigênio em operações *offshore* é considerado importante. A prática em campo considera a desaeração do fluido injetor como forma de controle do processo corrosivo, em decorrência da sua ação oxidante. Além disso, a presença de oxigênio pode promover o crescimento de micro-organismos aeróbios ou facultativos com formação de biofilmes sobre as estruturas, o que pode promover a corrosão por aeração diferencial. Os biofilmes formados podem se constituir um habitat e fonte nutricional para o crescimento e colonização posterior de BRS (JORDAN; WALSH, 2004).

O uso de oxigênio em fase sólida, como o peróxido de magnésio (MgO_2), para controle da produção de H_2S, é relatado também como alternativa que resulta em aumento dos níveis de oxigênio. O peróxido de magnésio age através de dois mecanismos: abioticamente oxida sulfeto a sulfato, e bioticamente inibe BRS pelo aumento do potencial redox no meio (CHANG; CHANG; CHEN, 2007). A aplicação da técnica é pouco descrita na literatura, o

que impede maiores discussões sobre seu uso em campo. Uma questão a ser levantada, quando ocorre a presença de oxigênio, é a possibilidade da existência no reservatório de linhagens de BRS que possuem várias estratégias de defesa quando expostas ao oxigênio (aerotolerantes), que incluem estratégias comportamentais (formação de agregados celulares) e estratégias moleculares (ativação de sistema enzimático que promove a eliminação do oxigênio) (DOLLA; FOURNIER; DERMOUN, 2006).

- Emprego de inibidores de corrosão

Em operações *offshore*, os inibidores de corrosão são adicionados em fase aquosa, mais para proteger o metal contra a ação dos produtos metabólicos de BRS, do que para o controle do processo de *souring*. Entretanto, para se garantir a eficiência do emprego de inibidores de corrosão é necessário rigoroso monitoramento, pois caso a geração de H_2S persista, a proteção do inibidor é drasticamente afetada (HITZMAN; DENNIS, 1998). O uso de inibidores de corrosão está condicionado à sua aplicação em ambientes marinhos. A presença de altas concentrações de cloreto e sulfato na água do mar pode interferir na formação da camada protetora e acabar permitindo a adesão de micro-organismos e a ação de seus metabólicos (GENTIL, 2003). O método requer, por exemplo, a aplicação de altas quantidades de molibdato para controle de *souring*, normalmente em valores superiores a 3000 mg/L. Destaca-se também que os inibidores convencionais apresentam caráter extremamente tóxico, o que coloca em risco o meio ambiente e causa sérios danos à vida marinha e humana (TAJ et al., 2006).

A ineficiência e os altos custos de implantação das tecnologias acima citadas conduziram à busca por tecnologias mais apropriadas para controle do *souring*. O próximo item descreve, em detalhes, os mecanismos envolvidos na aplicação do nitrato e/ou nitrito como alternativa promissora no controle de *souring*, bem como as vantagens e desvantagens do método.

2.3. Uso do Nitrato como Tecnologia Alternativa para Controle de *Souring*

Uma alternativa que vem sendo cada vez mais explorada no controle de BRS, e na conseqüente redução da produção de H_2S, tem sido a aplicação de nitrato. O uso de nitrato no

controle de *souring* ainda é incipiente na literatura científica especializada, como demonstram Jenneman; McInerney; Knapp (1986) apud Gevertz et al. (2000) e Telang et al. (1997). Este método recebeu a denominação de "Tecnologia da Exclusão Biocompetitiva" em alguns estudos (NASCIMENTO, 2006; HITZMAN; DENNIS, 1998; HITZMAN; SPERL, 1994).

Destaca-se, no entanto, que a aplicação do nitrato em campo é prática comum em empresas petrolíferas, o que ocasionou o registro de algumas patentes. As patentes US Patent 5.405.531 e US Patent 5.750.392 (US Patent and Trademark Office, Washington, DC), requeridas por Hitzman; Sperl; Sandbeck. em 1995 e 1998, respectivamente, concebem o uso da injeção de nitrato e nitrito como forma de controle do *souring*, focalizando o estímulo da população de BRN e estabelecendo o uso dos dois íons combinados com molibdato. A patente US Patent 5.686.293 (US Patent and Trademark Office, Washington, DC), registrada por Jenneman e Gevertz em 1997, demonstra a aplicabilidade dos íons nitrato, mas tem como foco a atividade de bactérias redutoras de nitrato oxidantes de enxofre (BRN-OS). Empresas petrolíferas localizadas no Mar do Norte, no Golfo do México, no Oriente Médio e na América do Norte, principais produtoras de petróleo e gás no mundo, fazem uso da técnica: ConocoPhillips Company (Estados Unidos), EnCore Oil plc (ReinoUnido), Mærsk Olie og Gas AS (Dinamarca), Saudi Arabian Oil Company (Arábia Saudita), Shell U.K. Exploration and Production Ltd (Reino Unido) e Statoil Limited (Reino Unido) (VOORDOUW; JACK, 2005; ENERGY INSTITUTE, 2003).

A aplicação de nitrato, em substituição aos biocidas e inibidores de corrosão normalmente empregados, representa não só ganhos econômicos, mas a redução de agressões ao ambiente. A técnica favorece a atividade das bactérias redutoras de nitrato (BRN), pois a redução do nitrato concede aos micro-organismos um ganho energético consideravelmente maior do que a redução do sulfato. Assim, a presença de nitrato estimula o crescimento de BRN e acaba inibindo o metabolismo de BRS. As BRN em número maior podem ainda competir mais intensamente por fontes de carbono, dificultando o crescimento das BRS (B∅DTKER et al., 2009). As espécies de BRN capazes de oxidar sulfeto (BRN-OS) também contribuem para a remoção de sulfeto e o aumento do potencial redox, inibindo ainda mais o crescimento das BRS. Existem também BRS capazes de utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons, o que favorece a redução da produção de sulfeto (HAVEMAN; GREENE; VOORDOUW, 2005; SUNDE, et al., 2004; ENERGY INSTITUTE, 2003; HUBERT et al., 2003; ECKFORD; FEDORAK, 2002a; MYHR et al., 2002).

Para melhor compreensão do uso do nitrato como forma alternativa no controle do processo de *souring*, faz-se necessário no presente momento destacar o papel das BRN neste cenário. Sendo assim, o próximo item destaca a caracterização e o metabolismo desse grupo microbiano.

2.3.1. Caracterização e metabolismo de BRN

Uma variedade de micro-organismos, tais como os pertencentes aos gêneros *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Spirillum*, *Staphylococcus* e *Vibrio*, são capazes de reduzir nitrato. E como a maioria dos procariotos desnitrificantes, as BRN são micro-organismos aeróbios facultativos, ou seja, podem apresentar atividade metabólica tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio, o micro-organismo realiza a respiração aeróbia, mas quando o oxigênio é exaurido o micro-organismo passa a utilizar um aceptor final de elétrons alternativo, como o nitrato (MADIGAN, MARTINKO; PARKER, 2004).

As BRN estão amplamente distribuídas em ambientes terrestres e aquáticos, com linhagens marinhas e representantes em reservatórios de petróleo, das quais se destacam: *Petrobacter succinatimandens* (4BON = DSM 15512 = CIP 107790), isolada em poços de petróleo do leste australiano (SALINAS et al., 2004); *Garciella nitratireducens* (MET79 = DSM 15102 = CIP 107615), isolada de um campo de petróleo no Golfo do México (MIRANDA-TELLO et al., 2003b); *Denitrovibrio acetiphilus* (N2460 = DSM 12809), isolada em modelo de coluna de reservatório de petróleo, que foi enriquecido com água da central de tratamento biológico da refinaria norueguesa de Mongstad (MYHR; TORSVIK, 2000); linhagens CVO (relatada como *Thiomicrospira denitrificans*) e FWKO B (relatada como *Arcobacter* spp), isoladas no campo de petróleo Coleville em Saskatchewan, Canadá (GEVERTZ et al., 2000).

A redução do nitrato, como ocorre com o sulfato, pode ser tanto por processo assimilativo quanto desassimilativo. O processo assimilativo refere-se à incorporação de íons nitrato, pela ação de sistema enzimático que inclui nitrato e nitrito redutases, resultando na formação de amônia, que posteriormente é incorporada em aminoácidos para síntese protéica (MADIGAN, MARTINKO; PARKER, 2004; ENERGY INSTITUTE, 2003). Para os processos de controle de acidificação de reservatórios de petróleo, o conhecimento do

metabolismo desassimilativo é de suma importância. Bioquimicamente, a redução desassimilativa do nitrato inicia-se pela ação da nitrato redutase associada à membrana celular, cuja constituição é marcada pela presença de molibdênio. Ressalta-se que a síntese desta enzima, bem como a síntese das enzimas subseqüentes da via metabólica, é reprimida pela presença de oxigênio molecular. Além da necessidade de manutenção de condições anóxicas para a redução do nitrato, faz-se necessário também a presença de nitrato como fator desencadeador da expressão enzimática. O nitrato pode ser reduzido por duas vias desassimilativas (representadas pelas reações 2.1 e 2.2 e pela Figura 2.5): a via parcial, na qual o nitrato é reduzido a amônia, tendo como intermediário o nitrito (NO_2^-); e a via completa, também conhecida como desnitrificação, em que o nitrato é reduzido até gás nitrogênio (N_2), com nitrito, óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) como intermediários. A denominação desnitrificação relaciona-se ao fenômeno de desprendimento dos compostos nitrogenados na forma de gás (MADIGAN, MARTINKO; PARKER, 2004).

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_3 \qquad \text{(via parcial do } NO_3^-\text{)} \qquad (2.1)$$

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2 \qquad \text{(via completa do } NO_3^-\text{)} \qquad (2.2)$$

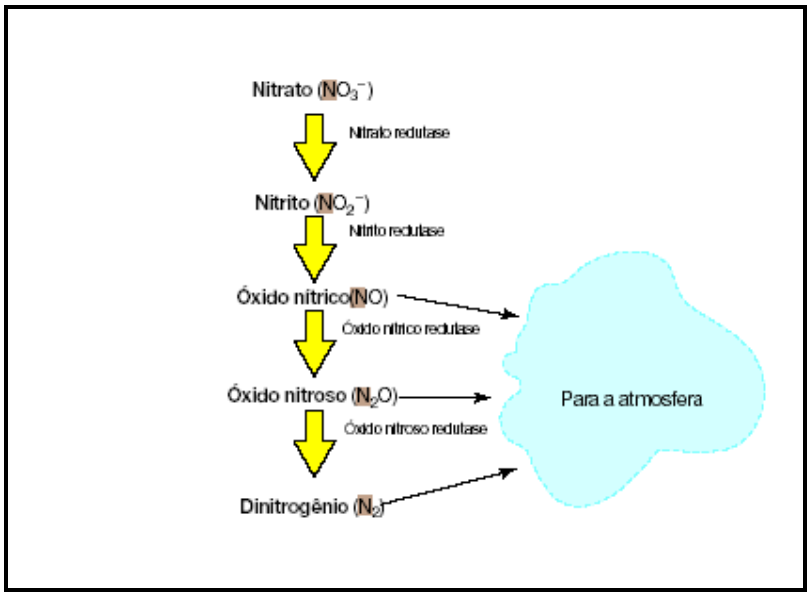


Figura 2.5: Redução desassimilativa do nitrato (desnitrificação)
Fonte: Madigan; Martinko; Parker (2004)

A redução de nitrato pela ação de micro-organismos desnitrificantes é a de maior significância, quando se trata do uso de nitrato como forma de controle do *souring* (ENERGY

INSTITUTE, 2003). Micro-organismos como *Halomonas halodenitrificans*, *Acidithiobacillus denitrificans* e várias espécies de *Pseudomonas* realizam o caminho completo da redução do nitrato, como descrito a seguir. No processo de desnitrificação, os óxidos de nitrogênio são formados a partir da redução do nitrito pela ação em série de enzimas como nitrato redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, como apresentado na Figura 2.6.

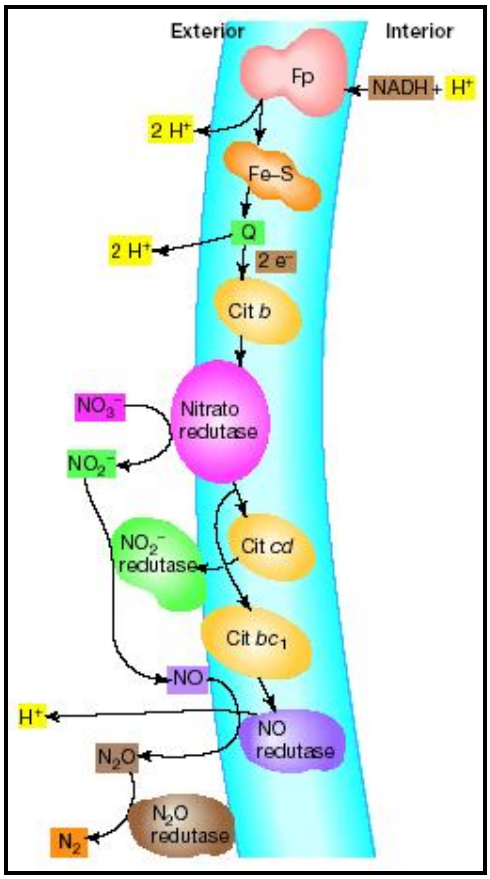


Figura 2.6: Possível rota do transporte de elétrons durante a desnitrificação em *Pseudomonas stutzeri*
Fonte: Madigan; Martinko; Parker (2004)

Durante o transporte de elétrons estabelece-se uma força próton motriz, pela qual ocorre produção de ATP por meio de uma ATPase, de maneira convencional. À medida que o nitrato é reduzido a nitrogênio, moléculas de ATP tornam-se disponíveis, uma vez que a óxido nítrico redutase provoca a extrusão de prótons (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A Figura 2.6 apresenta a possível rota de transporte de elétrons em *Pseudomonas stutzeri* durante a desnitrificação. A coenzima NADH (nicotinamida dinucleotídeo na forma reduzida) funciona como doador de elétrons, enquanto Fp (flavoproteína), Q (ubiquinona) e

uma seqüência de citrocromos (c_b, c_{cd} e c_{bc1}) funcionam como os principais carreadores de elétrons. As enzimas nitrato e óxido nítrico redutases localizam-se na membrana citoplasmática, enquanto as nitrito e óxido nitroso redutases são periplasmáticas. Os doadores de elétrons das várias redutases ainda não foram bem elucidados, com exceção do doador da nitrato redutase. Com a redução de nitrato, simultaneamente, ocorre a oxidação de matéria orgânica, uma vez que a maioria dos micro-organismos redutores de nitrato é heterotrófica.

Conhecidos os principais mecanismos que regem a redução desassimilativa de nitrato por BRN, passa-se a seguir para a discussão sobre o uso de nitrato no controle de *souring* e sua relação com o metabolismo de BRN e BRS.

2.3.2. A injeção de nitrato e os principais mecanismos envolvidos

Greene et al. (2003) apontam as implicações que a injeção de nitrato traz para o controle de *souring* em reservatórios de petróleo e propõem: a) em reservatórios de petróleo, BRS usam preferencialmente nitrato como aceptor de elétrons, mitigando a geração de sulfeto biogênico. b) BRN podem oxidar a mesma fonte doadora de elétrons utilizada por BRS para reduzir o nitrato, e c) BRN-OS oxidam o sulfeto gerado por BRS. Logo, a seguir, apresentam-se mais detalhadamente tais implicações, bem como a contribuição de cada delas na redução do *souring*.

2.3.2.1.Competição entre BRN e BRS por fontes de carbono

A presença de nitrato pode desencadear a competição entre BRS e BRN quimioorganotróficas (quimioheterotróficas) por compostos orgânicos que servem de doadores de elétrons. Os reservatórios de petróleo contêm compostos orgânicos dissolvidos, tais como ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e compostos aromáticos (tolueno e fenóis) que servem como substrato para os micro-organismos quimioorganotróficos (BØDTKER et al., 2009; HUBERT et al., 2003; ECKFORD; FEDORACK, 2002b).

O ganho energético pela redução de nitrato é cerca de 10 vezes maior que com a redução do sulfato. Logo, a injeção de nitrato em ambientes anaeróbios inibe o crescimento de BRS e tem como conseqüência a queda na produção de sulfeto.

Eckford e Fedorack (2002a) citam o exemplo dado por Thauer; Jungermann; Decker (1977) para a oxidação de acetato, tanto pela redução de nitrato quanto pela redução de sulfato, sendo apresentados abaixo os respectivos valores de energia liberada:

- redução de nitrato por BRN:

$$5\ CH_3CO_2^- + 8\ NO_3^- + 3\ H^+ \rightarrow 10\ HCO_3^- + 4\ N_2 + 4\ H_2O \qquad (2.3)$$

$$\Delta G°' = -\ 495\ kJ\ /mol\ NO_3^-$$

- redução de sulfato por BRS:

$$CH_3CO_2^- + SO_4^= \rightarrow 2\ HCO_3^- + HS^- \qquad (2.4)$$

$$\Delta G°' = -\ 47\ kJ\ /\ mol\ SO_4^{2-}$$

As reações 2.3 e 2.4 demonstram que, por mol de aceptor de elétrons, as BRN tem termodinamicamente vantagem sobre as BRS, ou seja, na presença de nitrato, as BRN podem ser mais ativas e concomitantemente podem inibir a atividade de BRS, eliminando assim a produção de H_2S. Em conseqüência, o aumento no número de BRN provoca maior consumo de fontes de carbono, o que inviabiliza sua disponibilidade para as BRS.

2.3.2.2.Oxidação biológica do sulfeto por ação de BRN-OS

As bactérias redutoras de nitrato oxidantes de enxofre (BRN-OS) quimiolitotróficas obtêm energia pela oxidação de compostos inorgânicos de enxofre reduzidos e, sendo assim, são capazes de remover o sulfeto gerado pela atividade de BRS. Nessa condição, o nitrato serve como aceptor final de elétrons para a reoxidação de sulfeto a sulfato ou enxofre elementar. A reação 2.5 abaixo, extraída de Davidova et al. (2001), exemplifica a ação das BRN-OS:

$$5\ HS^- + 2\ NO_3^- + 7\ H^+ \rightarrow 5\ S^o + N_2 + 6\ H_2O \qquad (2.5)$$

Experimentos conduzidos por McInerney; Wofford; Sublette (1996) e Jenneman et al. (1999) com *Acithiobacillus denitrificans* demonstraram uma redução considerável nos níveis de sulfeto quando se estimulou a oxidação de enxofre por esse micro-organismo. Greene et al. (2003) citam a pertinência dos trabalhos de Telang et al. (1997), Gevertz et al. (2000) e Nemati; Jenneman; Voordouw (2001) com a BRN-OS *Thiomicrospira* sp. CVO. Ainda para Greene et al. (2003), a interação metabólica entre BRS e BRN-OS é documentada em uma variedade de ambientes e pode ser representada pelo esquema apresentado na Figura 2.7.

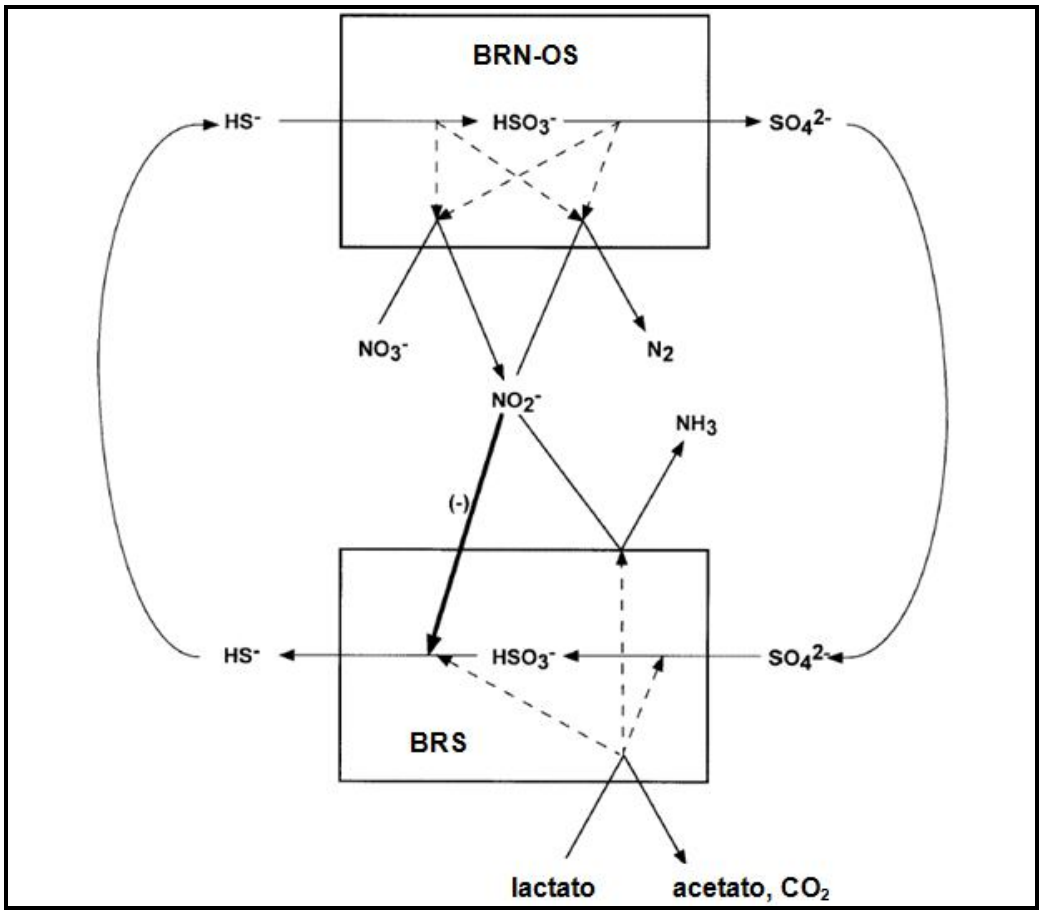


Figura 2.7. Possível modelo para a interação simbiótica entre BRS e BRN-OS
Fonte: Greene et al. (2003)

Segundo o modelo apresentado na Figura 2.7, as BRS utilizam lactato ou outras fontes como ácidos orgânicos, álcoois ou hidrogênio como doadores de elétrons para reduzir o sulfato a sulfeto; e as BRN-OS, simbioticamente, utilizam o nitrato como aceptor final de elétrons para reoxidar o sulfeto excretado a sulfato ou enxofre elementar. Os traços pontilhados (--) na via metabólica das BRS representam os elétrons derivados da oxidação do

lactato, que posteriormente são utilizados na redução do sulfato a sulfeto com sulfito como intermediário. Na via metabólica das BRN-OS, os traços pontilhados (--) representam os elétrons derivados da reoxidação do sulfeto, que em seguida são utilizados na redução do nitrato a nitrogênio ou amônia, com a formação de nitrito como intermediário. O modelo também demonstra que o nitrito formado pode inibir a redução desassimilativa de sulfito a sulfeto, ou seja, o nitrito é capaz de inibir a ação da enzima sulfito redutase desassimilativa (Dsr - dissimilatory sufite reductase) das BRS.

2.3.2.3.Inibição das BRS pelo aumento do potencial redox do meio

A manutenção de um potencial redox (E_H) abaixo de –100 mV é essencial para o desenvolvimento das BRS, como relatado por Postgate (1984), já que a redução desassimilativa do sulfato a sulfeto é inibida em altos valores de E_H. A redução desassimilativa do nitrato a nitrogênio gasoso produz intermediários, como o nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e amônia (NH_3), que possuem capacidade de elevar o E_H do meio tornando-o impróprio para as BRS (NEMATI; JENNEMAN; VOORDOUW, 2001).

Estes mecanismos demonstram que o decréscimo do nível de H_2S envolve principalmente a geração de um ambiente altamente oxidante em função da liberação de elétrons pela decomposição de íon nitrito em solução, resultando no aumento do seu potencial redox (E_H) (STURMAN, 2001; STURMAN; GOERES, 1999; REINSEL et al.,1996)

Além da geração de um ambiente altamente oxidante, o nitrito presente no meio também pode reagir abioticamente, seqüestrando o sulfeto dissolvido no sistema e produzindo enxofre elementar, como mostra a reação 2.6 (STURMAN, 2001) a seguir:

$$3\ H_2S + 3\ HS^- + 4\ NO_2^- + 7\ H^+ \rightarrow 0{,}75\ S_8^o + 2\ N_2 + 8\ H_2O \qquad (2.6)$$

Abioticamente, o nitrito também é capaz de promover a dissolução da pirita (FeS_2), produzindo sulfato, como mostra a reação 2.7 (STURMAN, 2001) a seguir:

$$FeS_2 + 4\ NO_2^- \rightarrow 2\ SO_4^{2-} + Fe^{2+} + 2\ N_2 \qquad (2.7)$$

2.3.2.4. Substituição do aceptor final de elétrons por BRS

Algumas espécies dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e *Desulfomonas* são capazes de utilizar nitrato como aceptor final de elétrons, formando amônia como produto final, através de uma via desassimilativa que envolve a ação da enzima nitrato redutase (DUNSMORE et al., 2004; CYPIONKA, 1995; MOURA et al., 1997). Esta proposição pode ser confirmada pelo balanço termodinâmico das reações 2.8 e 2.9, que representam a redução do nitrato e sulfato por BRS, respectivamente:

$$NO_3^- + 4\ H_2 + 2\ H^+ \rightarrow NH_4^+ + 3\ H_2O \qquad (2.8)$$

$$\Delta G^o = -149{,}2\ kJ/H_2$$

$$SO_4^{2-} + 4\ H_2 \rightarrow S^{2-} + 4\ H_2O \qquad (2.9)$$

$$\Delta G^o = -172{,}0\ kJ/H_2$$

Segundo Cypionka (1995), a capacidade de redução parece se associar à disponibilidade de íons sulfato no meio, ou seja, o metabolismo das BRS seria direcionado à redução de nitrato quando o íon sulfato estivesse limitado. A substituição do aceptor sulfato por nitrato trata-se de uma estratégia de conservação de energia utilizada pelo micro-organismo já relatada em diferentes trabalhos (MARIETOU et al., 2005; PEREIRA et al., 2000; PEREIRA et al., 1996). Para Dinning et al. (2005), a inibição estequiométrica da redução de sulfato pela redução de nitrato em BRS ocorre quando as concentrações de nitrato são proporcionais às concentrações disponíveis de fonte de carbono. Assim, nessas condições, o metabolismo das BRS (se contêm genes para a redução de nitrato) seria completamente direcionado para a redução do nitrato. No entanto, Dunsmore et al. (2004) descrevem a habilidade de determinadas linhagens de *Desulfovibrio* em reduzir o nitrato na presença de íons sulfato, mesmo em concentrações não limitantes. Esta afirmativa procede, tendo em vista a similaridade entre os ganhos energéticos das reações 2.8 e 2.9.

O nitrito, como resultado da redução de nitrato, também pode ser utilizado por BRS que usam o nitrito como aceptor final de elétrons. A capacidade de BRS utilizarem nitrito é documentada por Moura et al. (1997) e Mitchell; Jones; Cole (1986). Nemati et al. (2001) e Greene et al. (2003) postulam que o nitrito pode ainda atuar na inibição da redução de sulfito

a sulfeto através do bloqueio da enzima sulfito redutase desassimilativa, que atua na última etapa da redução do sulfato.

Cabe ressaltar que, em qualquer dos casos mencionados, as BRS permanecerão metabolicamente ativas, apenas deixando de produzir sulfeto. Logo, a biogênese de sulfeto voltará a ocorrer numa eventual disponibilidade de sulfato. Neste caso, tem-se o agravante da acidificação do reservatório ser ainda intensa, visto estar a população de BRS em maior número e já adaptada às condições nele presentes.

2.3.3. Dosagens recomendadas de nitrato para mitigação de H_2S em reservatórios

Segundo Energy Institute (2003), na maioria dos casos, o controle do processo de acidificação é feito inicialmente pela aplicação contínua de nitrato por vários meses, com a perspectiva de futuras injeções intermitentes.

Quanto à dosagem, estudos têm demonstrado que a concentração de nitrato a ser adotada deve ser proporcional à concentração da fonte de carbono a ser oxidada (DINNING et al., 2005; HUBERT et al., 2003; HITZMAN; SPERL, 1994). No entanto, também devem ser levadas em consideração as particularidades de cada reservatório, uma vez que a ação inibitória do nitrato é influenciada pelas características microbiológicas e ambientais do reservatório.

Jenneman et al. (1999) demonstraram, em testes de campo, que a aplicação de 207 mg/L de NO_3^- (nitrato de amônia) foi totalmente eficiente na diminuição de sulfeto. Já Dinning et al. (2005) registrou a inibição de *souring* com aplicações de 80 mg/L de NO_3^- e remoção completa de H_2S em dosagens de 100 mg/L de NO_3^-. Londry e Sulfita (1999), em testes em laboratório, propuseram dosagem bem mais elevada, da ordem de 3100 mg/L de NO_3^- para reduzir em 90% a redução de sulfato. Em contrapartida, Myhr et al. (2002) reportaram que 31 mg/L de NO_3^- foram suficientes para a inibição completa da produção de sulfeto em testes em colunas que simulam o comportamento de reservatórios de petróleo. Nenhum destes trabalhos detalha as condições operacionais dos experimentos, como por exemplo as quantidades de carbono e das populações de BRS e BRN. Assim, pode-se enfatizar a necessidade de ser realizado um estudo para cada campo onde for indicado o tratamento.

Observou-se que a literatura consultada concentra-se, principalmente, na aplicação de nitrato em operações de recuperação de petróleo que usam a água do mar como fluido injetor. Estudos como os de Lysnes et al. (2009), têm demonstrado que as concentrações de nitrato normalmente empregadas em campos que utilizam a água do mar como fluido injetor não são suficientes para controlar a produção de H_2S em sistemas que utilizam a água produzida como fluido injetor. A reinjeção de água produzida promoveria o crescimento de BRS termófilas, sendo necessário um incremento na dosagem de nitrato para o tratamento.

O nitrato e nitrito são aplicados na forma de sais comercialmente disponíveis, como nitrato de cálcio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio e nitrito de sódio. Porém, a escolha do tipo de sal deve levar em conta fatores como custo e eficiência de aplicação, bem como problemas relacionados com a formação de incrustrações. Em testes de laboratório, todos os sais resultaram em efetiva redução do nitrato, contribuindo intensamente para o controle do processo de acidificação, com ligeiras diferenças. O acúmulo de nitrito no meio foi identificado quando se empregou nitrato de sódio ou nitrato de potássio. Em contrapartida, não houve acúmulo de nitrito com o uso de nitrato de cálcio (ENERGY INSTITUTE, 2003). Londry e Sulfita (1999) também confirmam as considerações anteriores em investigações com o uso de nitrato como forma de controle da geração de sulfeto. Aparentemente, é mais conveniente o tratamento de reservatórios com nitrato de potássio ou de sódio.

2.3.4. Limitações do uso de nitrato para controle de *souring*

O uso de nitrato como alternativa promissora de controle de *souring* encontra algumas limitações, onde se destacam: características do reservatório; tipo de fluido injetor (água do mar, água produzida ou ambas); nível de matéria orgânica e inorgânica na água de injeção e formação e, outros produtos usados e seu modo de injeção.

No entanto, um tipo de limitação deve ser destacado. O risco de corrosão associado ao nitrato e aos intermediários gerados pela sua própria redução desassimilativa, como por exemplo, o nitrito (REMPEL; EVITTS; NEMATI, 2006; HUBERT et al., 2005). Termodinamicamente, tanto o nitrato quanto o nitrito, podem intensificar o processo corrosivo pela possibilidade de oxidação do Fe^0 a Fe^{2+} sob condições neutras. Quando se compara o nitrato com outros ânions encontrados no ambiente marinho, fica evidente que o nitrato é

menos agressivo. O nitrito, por sua vez, é considerado tanto agente oxidante quanto promotor ou inibidor da corrosão, dependendo de sua concentração. Assim, o nitrato pode se tornar potencialmente corrosivo quando é convertido biologicamente a nitrito.

O poder corrosivo do nitrito é dependente de sua concentração. Em concentrações elevadas é considerado agente inibidor da corrosão, pois acaba sendo responsável pela formação de uma camada passivante sobre o aço carbono. Já em concentrações baixas associa-se ao aumento do processo corrosivo, quer pela distribuição não uniforme do material aderido quer pela formação de pites, que se caracterizam pela perda de massa pontual, mas, em geral, de considerável profundidade (GENTIL, 2003).

Supostamente, a disponibilidade de baixas concentrações de nitrito se deve à sua geração pela redução biológica do nitrato e à sua prolongada permanência no sistema, em virtude do consumo preferencial de nitrato pelas bactérias. Ressalta-se, entretanto, que tais considerações necessitam de uma fundamentação mais consistente.

Em suma, os efeitos do tratamento com nitrato nos processos de corrosão são ainda pouco conhecidos, mas parecem se relacionar com uma atividade microbiológica específica e com as características químicas do sistema sob tratamento. Um importante exame dos efeitos da corrosão relacionados ao emprego de nitrato, como forma de controle de *souring*, precisa ser analisado caso a caso (ENERGY INSTITUTE, 2003).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Culturas Microbianas

Foram empregados um consórcio microbiano enriquecido de BRS obtido de campo de petróleo *offshore* da Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras) e uma cultura pura de BRN (*Halomonas halodenitrificans* - DSM 735), adquirida da Coleção de Culturas DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha). As culturas foram mantidas através de repiques mensais em meios específicos. Para o consórcio de BRS utilizou-se o meio Postgate E modificado (POSTGATE, 1984) e para a cultura de BRN empregou-se caldo nutriente, conforme indicado pela DSMZ. Após incubação a 30±1ºC por 72 h, as culturas de BRS e BRN foram estocadas à temperatura ambiente (24±1ºC) e a 5±2ºC, respectivamente. A descrição completa de cada meio é apresentada nos itens 3.2.2 e 3.2.3.

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meio constituído de água produzida (MAP)

Para os ensaios do planejamento experimental foi utilizado um meio constituído de água produzida (MAP) suplementada com sais essenciais e ácidos orgânicos de cadeia curta como fonte de carbono na seguinte concentração: ácido lático (60,8 g/L), ácido propiônico (50,0 g/L) e ácido butírico (44,6 g/L), como apresentado na Tabela 3.1. A concentração dos ácidos orgânicos foi calculada de modo a estabelecer a relação carbono/sulfato do meio Postgate E (POSTGATE, 1984), cuja composição é específica para o cultivo de BRS. A composição do meio constituído de água produzida foi definida com base no conteúdo de sulfato na água produzida (1650 mg SO_4^{2-}/L) e em estudos prévios em que o meio empregado também foi formulado com água produzida (VIEIRA, 2003). O meio foi ainda acrescido de 0,053 g/L de ácido ascórbico como agente redutor, a fim de estabelecer a condição de anaerobiose.

Tabela 3.1: Composição do Meio Constituído de Água Produzida (MAP)

Componentes	Composição
KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
Extrato de levedura	0,2 g
Solução de ácidos orgânicos	23 mL
Solução de resazurina (0,025%)	4,0 mL
Água produzida	q.s.p. 1000 mL

A constituição da água produzida é bastante complexa, com a presença de fontes de carbono e compostos inorgânicos (VIEIRA, 2003), o que pode permitir o desenvolvimento microbiano. Assim sendo, houve a necessidade de suplementação apenas com sais essenciais e fonte de carbono pois, neste caso em particular e, após prévia análise, constatou-se que a concentração de carbono era inferior à necessária para atender as exigências dos micro-organismos. A escolha de ácidos orgânicos como fonte de carbono se justificou pela presença dessas substâncias em águas residuárias da indústria do petróleo e pelo fato, já conhecido, dos ácidos orgânicos de cadeia curta serem utilizados como fonte de carbono por micro-organismos presentes no reservatório (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009).

3.2.2. Meio de cultura para BRS

O crescimento, manutenção e quantificação do consórcio enriquecido de BRS foram realizados em meio Postgate E modificado, como descrito na Tabela 3.2 (POSTGATE, 1984).

A modificação do meio se deu pela supressão do ácido tioglicólico da composição original. De acordo com Postgate (1984), este meio é constituído dos elementos necessários para o desenvolvimento das BRS, sendo o mais apropriado para a seleção e quantificação de BRS (ROCHA, 2006; NASCIMENTO, 2006; VIEIRA, 2003). Sua composição também serviu como base para a suplementação da água produzida no preparo do meio utilizado nos ensaios experimentais (item 3.2.1).

Tabela 3.2: Composição do Meio Postgate E Modificado para BRS

Componentes	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	0,5
NH_4Cl	1,4
$CaCl_2.2H_2O$	1,0
$MgCl_2.6H_2O$	1,83
Na_2SO_4	1,0
$FeSO_4.7H_2O$	0,5
Agar-agar	1,9
Extrato de levedura	1,0
Ácido ascórbico	0,1
NaCl	60,0
Lactato de sódio (50%)	3,5
Solução de resazurina (0,025%)	0,001

Fonte: Postgate (1984)

O acréscimo de 60 g NaCl/L foi necessário, uma vez que se tratava de um consórcio halofílico. Após preparação, o meio teve seu pH ajustado para 7,8 ± 0,1 com auxílio de NaOH 1 mol/L. O potencial redox abaixo de –100 mV foi estabelecido pela presença do ácido ascórbico como agente redutor no meio. A condição de anaerobiose foi garantida por purga de nitrogênio durante a preparação e distribuição em frascos do tipo penicilina. A presença do indicador resazurina permitiu evidenciar a condição de anaerobiose pela coloração do meio. O meio incolor indicava seu estado reduzido. No entanto, foi possível utilizar um meio ligeiramente róseo, ou seja, com quantidade mínima de oxigênio dissolvido.

O meio foi distribuído em alíquotas de 9 mL em frascos com capacidade de 10 mL que, em seguida, foram vedados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio e, por fim, esterilizados a 1 atm (121°C) por 20 minutos.

3.2.3. Meio de cultura para BRN

A manutenção da cultura de BRN foi feita em meio sugerido pela DSMZ, cuja descrição é apresentada na Tabela 3.3. A salinidade foi ajustada para 60 g de NaCl/L atendendo às exigências dessa linhagem halofílica.

Tabela 3.3: Composição do Meio 1 DSMZ para Manutenção de BRN

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Agar-agar	15,0
NaCl	60,0

Fonte: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

O meio foi preparado sob aquecimento e agitação para assegurar total solubilização dos reagentes. Após ajuste do pH final em 7,2 ± 0,1 com NaOH 1 mol/L, o meio foi dispensado em tubos de ensaio, em alíquotas de 9 mL. Em seguida, os tubos foram vedados com rolhas de algodão e autoclavados a 1 atm (121ºC) por 20 minutos.

O crescimento e a quantificação de BRN foram realizados em meio caldo nitrato a uma salinidade de 60 g NaCl/L, cuja composição é descrita na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Composição Química do Meio para Quantificação de BRN

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
KNO_3	0,5
NaCl	60,0

Fonte: Adaptação de Harley e Prescott (2001)

Após preparação, o meio teve seu pH ajustado para 7,0 ± 0,1 com auxílio de NaOH 1 mol/L. A condição de anaerobiose foi assegurada pela purga de nitrogênio durante a preparação e distribuição em frascos do tipo penicilina. Distribuiu-se o meio em alíquotas de 9 mL em frascos com capacidade de 10 mL que, posteriormente foram vedados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio e esterilizados a 1 atm (121°C) por 20 minutos.

3.3. Coleta e Caracterização Físico-Química da Água Produzida

A água produzida utilizada no estudo foi procedente de uma plataforma *offshore* (P-35) localizada na Bacia de Campos (Campo de Marlim), Rio de Janeiro. A coleta da água

produzida foi realizada por técnicos da Petrobras, sendo transportada para o laboratório, onde foi distribuída em vários recipientes e estocada em freezer até o momento da sua utilização. Foi tomado o cuidado de coletar um volume de água produzida suficiente para todo o estudo, de modo a garantir a mesma composição do meio em todos os experimentos.

A caracterização da água produzida, realizada no início do estudo, foi feita através de análises dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH; alcalinidade; ácidos voláteis; turbidez; sólidos totais, suspensos e dissolvidos; cloreto; sulfato; sulfeto; Demanda Química de Oxigênio (DQO); Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), fenóis e óleos e graxas. Essas características foram importantes como indicativo da presença de materiais tóxicos e de compostos que pudessem ser utilizados pelos micro-organismos como fontes nutricionais.

3.4. Testes de Sensibilidade das Culturas Microbianas à Água Produzida

Ensaios preliminares foram realizados com o intuito de se testar a sensibilidade do consórcio enriquecido de BRS e da cultura de BRN à água produzida. Com a condução dos testes preliminares também foi possível definir a existência de algum composto inibidor do crescimento celular. Sendo assim, foram realizados os testes descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

3.4.1. Sensibilização do consórcio enriquecido de BRS

Os testes de sensibilidade foram realizados através de subcultivos do consórcio de BRS em três diferentes meios constituídos de água produzida, cuja descrição completa é apresentada na Tabela 3.5. Os meios constituídos de água produzida foram suplementados com os mesmos sais descritos no meio Postgate E modificado (conforme item 3.2.2, Tabela 3.2). Os testes 2 e 3 foram executados com água produzida diluída de 1:2 e 1:10, a fim de determinar se seus constituintes suportavam o desenvolvimento deste grupo microbiano e, inclusive, se existia algum composto inibidor do crescimento celular. Ressalta-se que nestes testes, nos quais a água produzida foi diluída, houve o ajuste da salinidade para 6%.

Como inóculo foi empregado 1 mL do cultivo prévio da cultura estoque crescida em meio Postgate E modificado a 30 ± 1°C durante 48 h, correspondendo a um inóculo de 10% (v/v). Após inoculação, os frascos foram incubados a 30 ± 1°C durante 72 h. A formação de

sulfeto de ferro (FeS), com conseqüente enegrecimento do meio, foi o critério estabelecido como indicativo de crescimento (positivo). Cada experimento foi realizado em triplicata a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.

Tabela 3.5: Composição dos Meios para os Testes de Sensibilidade do Consórcio Enriquecido de BRS

Componentes	Composição (g/L) – Testes		
	T1	**T2**	**T3**
KH_2PO_4	0,5	0,5	0,5
NH_4Cl	1,4	1,4	1,4
$CaCl_2.2H_2O$	1,0	1,0	1,0
$MgCl_2.\ 6H_2O$	1,83	1,83	1,83
Na_2SO_4	1,0	1,0	1,0
$FeSO_4.7H_2O$	0,5	0,5	0,5
Agar-agar	1,9	1,9	1,9
Extrato de levedura	1,0	1,0	1,0
Ácido ascórbico	0,1	0,1	0,1
Lactato de sódio (50%)	3,5	3,5	3,5
Solução de resazurina (0,025%)	0,001	0,001	0,001
Água produzida	q.s.p. 1000 mL		
Água produzida diluída (1:2)		q.s.p. 1000 mL	
Água produzida diluída (1:10)			q.s.p. 1000 mL

3.4.2. Sensibilização da cultura de BRN

Também foram realizados testes com água produzida diluída (experimentos 2 e 3) com a mesma finalidade explicitada nos ensaios com o consórcio enriquecido de BRS. As composições dos meios empregados nos três experimentos realizados para testar a sensibilidade da cultura de BRN à água produzida estão na Tabela 3.6. Os meios foram suplementados com os mesmos constituintes descritos no meio caldo nitrato (conforme descrito no item 3.2.3, Tabela 3.4). Enfatizando-se, novamente, que houve ajuste da salinidade do meio para 6% nos testes com água produzida diluída.

Como inóculo foi empregado 1 mL do cultivo prévio da cultura estoque crescida em meio caldo nitrato a 30 ± 1°C durante 48 h, correspondendo a um inóculo de 10% (v/v). Após inoculação, os frascos foram incubados a 30 ± 1°C durante 72 h. A turvação do meio e um teste de confirmação para a redução de nitrato (descrito no item 3.7) foram os critérios estabelecidos como indicativos de crescimento (positivo). Cada experimento foi realizado em triplicata a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.

Tabela 3.6: Composição Química dos Meios para os Testes de Sensibilidade da BRN

Componentes	Composição (g/L) – Testes		
	T1	**T2**	**T3**
Peptona	5,0	5,0	5,0
Extrato de carne	3,0	3,0	3,0
KNO_3	0,5	0,5	0,5
Água produzida	q.s.p. 1000 mL		
Água produzida diluída (1:2)		q.s.p. 1000 mL	
Água produzida diluída (1:10)			q.s.p. 1000 mL

3.5. Planejamento Experimental

Para a obtenção de dados significativos e confiáveis, os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental. Os dados foram analisados estatisticamente para, dentre outras vantagens, permitir a atenuação dos erros experimentais e assegurar a representatividade dos resultados levantados.

Como a produção de sulfeto envolve diversas variáveis, a necessidade de técnicas estatísticas para a análise e planejamento dos experimentos foi pertinente. Desse modo, a escolha de um planejamento fatorial 2^k com adição de pontos centrais foi justificada. A inclusão de pontos centrais ao espaço experimental permitiu testar a linearidade nos efeitos dos fatores e, ao mesmo tempo, estimar independentemente o erro obtido. Os pontos centrais consistiram em n_c réplicas corridas no ponto x_i=0 (i= 1, 2, ..., k). A adição dos pontos centrais a um planejamento não repercutiu nas estimativas usuais dos efeitos em um planejamento 2^k, considerando que os k fatores foram quantitativos.

Os coeficientes de regressão do modelo foram determinados pelo método dos mínimos quadrados e, como medida de adequação do modelo, utilizaram-se o coeficiente de correlação (R^2) e a análise residual. Os dados experimentais foram analisados usando-se o *software* Statistica versão 7.0. As figuras e tabelas apresentadas nos resultados também foram geradas usando-se este mesmo *software*.

No presente estudo, em cada experimento do planejamento experimental, a produção de sulfeto foi tratada como variável resposta, assim, o tratamento estatístico para essa variável foi realizado. O planejamento experimental verificou a influência de três variáveis na

produção de sulfeto de hidrogênio. As variáveis foram: $\mathbf{x_1}$: concentração de BRS (NMP/mL); $\mathbf{x_2}$: concentração de BRN (NMP/mL) e $\mathbf{x_3}$: concentração de nitrato (mg/L).

Os valores das concentrações de nitrato adotadas neste estudo baseiam-se em trabalhos publicados (DINNING et al., 2005; HUBERT et al., 2003; MYHR et al., 2002; LONDRY; SULFITA, 1999). As concentrações de nitrato citadas na literatura são extremamente diversificadas, como apresentado na revisão bibliográfica. E ainda, como estabelecido por Voordouw (2008), a dose de nitrato requerida para mitigar o *souring* necessita ser definida por testes e depende, no caso de sistemas mesófilos, da concentração de doadores de elétrons oxidáveis. Assim, procurou-se estabelecer uma faixa mais ampla de concentração de nitrato, de 127,5 a 727,5 mg/L, que fosse representativa experimentalmente e aplicável em termos comerciais.

A escolha do nitrato de sódio baseou-se principalmente em critérios econômicos e no conhecimento de testes efetuados pela Petrobras com o mesmo sal. Para as concentrações iniciais de BRS e BRN definiram-se valores de ordem de grandeza considerados altos (10^7 NMP/mL) e baixos (10^1 NMP/mL), e com isso estabelecer a sua contribuição, na presença de diferentes concentrações de nitrato, para a mitigação do sulfeto.

A Tabela 3.7 relaciona as variáveis envolvidas no processo e seus respectivos níveis, enquanto a Tabela 3.8 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das três variáveis, com três réplicas no ponto central, totalizando 11 experimentos.

Tabela 3.7: Especificação, Níveis e Respectivos Valores das Variáveis do Processo

		Níveis		
Variáveis	**Especificação**	**-1**	**0**	**+1**
x_1	BRS (NMP/mL)	10^1	10^4	10^7
x_2	BRN (NMP/mL)	10^1	10^4	10^7
x_3	NO_3^- (mg/L)	127,5	427,5	727,5

Tabela 3.8: Matriz do Planejamento com Valores Reais e Codificados das Variáveis

Variáveis Codificadas				Variáveis reais		
Experimentos	**BRS**	**BRN**	**NO_3^-**	**BRS (NMP/mL)**	**BRN (NMP/mL)**	**NO_3^- (mg/L)**
1	-1	-1	-1	10^1	10^1	127,5
2	+1	-1	-1	10^7	10^1	127,5
3	-1	+1	-1	10^1	10^7	127,5
4	+1	+1	-1	10^7	10^7	127,5
5	-1	-1	+1	10^1	10^1	727,5
6	+1	-1	+1	10^7	10^1	727,5
7	-1	+1	+1	10^1	10^7	727,5
8	+1	+1	+1	10^7	10^7	727,5
9	0	0	0	10^4	10^4	427,5
10	0	0	0	10^4	10^4	427,5
11	0	0	0	10^4	10^4	427,5

3.5.1. Avaliação da produção de sulfeto

Esta etapa realizou-se em meio de cultivo MAP, suplementado conforme descrito na Tabela 3.1 (item 3.2.1). As concentrações de BRS, BRN e nitrato de sódio variaram conforme descrito na matriz do planejamento. Esta etapa permitiu estimar as condições experimentais que asseguraram a inibição da produção de sulfeto de hidrogênio no sistema. Ao final de cada etapa experimental foi investigada a produção de sulfeto total.

Para a preparação do MAP, todos os componentes foram solubilizados em água produzida e o pH do meio ajustado em 7,0 ± 0,5 com adição de NaOH 1,0 mol/L. A condição de anaerobiose foi estabelecida por purga contínua de nitrogênio efetuada durante o preparo do meio e a sua distribuição em frascos do tipo penicilina. Para manter inalteradas as propriedades físico-químicas da água produzida, os meios não foram esterilizados. No entanto, tomou-se o cuidado de estabelecer total assepsia durante o preparo do MAP, sendo toda a execução realizada em câmara de fluxo laminar, utilizando-se de vidraria autoclavada a 1 atm (121°C).

Os experimentos foram conduzidos em frascos do tipo penicilina de 50 mL de capacidade com 30 mL de meio reacional (MAP). Antes da inoculação, garantiu-se que o sistema estava em condição de anaerobiose pelo monitoramento inicial do potencial redox através de eletrodo combinado de platina (referência Ag/AgCl), sendo estabelecidos como valores ideais iniciais aqueles próximos ou abaixo de -100 mV. Em seguida, os frascos foram inoculados com 5 mL do consórcio de BRS e 5 mL da cultura de BRN. As concentrações celulares dos inóculos de cada experimento foram estabelecidas por diluições seriadas,

totalizando um volume final nos experimentos (inóculo e meio reacional) de 40 mL, com 10 mL de *headspace* cuidadosamente purgado com gás nitrogênio.

Utilizaram-se inóculos de BRS e BRN com 96 h de crescimento após prévia ativação nos meios Postgate E modificado e caldo nitrato para BRS e BRN, respectivamente. Diluições seriadas em solução salina redutora (pH 7,6) permitiram a obtenção de populações microbianas iniciais de 10^1, 10^4 e 10^7 NMP/mL de BRS e BRN. O tempo de ativação e os procedimentos de diluições foram definidos após estabelecimento da cinética de crescimento para esses micro-organismos.

Os frascos foram incubados a 30ºC, sendo a produção de sulfeto medida no 7º, 14º e 28º dia de incubação. Ainda neste capítulo, descreve-se a metodologia analítica que foi empregada neste estudo. O controle dos experimentos ocorreu em condições abióticas, apenas estabelecendo as concentrações de nitrato.

3.5.2. O efeito de outros parâmetros na produção de sulfeto

O foco do trabalho foi compreender a dinâmica de produção de sulfeto em um sistema anaeróbio. Para tal, propôs-se um modelo empírico de produção de sulfeto, mediante o estabelecimento de condições pré-fixadas experimentalmente. No entanto, considerou-se oportuna a análise isolada, sem tratamento estatístico, de alguns parâmetros que pudessem contribuir para o entendimento dos mecanismos de mitigação de produção de sulfeto. Assim, ainda analisaram-se o consumo de nitrato e sulfato, a produção de nitrito, as concentrações finais de BRS e BRN e o potencial redox final ao término de cada etapa experimental.

3.6. Efeito do Nitrato em Sistema Agitado

Esta etapa consistiu em estimar o efeito da aplicação de nitrato em um sistema agitado, para tanto, realizaram-se experimentos em um biorreator anaeróbio de bancada (Figura 3.1).

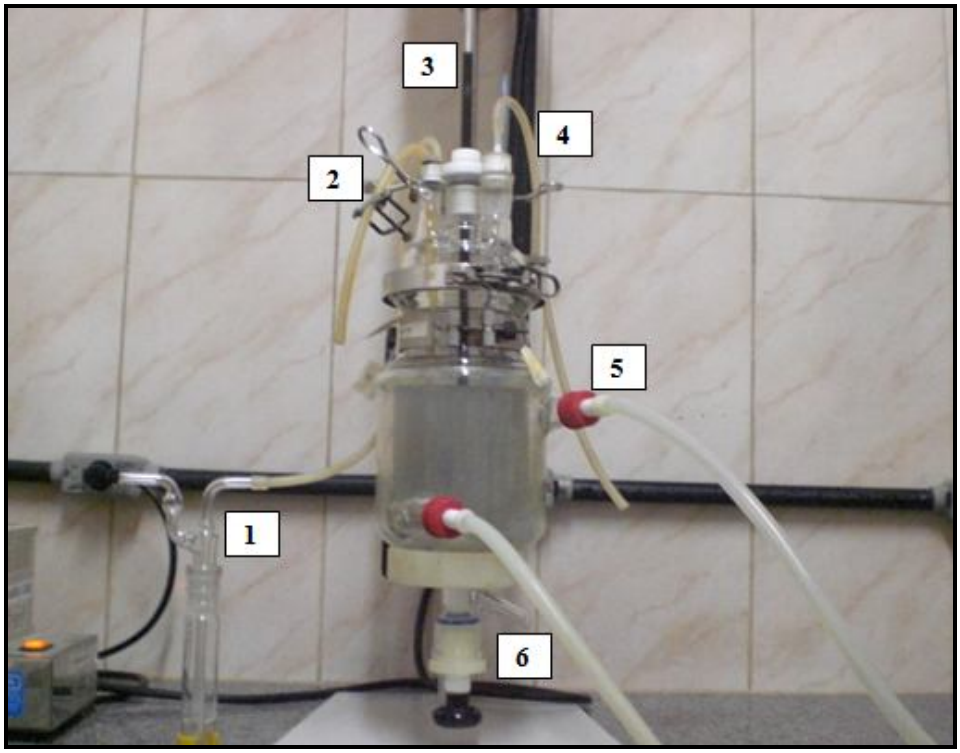


Figura 3.1: Biorreator anaeróbio de bancada utilizado nos experimentos: 1- borbulhador de gás para a adsorção de sulfeto; 2- porte para a adição de inóculo e meio reacional; 3- pá de agitação; 4 – porte para a entrada de nitrogênio; 5- banho de aquecimento; 6 – porte de retirada de amostra

A finalidade desta etapa foi estabelecer algumas das condições de campo concomitantemente, reproduzindo as melhores condições de mitigação do sulfeto encontradas pelo planejamento experimental. As condições iniciais de operação do biorreator foram àquelas relacionadas aos pontos centrais, ou seja, determinaram-se concentrações iniciais de BRS e BRN a 10^4 NMP/mL e concentração inicial de nitrato a 427,5 mg/L. O reator, com um volume útil de 1,1 L, operou em bateladas seqüenciais com meio MAP e controle de temperatura (30°C) e agitação (250 rpm). Antes da inoculação e, para coleta e quantificação do gás sulfídrico gerado, purgas de nitrogênio foram realizadas.

O preparo do inóculo seguiu os mesmos procedimentos descritos no planejamento experimental. O inóculo era transferido para o biorreator através de sistema fechado que permitia a injeção de nitrogênio nos frascos que continham as suspensões celulares, o que resultava em aumento da pressão interna dos mesmos, permitindo sua passagem para o biorreator. O biorreator foi monitorado diariamente através da determinação das concentrações de sulfeto (fase líquida e gasosa), sulfato, nitrato, nitrito e de BRS e BRN planctônicas e sésseis, dependendo das condições da batelada iniciada. O regime de aplicação

de nitrato, bem como o processo corrosivo relacionado a esse tratamento, também foram investigados. O tempo de processo de cada batelada durou 10 dias. Além da reprodução das condições estabelecidas pelo planejamento experimental, realizaram-se bateladas especificamente destinadas aos ensaios de biocorrosão. Para tal, cupons de aço carbono AISI 1020, cuja área total era de 2,46 cm^2, foram fixados no biorreator. Como mostra a Figura 3.2, três (3) cupons foram fixados com o auxílio de fios de náilon, sendo dois (2) cupons destinados aos ensaios de perda de massa, à quantificação de micro-organismos sésseis aderidos à superfície metálica e à dosagem de exopolissacarídeos (EPS), e um (1) cupom destinado à realização de imagens do biofilme formado sobre a superfície metálica através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A fixação dos cupons dentro do biorreator permitiu o contato dos mesmos com o meio reacional e assegurou a fixação das células. Antes dos ensaios, estes cupons foram submetidos a um tratamento prévio consistindo de jateamento de areia para a remoção de incrustações, seguido de imersão em acetona para desengraxamento e, por fim, secagem com jato de ar quente. Para o ensaio de contagem de pite, em cada batelada (4 e 5), um (1) cupom de aço carbono AISI 1020 envolto em resina epóxi e preso por uma haste foi utilizado, tendo sua superfície metálica exposta ao fluído experimental.

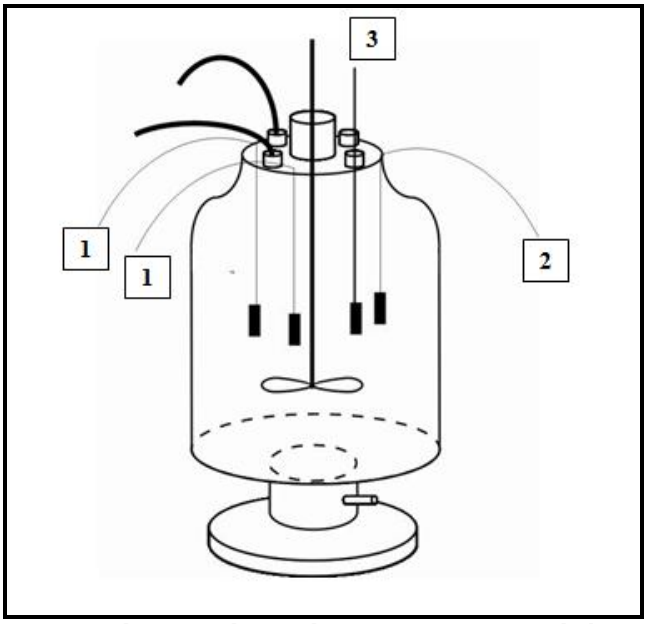


Figura 3.2: Disposição dos corpos-de-prova dentro do reator nos ensaios de biocorrosão: 1- cupons destinados aos ensaios de perda de massa, à quantificação de micro-organismos sésseis e à dosagem de exopolissacarídeos (EPS); 2- cupom destinado à realização de imagens do biofilme formado através de MEV; 3- cupom destinado ao ensaio de contagem de pite

A seguir, listam-se as condições e características das bateladas executadas e suas respectivas análises (Quadro 3.1). Ressalta-se que a descrição detalhada dos procedimentos analíticos empregados nesta etapa encontra-se no item 3.7.

Batelada	Condições Operacionais	Análises Executadas
1	• Meio MAP • Sem injeção de nitrato • BRS = 10^4 NMP/mL • Batelada controle • Duração: 10 dias	• Produção de sulfeto total (fase líquida e gasosa) • Consumo de sulfato • Quantificação de BRS planctônicas
2	• Meio MAP • BRS e BRN = 10^4 NMP/mL • Concentração inicial de NO_3^- = 427,5 mg/L • Regime de aplicação do nitrato = uma única dosagem inicial • Duração: 10 dias	• Produção de sulfeto total (fase líquida e gasosa) • Consumo de nitrato • Consumo de sulfato • Produção de nitrito • Quantificação de BRS e BRN planctônicas
3	• Meio MAP • BRS e BRN = 10^4 NMP/mL • Concentração inicial de NO_3^- = 427,5 mg/L • Regime de aplicação do nitrato = dosagens intermitentes após a formação de sulfeto total no sistema, mantendo a concentração inicial de 427,5 mg/L no meio • Duração: 10 dias	• Produção de sulfeto total (fase líquida e gasosa) • Consumo de nitrato • Consumo de sulfato • Produção de nitrito • Quantificação de BRS e BRN planctônicas
4	• Meio MAP • Sem injeção de nitrato • BRS = 10^4 NMP/mL • Inclusão de quatro (4) corpos-de-prova retangulares de aço carbono AISI 1020 para os testes de corrosão • Batelada controle (ensaios de corrosão) • Duração: 10 dias	• Quantificação de BRS e BRN sésseis no biofilme aderido à superfície metálica do cupom • Perda de massa e taxa de corrosão • Contagem de pites • Exopolissacarídeo (EPS) no biofilme aderido à superfície metálica do cupom • Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para visualização do biofilme aderido à superfície metálica • Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para visualização dos produtos de corrosão • Produção de sulfeto total (fase líquida e gasosa)
5	• Meio MAP • BRS e BRN = 10^4 NMP/mL • Concentração inicial de NO_3^- = 427,5 mg/L • Regime de aplicação do nitrato = dosagens intermitentes após a formação de sulfeto total no sistema, mantendo a concentração inicial de 427,5 mg/L no meio • Inclusão de quatro (4) corpos-de-prova retangulares de aço carbono AISI 1020 para os testes de corrosão • Duração: 10 dias	• Quantificação de BRS e BRN sésseis no biofilme aderido à superfície metálica do cupom • Perda de massa e taxa de corrosão • Contagem de pites • Exopolissacarídeo (EPS) no biofilme aderido à superfície metálica do cupom • Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para visualização do biofilme aderido à superfície metálica do cupom • Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para visualização dos produtos de corrosão • Produção de sulfeto total (fase líquida e gasosa)

Quadro 3.1: Condições operacionais dos experimentos em biorreator utilizando meio MAP

3.7. Procedimentos Analíticos

- pH

O pH foi medido por método potenciométrico utilizando-se medidor de pH Actron DL-14, previamente ajustado com soluções-padrão de pH 4,0 e 7,0.

- Potencial redox

O potencial redox foi avaliado no início e no fim dos ensaios do planejamento experimental. Para tal, empregou-se um eletrodo combinado de platina – referência Ag/AgCl (Quimis). De acordo com APHA (1992), transformou-se o valor do potencial redox em relação ao padrão de hidrogênio (Eh) através da equação abaixo:

$$\text{Eh (sistema)} = \text{Eh (observado)} + \text{Eh (ZoBell)} - \text{Eh (ZoBell observado)} \quad (3.1)$$

sendo:
Eh (ZoBell) = 428 mV
Eh (ZoBell observado) = 224 mV a 25°C.

- Alcalinidade

A alcalinidade total foi medida por método titulométrico que determina a concentração de hidróxidos, carbonatos ou bicarbonatos. Para tanto, adicionou-se à amostra duas gotas do indicador misto (20 mg de vermelho de metila e 100 mg de verde de bromocresol em 100 ml de álcool etílico a 95%) e titulou-se com ácido sulfúrico 0,02 N até viragem da cor azul para laranja (salmão). A alcalinidade, expressa em mg $CaCO_3$/L, foi calculada conforme equação abaixo (3.2), utilizando o volume de ácido sulfúrico gasto na titulação (APHA, 1992):

$$\text{mg } CaCO_3/L = \frac{V \times N \times 5000}{\text{mL da amostra}} \quad (3.2)$$

onde:
V= volume de ácido sulfúrico gasto na titulação
N= normalidade do ácido sulfúrico

- Ácidos voláteis

Os ácidos voláteis da amostra foram determinados pelo Método de Destilação Direta. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi destilado após a adição de ácido sulfúrico 1:1. Os primeiros 15 mL do destilado foram descartados para se eliminar a interferência de H_2S e CO_2. Por fim, o restante do destilado foi titulado empregando-se NaOH 0,1 N e indicador fenolftaleína. Repetiu-se o mesmo procedimento tomando a água destilada no lugar da amostra (branco) (APHA, 1992). A acidez foi expressa em mg de ácidos voláteis como ácido acético/L e calculada como mostra a equação a seguir:

mg de ácidos voláteis como ácido acético/L = mL NaOH x N x 600 (3.3)
onde:
N= normalidade da solução padrão de NaOH

O método ainda exigiu a determinação de um fator de recuperação (*f*) para a correção do valor experimental. Sendo assim, preparou-se uma solução de ácido acético com concentração próxima a esperada para a amostra, diluindo um volume apropriado da solução padrão de ácido acético para 250 mL. A concentração de ácidos voláteis no destilado foi, então, determinada conforme o procedimento descrito anteriormente. Para tanto, o fator de recuperação se deu:

$f = a / b$ (3.4)
onde:
a= concentração de ácidos voláteis no destilado, mg/L
b= concentração de ácidos voláteis na solução padrão utilizada, mg/L

Assim, o valor determinado na análise da amostra foi corrigido através do seguinte cálculo:

$X = (Y – B) / 0,7$ (3.5)
onde:
X= valor corrigido
Y= valor encontrado para a amostra
B= valor encontrado para o branco
f= 0,7

- Turbidez

A turbidez foi determinada em espectrofotômetro HACH DR/2000. O método é uma adaptação do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992). As leituras são feitas a 450 nm em cubeta com caminho ótico de 3 cm contra água destilada (método 750), sendo a turbidez expressa em unidade turbidimétrica *formazin* (FTU).

- Sólidos totais, suspensos e dissolvidos

Determinou-se a concentração de sólidos totais, suspensos e dissolvidos através de método gravimétrico, seguindo a descrição do Standard Methods (APHA, 1992).

Para a determinação de sólidos totais tomou-se uma cápsula de porcelana, levando-a em seguida para estufa a 105-110ºC por 1 h. A cápsula foi esfriada em dessecador durante 40 minutos e posteriormente pesada, obtendo-se P_1 (g). Um volume apropriado da amostra homogeneizada foi colocado na mesma cápsula que foi levada novamente à estufa a 105-110ºC por 12 h ou até se adquirir peso constante. Esfriou-se em dessecador e pesou-se para obter P_2 (g). Então, procedeu-se o seguinte cálculo para a determinação de sólidos totais:

$$\text{Sólido totais mg/L} = \frac{(P_2 - P_1) \times 10^6}{\text{mL da amostra}} \qquad (3.6)$$

Para a determinação de sólidos dissolvidos tomou-se uma cápsula de porcelana, levando-a em seguida para estufa a 105-110ºC por 1 h. A cápsula foi esfriada em dessecador durante 40 minutos e posteriormente pesada, obtendo-se P_1 (g). Um volume apropriado da amostra foi filtrado e transferido quantitativamente para a cápsula de porcelana previamente tarada. Levou-se à estufa a 105-110ºC por 12 h ou até se adquirir peso constante. Esfriou-se em dessecador e pesou-se para obter P_2 (g). Para a determinação de sólidos dissolvidos aplicou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Sólidos dissolvidos mg/L} = \frac{(P_2 - P_1) \times 10^6}{\text{mL da amostra}} \qquad (3.7)$$

Para a determinação de sólidos suspensos tomou-se uma cápsula de porcelana, levando-a em seguida para estufa a 105-110ºC por 1 h. A cápsula foi esfriada em dessecador durante 40 minutos e posteriormente pesada, obtendo-se P_1 (g). Um volume apropriado da amostra foi filtrado, removendo-se o papel de fibra de vidro com o resíduo retido do aparelho de filtração para a cápsula de porcelana previamente tarada. Levou-se à estufa a 105-110ºC por 12 h ou até se adquirir peso constante. Esfriou-se em dessecador e pesou-se para obter P_2 (g). Calcularam-se os sólidos suspensos através da seguinte equação:

$$\text{Sólidos suspensos mg/L} = \frac{(P_2 - P_1) \times 10^6}{\text{mL da amostra}} \qquad (3.8)$$

- Cloreto

A concentração de cloreto presente na água produzida foi determinada pelo Método de Mohr. Titulou-se o íon cloreto com uma solução de nitrato de prata na presença de cromato de potássio e em meio com pH entre 7-10. Devido ao alto teor de salinidade, as amostras de água produzida foram tituladas com nitrato de prata a 0,2137 N. Executou-se o mesmo ensaio em branco (FEEMA, 1983; APHA, 1992). O cloreto é determinado, em mg/L, como mostra a próxima equação:

$$\text{mg/L } Cl^- = \frac{(A-B) \times N \times 35450}{\text{mL amostra}} \qquad (3.9)$$

onde:
A= mL de solução de $AgNO_3$ gastos na amostra
B= mL de solução de $AgNO_3$ gastos no branco
N= normalidade de $AgNO_3$

- Sulfato

Utilizou-se o kit de dosagem *Sulfaver* da marca HACH para a determinação de sulfato. Os íons sulfato da amostra reagem com o bário presente no kit de dosagem, formando um precipitado de sulfato de bário, sendo a turbidez resultante proporcional à quantidade de sulfato contido na amostra. Após o tempo de reação, seguiu-se para a leitura da absorvância em espectrofotômetro HACH DR/2000 em comprimento de onda de 450 nm. O procedimento é uma adaptação do Standard Methods (APHA, 1992).

- Sulfeto Total

A determinação de sulfeto total seguiu uma adaptação do método colorimétrico usando N,N-dimetil-p-fenileno-diamina e cloreto férrico, conforme descrito por Jacobs; Braverman; Hocheiser (1957). A adaptação do método consistiu do tratamento prévio de 1 mL da amostra com igual volume de ácido clorídrico concentrado em frasco do tipo penicilina de 10 mL de capacidade, a 70ºC por 10 minutos, a fim de promover a dissolução dos sulfetos metálicos solúveis presentes na amostra. O gás sulfídrico formado, pela reação do sulfeto com o ácido clorídrico adicionado, foi coletado através de purga de gás nitrogênio em dois lavadores de gás acoplados em série, cada um contendo 10 mL de solução de hidróxido de cádmio. A formação de sulfeto foi evidenciada pelo surgimento de sulfeto de cádmio, um precipitado amarelado, cuja intensidade de coloração está relacionada com a concentração de sulfeto presente na amostra. A dosagem de sulfeto foi feita adicionando-se 0,6 mL de ácido aminosulfúrico em cada lavador de gás, em seguida transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado após a adição de 2 gotas do indicador cloreto férrico. A solução foi mantida em repouso por 30 minutos, sendo a leitura de absorvância feita em espectrofotômetro modelo HACH DR/2000 no comprimento de onda de 670 nm. A concentração de sulfeto foi expressa em mg/L, empregando-se curva-padrão previamente preparada com Na_2S monohidratado P.A., que se encontra nos anexos do trabalho.

- Demanda Química de Oxigênio

Devido à presença de um alto teor de cloreto na água produzida houve a necessidade de se utilizar uma adaptação do método colorimétrico de refluxo fechado, sendo empregada uma solução digestora contendo maior concentração de sulfato de mercúrio (FREIRE; SANT'ANNA JÚNIOR, 1998). A adaptação permitiu a determinação da DQO, sem interferência de cloreto, até a concentração de 6g Cl^-/L. A digestão da amostra foi realizada em digestor de DQO marca HACH modelo 45600, fazendo-se posteriormente a leitura da absorvância a 600 nm em espectrofotômetro marca HACH DR/2000. O valor de absorvância foi convertido em DQO através de curva-padrão previamente preparada com biftalado de potássio como padrão e sob as mesmas condições de reação.

- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A DBO foi determinada como descrito no Standard Methods seguindo a metodologia da diluição padrão (APHA, 1992). Na análise utilizou-se um medidor de oxigênio da marca Digimed modelo DMO-2.

- Fenóis Totais

A determinação de fenóis totais foi através de método colorimétrico utilizando-se 4-aminoantipirina. Os fenóis presentes na amostra destilada reagem com a 4-aminoantipirina em pH 10,0 ± 0,2 na presença de ferricianeto de potássio. A intensidade da cor do produto é lida em absorvância a 510 nm, sendo a mesma proporcional à quantidade de fenol presente na amostra. A concentração de fenóis é expressa em mg/L (APHA, 1992; FEEMA, 1983).

- Óleos e Graxas

A determinação de óleos e graxas foi feita através do método de extração em Soxhlet. Os óleos e graxas da amostra acidificada com HCl a 50% (v/v) foram adsorvidos em uma camada filtrante composta de tecido tipo musselina, filtro de papel e suspensão de terra diatomácea. Com o auxílio de Soxhlet, realizou-se a extração do material retido a uma velocidade de 20 ciclos por hora durante 4 horas, utilizando hexano como solvente. O tempo foi medido a partir da primeira sifonação. Posteriormente, evaporou-se o solvente do frasco de extração em banho-maria a 70°C sob vácuo. Em seguida, o frasco foi seco em estufa a 103°C por 15 minutos e esfriado em dessecador. O resíduo que permaneceu no balão de destilação foi pesado como óleos e graxas. A concentração de óleos e graxas é expressa em mg/L e calculada pela equação 4.10 (APHA, 1992).

$$\text{mg/L óleos e graxas} = \frac{(B-A) \times 10^6}{\text{mL amostra}} \qquad (3.10)$$

onde:
B= peso em g do balão mais resíduo
A= peso em g do balão vazio

- Nitrato e nitrito

A concentração de nitrato foi determinada através de método espectrofotométrico-UV (Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method) (APHA, 1992). A amostra de água produzida foi filtrada para se retirar a interferência por matéria orgânica suspensa. Em seguida, 10 mL da amostra filtrada era tratada com 0,2 mL de HCl (1N) para que se prevenisse uma possível interferência por hidróxidos ou carbonatos em altas concentrações. Logo após, realizou-se a leitura da absorvância em UV em espectrofotômetro HACH DR/5000. Utilizaram-se dois comprimentos de onda, 220 nm e 275 nm. A leitura de absorvância a 220 nm possibilitou uma rápida determinação de nitrato. O comprimento de onda de 275 nm era para se determinar uma possível interferência de matéria orgânica dissolvida. A absorvância final do nitrato foi obtida pela subtração de duas vezes o valor da absorvância a 220nm do valor da absorvância a 275 nm. A determinação de nitrato era através da curva de calibração de soluções-padrão de nitrato de potássio anteriormente preparadas e apresentada nos anexos do trabalho (APHA, 1992).

O nitrito foi determinado através de método colorimétrico proposto nas normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Cinquenta mL da amostra foram transferidos para balão volumétrico, adicionou-se então 1 mL de solução de ácido sulfanílico (8 g de ácido sulfanílico, 750 mL de água destilada e 250 mL de ácido acético, a solução era preparada em capela e os reagentes acrescidos nesta ordem) e 1 mL de solução ∝-naftilamina (5 g de ∝-naftilamina solubilizada em 150 mL de água destilada quente, logo em seguida acrescentou-se 250 mL de ácido acético glacial e completou –se o volume para 1L. Por fim, filtrou-se a solução em camada de algodão). Agitou-se e levou-se a repouso por 15 minutos na ausência de luz. A coloração vermelha desenvolvida foi lida em espectrofotômetro a 520 nm. A quantidade de nitrito era determinada por curva padrão previamente estabelecida. Realizou-se, de forma análoga ao procedimento com amostra, o ensaio com água destilada para zerar o espectrofotômetro. A curva-padrão encontra-se nos anexos.

- Quantificação de BRS e BRN

Foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP), triplicata para cada diluição (conforme arranjo de Harrican e MacCance, 1976), em meios específicos (HARRISON

JÚNIOR, 1982), meio Postgate E modificado (item 3.2.2., Tabela 3.2) e meio caldo nitrato (item 3.2.3., Tabela 3.4) para a cultura de BRS e de BRN, respectivamente.

Para quantificação dos micro-organismos na fase planctônica, amostras de cada ensaio foram diluidas em frascos do tipo penicilina de 10 mL de capacidade, contendo 9 mL de solução salina redutora (Tabela 3.9) previamente purgada com nitrogênio e com pH ajustado para 7,6. Após o preenchimento, cada frasco foi vedado com tampa de borracha e selado com lacre de alumínio. Eram feitas diluições decimais sucessivas (10^{-1} a 10^{-10}), com auxílio de seringa estéril, sendo 1 mL de cada diluição inoculada nos meios acima especificados.

Já para a quantificação da população séssil, que ocorreu apenas nos ensaios agitados (bateladas 4 e 5), aportou-se do aparato dos ensaios de biocorrosão executados. Assim, retiraram-se os biofilmes aderidos aos cupons de aço carbono AISI 1020 afixados dentro do reator (detalhes do *layout* apresentado no item 3.6). Ao fim das bateladas 4 e 5, os cupons foram retirados e raspados com o auxílio de uma espátula estéril em solução salina redutora (Tabela 3.9) a fim de obter uma suspensão celular. A partir dessa suspensão eram feitas diluições decimais sucessivas (10^{-1} a 10^{-10}) e, com auxílio de seringa estéril, transferia-se 1 mL de cada diluição em meios específicos descritos anteriormente.

Tabela 3.9: Composição Química da Solução Salina Redutora

Componentes	Concentração (g/L)
Tioglicolato de sódio	0,124
Ácido ascórbico	0,1
Resazurina (0,025%)	0,001
NaCl	60,0

A quantificação de BRS foi realizada após incubação a 30 ± 1ºC por 28 dias, sendo o seu crescimento identificado pela mudança da cor do meio de cultura, de incolor ou ligeiramente rosa para preto, devido à formação de precipitado de sulfeto de ferro (FeS).

A concentração de BRN era quantificada após incubação a 30 ± 1ºC por 14 dias, sendo o crescimento considerado positivo pela turvação do meio e pela confirmação do teste de redução de nitrato através do uso do reagente de Griess-Ilosvay (ácido sulfanílico e N-N dimetil-alfa-naftilamina). Este reagente é capaz de detectar a presença de íons nitrito no meio, produzindo uma coloração vermelha, que é proporcional à concentração de nitrito. Altas concentrações de nitrito no meio podem converter rapidamente a cor vermelha desenvolvida

em amarela. Com o auxílio de uma seringa, duas gotas do reagente eram adicionadas aos frascos de penicilina que continham o meio de quantificação. O desenvolvimento da cor vermelha indicava a presença do nitrito formado pelo metabolismo das BRN (HARLEY; PRESCOTT, 2002).

- Ensaios de perda de massa

Para os ensaios de perda de massa, acrescentaram-se nas bateladas 4 e 5 do biorreator, cupons de aço carbono AISI 1020 retangulares. Os cupons apresentavam uma área aproximada de 2,46 cm^2, sendo consideradas ambas as faces. Os cupons foram limpos e fixados dentro do biorreator como descrito no item 3.6. Até o momento do ensaio, os cupons foram mantidos em dessecador, quando foram pesados ao décimo de miligrama. No fim dos experimentos esses cupons foram retirados e raspados para a remoção dos micro-organismos aderidos. Em seguida, foram tratados, de acordo com a Norma ASTM G1-90 (1999), que padroniza a metodologia para medidas de perda de massa em laboratório.

Esse tratamento consistiu na imersão dos corpos-de-prova em solução de Clark (ácido clorídrico, óxido de antimônio III e cloreto estanhoso) por 35 segundos para a decapagem do metal, ou seja, para a retirada dos produtos de corrosão aderidos à superfície desse metal. Esse tempo foi definido após prévia curva de decapagem. Após a decapagem, os cupons foram lavados com água destilada, em seguida imersos em álcool etílico 99,8% e, finalmente, secos com jato de ar quente. Terminado o tratamento, os cupons foram pesados em balança analítica ao décimo de miligrama. O valor correspondente à diferença dos pesos de cada cupom antes e após os ensaios, divididos pela área total do corpo-de-prova representa a massa perdida num dado tempo.

Os resultados de perda de massa foram utilizados no cálculo da taxa de corrosão, de acordo com a seguinte equação (3.11):

$$\text{Taxa de corrosão (mm/ano)} = \frac{\text{perda de massa (g) x 365 (dias/ano) x 10 (mm/cm)}}{\text{densidade do metal (g/cm}^3\text{) x área(cm}^2\text{) x tempo (dias)}} \quad (3.11)$$

Com o propósito de avaliar a taxa de corrosão do aço carbono durante os ensaios de perda de massa, adotou-se a Norma NACE RP-07-75 (1999), que caracteriza a intensidade do processo corrosivo. A Tabela 3.10 apresenta brevemente esta classificação.

Tabela 3.10: Classificação da taxa de corrosão do aço carbono

Taxa de corrosão uniforme (mm/ano)	Corrosividade
< 0,025	Baixa
0,025 a 0,120	Moderada
0,130 a 0,250	Alta
> 0,250	Severa

- Avaliação da corrosão por pite

Para a avaliação da corrosão por pite, nas bateladas 4 e 5 preparam-se cupons de aço carbono AISI 1020 envoltos em resina epóxi (descrição no item 3.6). Antes do uso, os cupons foram lixados usando lixas nº 600, desengordurados por imersão em acetona e secos com jato de ar quente para assegurar uma superfície uniforme e livre de imperfeições que poderiam comprometer a determinação da densidade e profundidade dos pites (Norma ASTM G 46/94, 2005). Realizou-se também, antes do início dos ensaios, inspeção visual da superfície metálica desses cupons em estereoscópio (Marca Alicona, modelo InfiniteFocus) em aumento de 50X. Após a finalização dos ensaios, os cupons foram retirados e submetidos à decapagem com solução de Clark para remoção dos biofilmes e dos produtos de corrosão aderidos. Por fim, foram inspecionados novamente com estereoscópio, quanto à presença e distribuição dos pites ao longo da superfície metálica corroída, em aumento de 50X, 100X e 200X. A profundidade dos pites foi determinada também com o auxílio do estereoscópio, utilizando um programa que correlaciona a diferença entre as leituras de foco do ajuste fino da superfície do metal e da base do pite.

- Dosagem de exopolissacarídeo (EPS)

Para analisar o teor de EPS presente no biofilme optou-se pelo método de Dubois et al. (1956), conforme adaptação de Cammarota; Sant'anna Júnior (1998). Os cupons utilizados nos ensaios foram raspados em água destilada e 1 mL dessa suspensão celular, obtida através

da raspagem da superfície metálica, foi acrescentada em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de fenol a 5%. Logo após, agitou-se em vortex e adicionou-se rapidamente 5,0 mL de H_2SO_4 concentrado diretamente sobre a mistura. Essa mistura foi colocada em repouso por 10 minutos ao abrigo da luz. Transcorrido o tempo de repouso, agitou-se novamente em vortex e levou-se a banho-maria a 25 – 30 ^oC durante 15 minutos. Leu-se absorvância a 490 nm contra um branco preparado com água destilada. Para a determinação dos EPS presentes no biofilme, que foram expressos em termos de unidades equivalentes de glicose, preparou-se uma curva- padrão com glicose que se encontra nos anexos.

- Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

Cupons de ação carbono AISI 1020, nas bateladas 4 e 5 do biorreator, também foram reservados para a realização de imagens do biofilme aderido à superfície metálica e para a caracterização dos produtos de corrosão através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), respectivamente. Para tanto, após sua retirada dos ensaios, esses cupons foram processados com a finalidade de manter a integridade do material a ser visualizado. Para a fixação do material biológico, os cupons foram mantidos durante 24 h em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) preparado com água destilada a uma salinidade de 6%. Após 24 h, os cupons foram retirados dessa solução e lavados três vezes em tampão cacodilato 0,1 M, sendo cada tempo de lavagem de 15 minutos. Em seguida, o material biológico aderido aos cupons foi desidratado, em série crescente de 15 minutos cada, em álcool etílico 30, 50, 70 e 99,8%. Por fim, efetuou-se o ponto crítico de secagem do material em equipamento de ponto crítico da marca BAL-TEC CPD – Critical Point Dryer 030. A finalidade desse procedimento foi substituir todo o líquido residual do biofilme por CO_2 líquido, que a 31ºC e 73 atm de pressão rapidamente converte-se em CO_2 gasoso (GOLDSTEIN et al, 2003). Findo o tempo de secagem, a superfície do material foi submetida à metalização em ouro (15 nm de espessura) no aparelho Sputter Coater SCD-040 Electron Probe Microanalyzer. Os cupons então metalizados foram examinados quanto ao biofilme bacteriano e aos produtos de corrosão associados à sua superfície através de MEV e de EDS, empregando-se para tal um microscópio Zeiss DSM 940 dotado de um detector de EDX Link e de um sistema automático de análise de imagens Kontron.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Físico-Química da Água Produzida Utilizada no Estudo

A Tabela 4.1 a seguir apresenta a caracterização físico-química da água produzida coletada na plataforma *offshore* P-35 da Bacia de Campos, Rio de Janeiro.

Tabela 4.1: Caracterização físico-química da água produzida

Parâmetro	Valor
pH	7,4
DQO (mg O_2/L)	875
DBO_5 (mg O_2/L)	733
Sólidos totais (mg/L)	48259
Sólidos dissolvidos totais (mg/L)	48084
Sólidos suspensos totais (mg/L)	175
Alcalinidade total (mg $CaCO_3$/L)	228
Turdidez (FTU)	112
Sulfato (mg/L)	1650
Sulfeto (mg/L)	4,8
Cloreto (g/L)	36,4
Óleos e graxas (mg/L)	58,0
Ácidos voláteis (mg HAc/L)	5797
Fenóis totais (mg/L)	1,0
Nitrato (mg/L)	27,5

Observa-se que a água produzida utilizada neste estudo apresenta as mesmas características de outras previamente analisadas, embora as concentrações de alguns componentes sejam bem inferiores. No trabalho de Vieira (2003), por exemplo, a água produzida coletada na Bacia de Campos apresentou DQO e DBO_5 de 4730 e 1940 mg 0_2/L, respectivamente, e concentrações de fenóis totais e cloretos de 1,9 mg/L e 41,0 g/L. No entanto, os valores de pH (7,4), óleos e graxas (49 mg/L) e ácidos voláteis (5256 mg/L) são semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Verifica-se que a água produzida na P-35 não apresenta concentrações elevadas de fenóis, óleos e graxas e até mesmo de sais. Provavelmente, os baixos níveis de compostos orgânicos sejam conseqüência da operação mais eficiente do sistema de separação água/óleo.

A salinidade, representada pelos íons cloreto, é superior à salinidade da água do mar, com valor de pH próximo à neutralidade. Por isso, foi feito um estudo para avaliar a suplementação da água produzida com sais essenciais e fonte de carbono a fim de favorecer a atividade microbiológica na respiração do sulfato, visto ser fundamental para se estabelecer o efeito do tratamento com nitrato na biogênese do sulfeto.

4.2. Sensibilização das Culturas Microbianas à Água Produzida

4.2.1. Cultura de BRS

O consórcio enriquecido de BRS foi avaliado em meios constituídos de água produzida, suplementados com os mesmos sais descritos no meio Postgate E modificado, com a finalidade de determinar se seus constituintes suportavam o desenvolvimento microbiano e ainda se a água produzida apresentava algum inibidor do crescimento celular (item 3.4.1). Percebeu-se que em todos os testes, até mesmo nos meios com água produzida diluída (meios 2 e 3), houve crescimento do consórcio enriquecido de BRS, como apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Testes de sensibilidade do consórcio enriquecido de BRS à água produzida

Testes	Crescimento
1 – Água produzida	+ + +
2 - Água produzida diluída (1:2)	+ + +
3- Água produzida diluída (1:10)	+ + +

O crescimento foi observado pelo enegrecimento acentuado do meio devido a formação de FeS, e pela produção de H_2S, gás com odor característico. Corroborou-se, qualitativamente, a formação de gás sulfídrico, pela reação de H_2S com uma solução de hidróxido de cádmio, que tem como produto de reação o CdS, um precipitado amarelado. Os testes de sensibilidade demonstraram a viabilidade do emprego da água produzida no planejamento experimental, mesmo considerando a diversidade de compostos químicos presentes nesta água.

4.2.2. Cultura de BRN

O procedimento para testar a sensibilidade da cultura de BRN à água produzida foi descrito no item 3.4.2. Como ocorreu com a cultura de BRS, esta fase do trabalho foi importante para o estabelecimento das condições ideais para o desenvolvimento do planejamento experimental. A Tabela 4.3 apresenta o crescimento de BRN durante os testes 1 a 3.

Tabela 4.3: Testes de sensibilidade da cultura de BRN à água produzida

Testes	Crescimento
1 – Água produzida	+ + +
2 - Água produzida diluída (1:2)	+ + +
3- Água produzida diluída (1:10)	+ + +

A cultura de BRN apresentou crescimento nos três testes, o que comprovou novamente que a água produzida, mesmo sem sofrer diluição, foi capaz de suportar o crescimento deste grupo microbiano. A cultura de BRN mostrou-se capaz de crescer em meio constituído de água produzida, utilizando nitrato como aceptor final de elétrons. A confirmação do crescimento da cultura de BRN foi a aplicação do teste para a redução de nitrato nos meios ensaiados. O desenvolvimento da cor vermelha nos meios, mediante o uso do reagente Griess-Ilosvay, indicou a presença de íons nitrito resultantes da redução desassimilativa de nitrato pelas BRN nos três testes. Como ocorreu no consórcio enriquecido de BRS, os testes de sensibilidade comprovaram a viabilidade do uso da água produzida para o planejamento experimental.

4.3. Planejamento Experimental

4.3.1. Produção biogênica de sulfeto: tratamento estatístico dos dados

Os meios de cultivo com água produzida permitiram o crescimento tanto de BRS como de BRN, assegurando sua viabilidade no decorrer dos ensaios. A Tabela 4.4 apresenta os valores da produção biogênica de sulfeto aos 7, 14 e 28 dias de incubação em relação às variáveis independentes estabelecidas no estudo. Consideraram-se, nos dados apresentados, os

valores médios de produção de sulfeto já subtraídos dos valores obtidos nos respectivos controles abióticos, cujos valores foram inferiores a 1 mg S^{2-}/L.

Tabela 4.4: Resultados do planejamento experimental aos 7, 14 e 28 dias de incubação para a produção de sulfeto (mg/L)

Experimentos	**Condições experimentais**			**Produção de S^{2-}(mg/L)**		
				Tempo de incubação (dias)		
	BRS (NMP/mL)	**BRN (NMP/mL)**	**NO_3^- (mg/L)**	**7 (Y1)**	**14 (Y2)**	**28 (Y3)**
1	10^1	10^1	127,5	2,6	42,2	45,6
2	10^7	10^1	127,5	26,4	27,3	41,9
3	10^1	10^7	127,5	18,6	31,1	34,8
4	10^7	10^7	127,5	39,2	40,0	43,3
5	10^1	10^1	727,5	3,5	8,3	9,4
6	10^7	10^1	727,5	12,7	23,9	52,9
7	10^1	10^7	727,5	4,8	38,9	50,8
8	10^7	10^7	727,5	34,5	34,4	41,4
9	10^4	10^4	427,5	0,4	35,5	37,7
10	10^4	10^4	427,5	0,7	32,5	41,5
11	10^4	10^4	427,5	1,6	30,0	44,8

Com os resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes de regressão para os distintos tempos de incubação, como apresentado na Tabela 4.5. Os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações foram estimados pelo método dos mínimos quadrados, tendo sido estabelecido um intervalo de confiança de 95%.

Observa-se que para as respostas Y1, Y2 e Y3 a curvatura não foi significativa, ou seja, na região investigada não existiam termos quadráticos e os modelos comportaram-se de maneira linear. Deste modo, determinaram-se, para cada resposta, os modelos empíricos (4.1) a (4.3) a seguir, nos quais se descartaram todos os parâmetros não significativos (com valor de p superior a 0,05).

$$Y1 = 17,77 + 10,42.BRS + 6,5.BRN - 3,90.NO_3^- + 2,17.BRS.BRN + 2,94.BRS.BRN.NO_3^- \quad (4.1)$$

$$Y2 = 30,75 + 5,33.BRN - 4,40.NO_3^- + 4,93.BRN.NO_3^- - 5,51.BRS.BRN.NO_3^- \quad (4.2)$$

$$Y3 = 40,01 - 8,13.BRS.BRN.NO_3^- \quad (4.3)$$

Tabela 4.5: Coeficientes de regressão para as respostas Y1, Y2 e Y3

Fatores	**Coef. Regressão**	**Teste *t*-Student**	**p-valor**
Incubação: 7 dias (Y1)			
Constante	17,77	79,97	0,000156
Curvatura	-2,16	-3,78	0,063547
Concentração inicial de BRS	10,42	46,91	0,000454
Concentração inicial de BRN	6,50	29,25	0,001167
Concentração inicial de nitrato	-3,90	-17,57	0,003223
BRS x BRN	2,17	9,77	0,010324
BRS x NO_3^-	-0,70	-3,15	0,087717
BRN x NO_3^-	-0,72	-3,26	0,082487
BRS x BRN x NO_3^-	2,94	13,25	0,005645
Incubação: 14 dias (Y2)			
Constante	30,75	31,59	0,001001
Curvatura	7,40	2,95	0,098273
Concentração inicial de BRS	0,64	0,66	0,576466
Concentração inicial de BRN	5,33	5,47	0,031799
Concentração inicial de nitrato	-4,40	-4,52	0,045613
BRS x BRN	0,47	0,48	0,677724
BRS x NO_3^-	2,13	2,19	0,160334
BRN x NO_3^-	4,93	5,07	0,036805
BRS x BRN x NO_3^-	-5,51	-5,66	0,029871
Incubação: 28 dias (Y3)			
Constante	40,01	31,63	0,000998
Curvatura	13,80	4,23	0,051602
Concentração inicial de BRS	4,86	3,84	0,061491
Concentração inicial de BRN	2,57	2,03	0,178919
Concentração inicial de nitrato	-1,38	-1,09	0,389623
BRS x BRN	-5,09	-4,03	0,056464
BRS x NO_3^-	3,66	2,89	0,101787
BRN x NO_3^-	4,91	3,88	0,060525
BRS x BRN x NO_3^-	-8,13	-6,42	0,023379

A validade dos modelos também foi verificada pela análise da variância através do teste F, comparando-se os valores de F dos modelos com os valores de F tabelados, como mostra a Tabela 4.6.

Enfatiza-se que, nas análises de variância dos modelos, levaram-se em conta apenas os parâmetros significativos, nos quais o valor de p encontrava-se abaixo de 0,05. Para as respostas Y1 e Y2, correspondentes aos tempos de incubação de 7 e 14 dias, respectivamente, observa-se que o modelo matemático foi altamente significativo, conseguindo explicar

99,57% e 93,60% da variação total em torno da média, sendo os valores de F calculado (184,78 e 11,72) maiores que os valores de F tabelado (6,26). Nota-se que para essas respostas o teste de falta de ajuste não foi significativo, sendo os valores de F calculado (10,28 e 2,72) menores que o F tabelado (19,0), reafirmando que os dados se ajustaram bem ao modelo linear. No entanto, para a resposta Y3, correspondente a 28 dias de incubação, o valor do coeficiente de correlação foi consideravelmente baixo (R^2= 40,52%), com valor de F calculado (0,54) menor que o tabelado (6,26). Para este modelo, o teste de falta de ajuste passou a ser significativo, com um valor de F calculado (29,87) maior que o tabelado (19,0). Sendo assim, pode-se aferir que para o tempo de incubação de 28 dias, o modelo não se ajustou bem aos dados. Provavelmente, as condições ideais para a redução da produção de sulfeto foram atingidas em tempo menor do que 28 dias. Ainda como aporte da análise residual, pode-se confirmar as exposições acima analisando-se os gráficos da probabilidade normal dos resíduos (Figura 4.1). Percebe-se que, para os tempos de incubação de 7 e 14 dias (Figuras 4.1A e 4.1B, respectivamente), os resíduos obedecem à distribuição normal, fato não observado para o tempo de 28 dias de incubação (Figura 4.1C).

Tabela 4.6: Análise da variância para as respostas Y1, Y2 e Y3

Causa de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal}
Incubação: 7 dias (Y1)				
Regressão	2059,15	5	411,83	184,78
Resíduos	8,915	4	2,23	
Lack of fit	8,125	2	4,06	10,28
Erro puro	0,790	2	0,39	
Total	2068,065	9		
R^2 = 99,57%				
Incubação: 14 dias (Y2)				
Regressão	827,4	5	165,48	11,72
Resíduos	56,49	4	14,12	
Lack of fit	41,32	2	20,66	2,72
Erro puro	15,17	2	7,58	
Total	883,89	9		
R^2 = 93,60%				
Incubação: 28 dias (Y3)				
Regressão	532,32	5	106,46	0,54
Resíduos	790,35	4	197,59	
Lack of fit	764,74	2	382,37	29,87
Erro puro	25,61	2	12,80	
Total	1322,67	9		
R^2 = 40,25%				

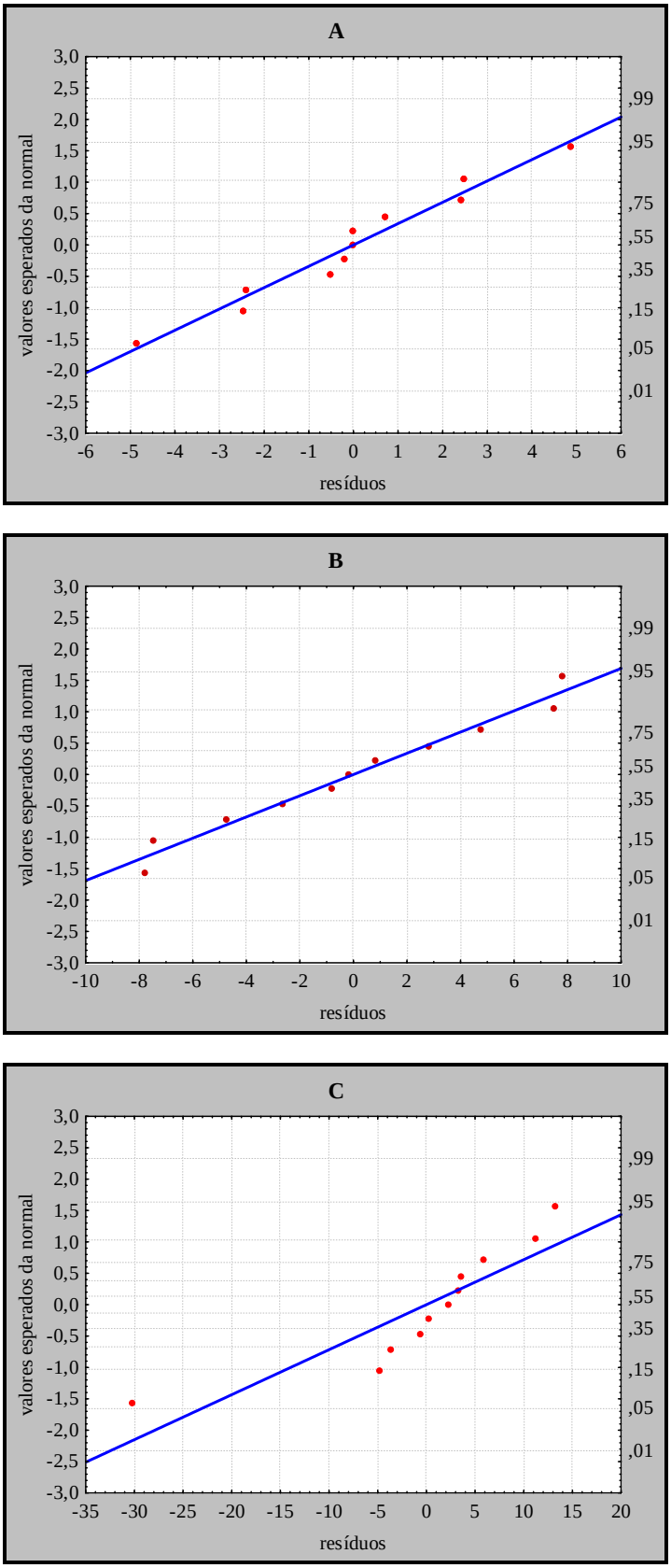


Figura 4.1: Probabilidade normal dos resíduos para as respostas Y1 (A), Y2 (B) e Y3 (C)

Diante dos resultados apresentados, foi realizada apenas a análise estatística da geração de sulfeto com 7 e 14 dias de incubação, uma vez que para estas condições os modelos são tidos como ajustados. Para a produção de sulfeto no período de 7 dias (Y1), observou-se que os menores valores de sulfeto produzido ocorreram nos experimentos 1, 5, 7, 9 ,10 e 11 (Tabela 4.4) sendo que nos experimentos 9, 10 e 11, que correspondem aos pontos centrais do planejamento experimental, foram verificadas as menores concentrações. Assim, pode-se concluir que as menores quantidades de sulfeto produzidas estão diretamente relacionadas com concentrações de BRS iguais ou inferiores a 10^4 NMP/mL. Nestas condições, o aumento da concentração inicial de NO_3^- (do nível inferior para o superior) manteve a concentração de sulfeto baixa (experimentos 1 e 5) ou reduziu sua produção (experimentos 3 e 7). Os experimentos 2, 4 e 8 apresentaram os maiores valores de sulfeto produzido, nos quais maiores concentrações iniciais de BRS foram empregadas. Dentre todas as condições avaliadas, a mais efetiva para a diminuição da acidificação, com geração de apenas 0,4 – 1,6 mg S^{2-}/L (para uma população inicial de BRS e BRN de 10^4 NMP/L), consistiu na aplicação de 427,5 mg/L de nitrato no sistema.

Os fatores considerados significativos para a produção de sulfeto, no intervalo de 7 dias, podem ser facilmente visualizados pelo emprego do Diagrama de Pareto, apresentado na Figura 4.2. Os efeitos nos quais os retângulos se dispõem após a linha divisória (p = 0,05) podem ser considerados significativos no modelo matemático.

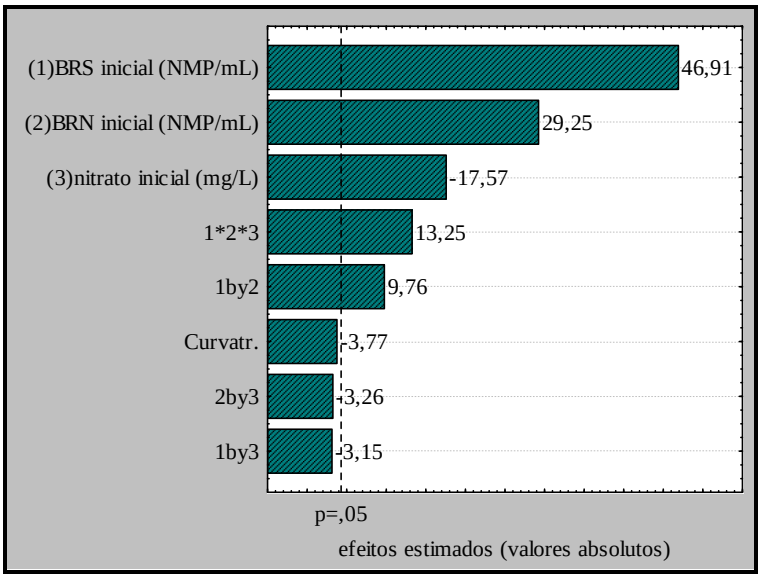


Figura 4.2: Diagrama de Pareto para a resposta Y1 – 7 dias de incubação

Analisando-se os fatores, observa-se que as populações de BRS e BRN apresentaram efeitos positivos na produção de sulfeto, ou seja, o aumento dessas populações contribuía para o aumento da produção de sulfeto, sendo o efeito da população de BRS consideravelmente maior que o da população de BRN. Nota-se também que as interações BRS, BRN e NO_3^- e BRS e BRN influenciaram significativamente a produção de sulfeto. A concentração de NO_3^- foi o único efeito que influenciou significativamente na redução da produção de sulfeto (sinal negativo), o que implica dizer que um aumento da concentração de nitrato conduzia a uma redução da produção de sulfeto. O comportamento do modelo para a produção de sulfeto também pode ser visualizado através de gráficos das médias, mediante variação das populações de BRS e BRN e concentrações de nitrato, como apresentado na Figura 4.3.

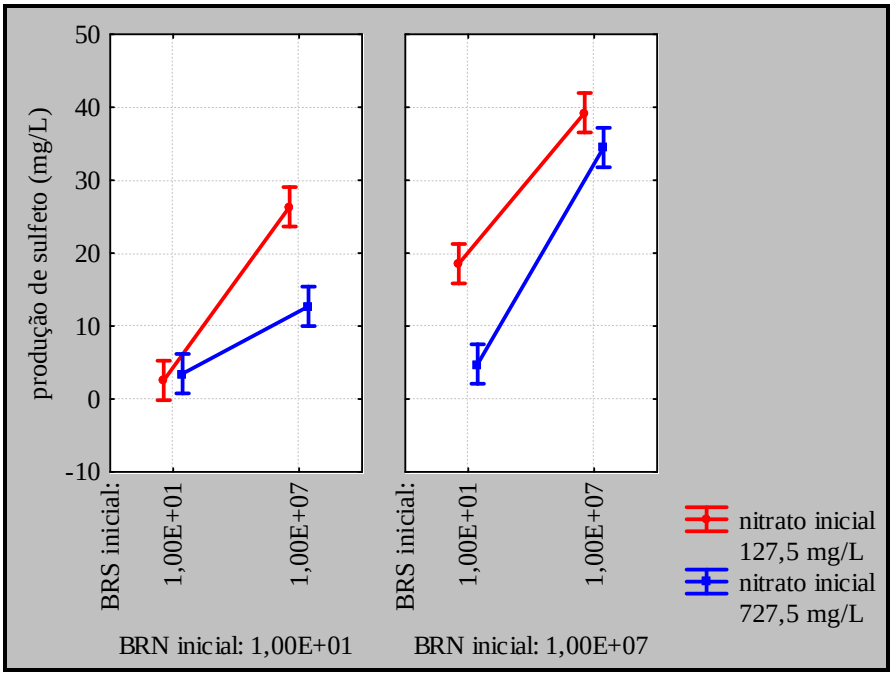


Figura 4.3: Gráfico das médias para a resposta Y1 – 7 dias de incubação

Menores valores de sulfeto foram obtidos com baixa concentração inicial de BRS, ou seja, aumentando-se a concentração de BRS, a produção de sulfeto aumentava. No entanto, a concentração final de sulfeto foi menor na presença de maiores concentrações de NO_3^-. Na presença de baixas concentrações de BRS e BRN, a injeção de nitrato não teve qualquer efeito sobre a produção de sulfeto. Quando a população de BRN foi maior que a de BRS (10^6 vezes maior) a aplicação de maiores concentrações de NO_3^- reduziu consideravelmente a produção

de sulfeto (em torno de 74% - Tabela 4.4). Redução menor (em torno de 52% - Tabela 4.4) foi observada para baixas concentrações de BRN e altas concentrações de BRS ao se aumentar a concentração de nitrato, o que pode indicar a utilização de NO_3^- pelas BRS. Quando ambas as populações estavam presentes em níveis mais elevados (10^7 NMP/mL), a injeção de elevada dosagem de NO_3^- (727,5 mg/L) não evitou a produção de sulfeto.

Os dados sugerem que a injeção de maiores quantidades de NO_3^- pode não resolver o problema de *souring* em alguns reservatórios. Dados da literatura mostram que a concentração de nitrato a ser adotada para a mitigação do *souring* é dependente de fatores como a concentração da fonte de carbono a ser oxidada e relaciona-se intensamente com as características microbiológicas e ambientais do reservatório. Jenneman et al. (1999) demonstraram, em testes de campo, que a aplicação de 207 mg/L de NO_3^- foi suficiente para a remoção total de sulfeto. Enquanto a inibição de *souring* com aplicações de 80 mg/L de NO_3^- e a remoção completa de H_2S com dosagens de 100 mg/L de NO_3^- é reportada por outros autores (DINNING et al., 2005). Londry e Sulfita (1999), em testes de laboratório, propuseram dosagens bem mais elevadas, da ordem de 3100 mg/L de NO_3^- para reduzir em 90% a redução de sulfato. Em contrapartida, Myhr et al. (2002) reportaram que 31 mg/L de NO_3^- foram suficientes para a inibição completa da produção de sulfeto em testes em coluna que simulavam o comportamento de reservatórios de petróleo.

Para a resposta correspondente a 14 dias de incubação (Y2), os resultados demonstram que, com exceção do experimento 5, a produção de sulfeto alcançou níveis superiores a 23 mg/L (Tabela 4.4). Tais valores podem estar relacionados com o esgotamento da fonte de nitrato no sistema. O menor valor de sulfeto foi detectado no experimento 5, que apresentava como condições iniciais baixas concentrações de BRS e BRN. Este foi o único ensaio em que o nitrato ainda se mantinha disponível no sistema ao final dos 14 dias de incubação, verificando-se valores próximos a 60% da concentração inicial do íon (436,2 mg/L). Mantendo-se baixas concentrações iniciais de BRS e BRN e menor injeção de nitrato (experimento 1), já não foi possível impedir a produção de sulfeto, que atingiu valor superior a 40 mg/L. Assim, pode-se considerar que em todos os experimentos, após o esgotamento do nitrato, ocorreu elevada produção de sulfeto (23,9 – 42,2 mg/L - Tabela 4.4.), alcançando-se valores semelhantes independente da concentração inicial de nitrato no sistema.

O gráfico de Pareto (Figura 4.4) apresenta os fatores mais significativos na produção de sulfeto para o tempo de 14 dias de incubação. Nota-se que tanto os termos de interação

como os efeitos principais são importantes na resposta. No entanto, percebe-se que o efeito da população de BRS não é mais significativo na produção de sulfeto. O termo de interação BRS.BRN.NO_3^- (efeito negativo) foi o mais importante, seguido do efeito BRN, da interação BRN.NO_3^- (com efeitos positivos) e do efeito NO_3^-que ainda se mantém como efeito negativo, ou seja, o aumento de sua concentração provocava redução na resposta. Isso nos leva a concluir que o nitrato, mesmo na presença de baixa população de BRN, pode mitigar a produção de sulfeto na presença de espécies de BRS capazes de utilizar este íon como aceptor final de elétrons (DINNING et al., 2005).

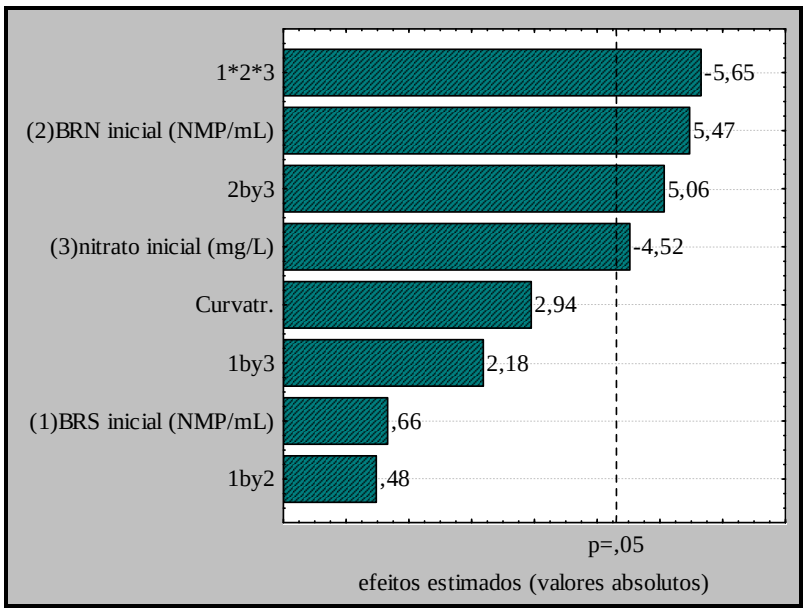


Figura 4.4. Diagrama de Pareto para a resposta Y2 – 14 dias de incubação

Pelo comportamento dos gráficos das médias (Figura 4.5) observa-se que para as menores concentrações iniciais de BRS e BRN, a injeção de maior concentração de nitrato (727,5 mg/L) conseguiu manter a produção de sulfeto baixa. Quando se aumentou, em cerca de 10^6, a população inicial de BRS, uma maior injeção de nitrato não apresentou efeito na mitigação do sulfeto. Quando se aumentou em 10^6 a população de BRN, independente da concentração inicial de BRS, maiores injeções de nitrato não garantiram a queda da produção de sulfeto. Resumidamente, para a maioria das condições avaliadas, uma maior injeção de nitrato, no intervalo de 14 dias, não impediu uma alta produção de sulfeto. A interseção ou o

cruzamento das linhas nos gráficos das médias indica a importância dos termos de interação nos mecanismos da resposta investigada (Y2).

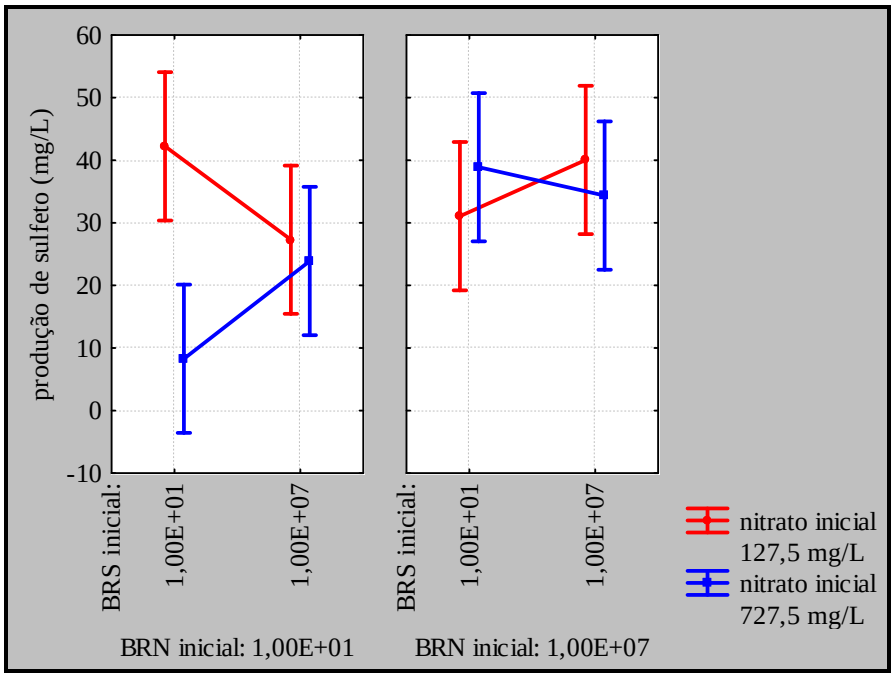


Figura 4.5: Gráfico das médias para a resposta Y2 – 14 dias de incubação

Uma explicação para tal resultado seria o consumo acentuado de nitrato por ambas populações de BRN e BRS logo no início do experimento, reduzindo a disponibilidade de nitrato e aumentando a população de BRS que passaria a reduzir o sulfato. Vários autores citam que espécies de *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e *Desulfomonas* são capazes de utilizar nitrato como aceptor final de elétrons, formando amônia como produto final através de uma via desassimilativa que envolve a enzima nitrato redutase (MOURA et al., 1997; CYPIONKA, 1995). Esta proposição pode ser confirmada pelo balanço termodinâmico das reações de redução de nitrato e sulfato por BRS, que apresentam valores de ΔG^o de -149,2 e -172,0 kJ por mol de H_2, respectivamente. A capacidade de redução de nitrato por BRS parece se associar à disponibilidade de íons sulfato no meio, ou seja, o metabolismo seria direcionado à redução de nitrato quando sulfato estivesse limitado (CYPIONKA, 1995).

No entanto, outros autores descrevem a habilidade de determinadas linhagens de *Desulfovibrio* em reduzir nitrato na presença de íons sulfato em concentrações não limitantes (DUNSMORE et al., 2004). Esta afirmativa procede, tendo em vista a similaridade entre os ganhos energéticos das reações de redução de nitrato e sulfato pelas BRS. A inibição da

redução de sulfato pela redução de nitrato em BRS ocorre quando as concentrações de nitrato são proporcionais às concentrações disponíveis de fonte de carbono. Assim, nessas condições, o metabolismo das BRS (se contêm genes para a redução de nitrato) seria completamente direcionado para a redução do nitrato (DINNING et al., 2005). Cabe ressaltar que, em qualquer dos casos mencionados, as BRS permanecerão metabolicamente ativas, apenas deixando de produzir sulfeto. Logo, a biogênese de sulfeto voltará a ocorrer em uma eventual disponibilidade de sulfato. Neste caso, tem-se o agravante da acidificação do reservatório permanecer intensa, tendo em vista que a população de BRS se encontra em maior número e já adaptada às condições ambientais do reservatório.

Na Figura 4.6 é apresentado um resumo dos dados de sulfeto produzido ao longo do tempo de incubação para diferentes concentrações iniciais de BRS, BRN e nitrato. Uma análise dos dados revela que somente mediante baixas concentrações iniciais de BRS e BRN (10^1 NMP/mL) consegue-se manter a produção de sulfeto em baixos níveis (< 10 mg/L) por até 28 dias através de uma dosagem única e elevada de nitrato (Figura 4.6A). Quando uma das populações (BRS ou BRN) apresenta concentrações iniciais elevadas (10^7 NMP/mL), o consumo de nitrato parece ser acentuado, e uma dosagem única de nitrato, mesmo em valores mais elevados, não evita a produção de sulfeto aos 14 e 28 dias (Figuras 4.6B e 4.6C). Quando as duas populações de BRS e BRN são elevadas, já aos 7 dias ocorre altas produções de sulfeto com baixas e altas concentrações de nitrato (Figura 4.6D). Os resultados obtidos sugerem a necessidade de aplicações intermitentes de nitrato no sistema para o controle do processo de acidificação, uma vez que o nitrato inicial, mesmo em altas concentrações, pode se esgotar, tanto pelo consumo pelas BRN como pelas BRS.

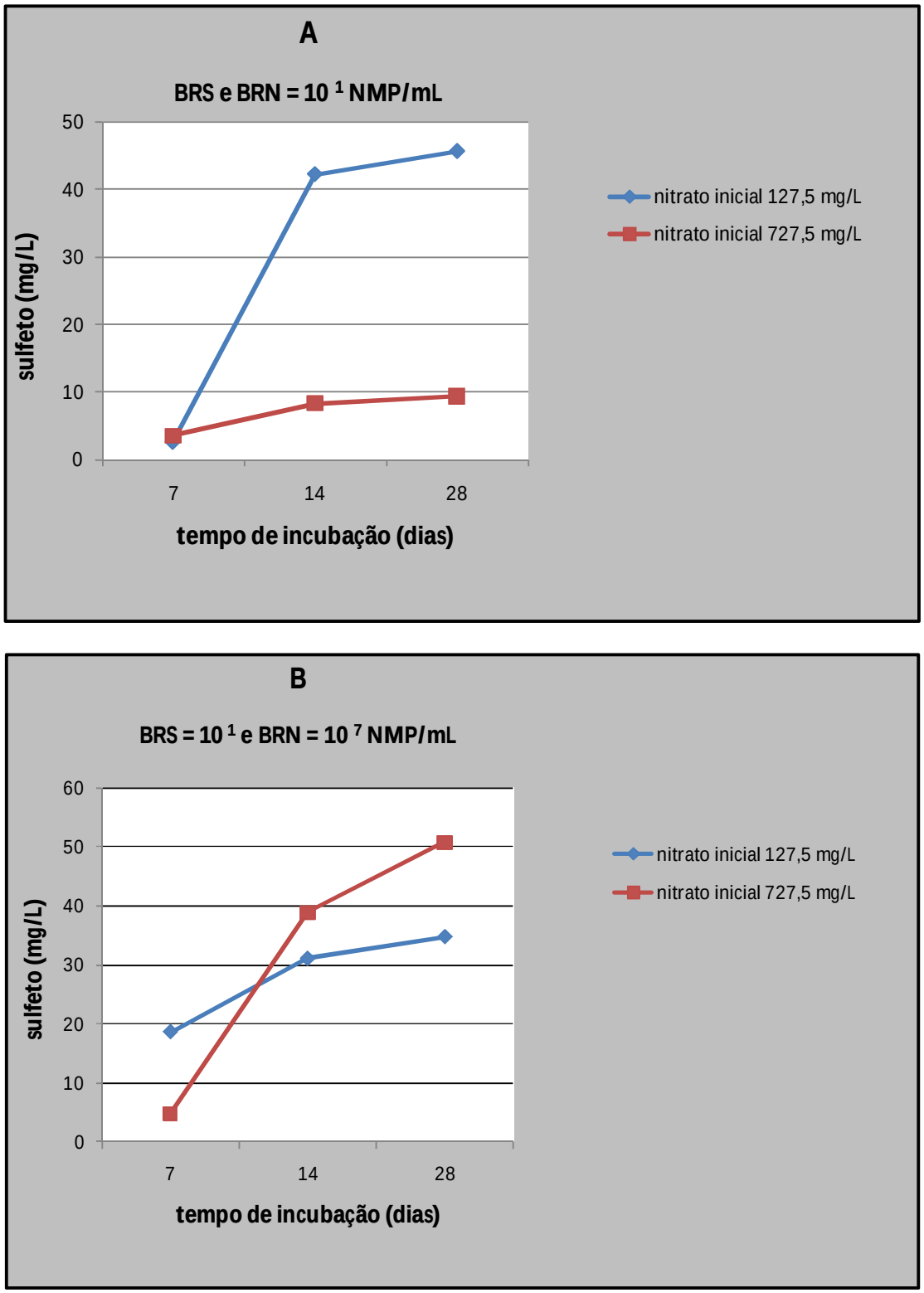
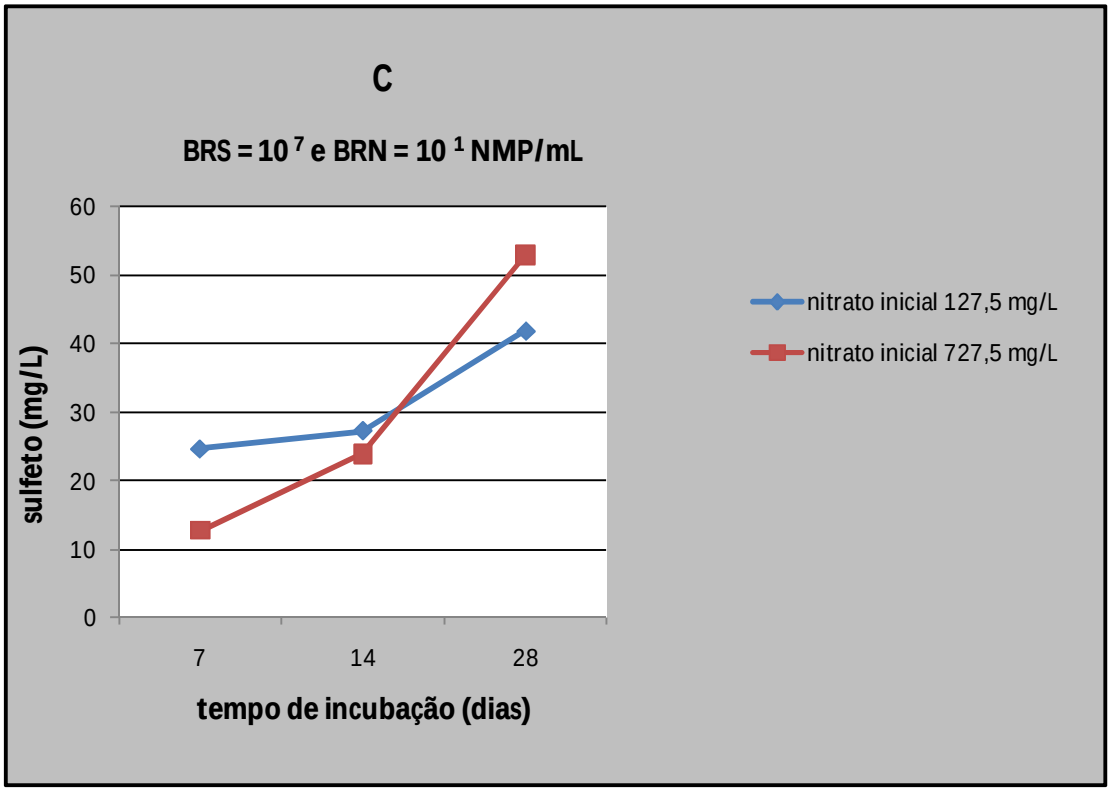


Figura 4.6: Produção de sulfeto sob diferentes condições iniciais de BRS, BRN e nitrato a 7, 14 e 28 dias de incubação. A e B.



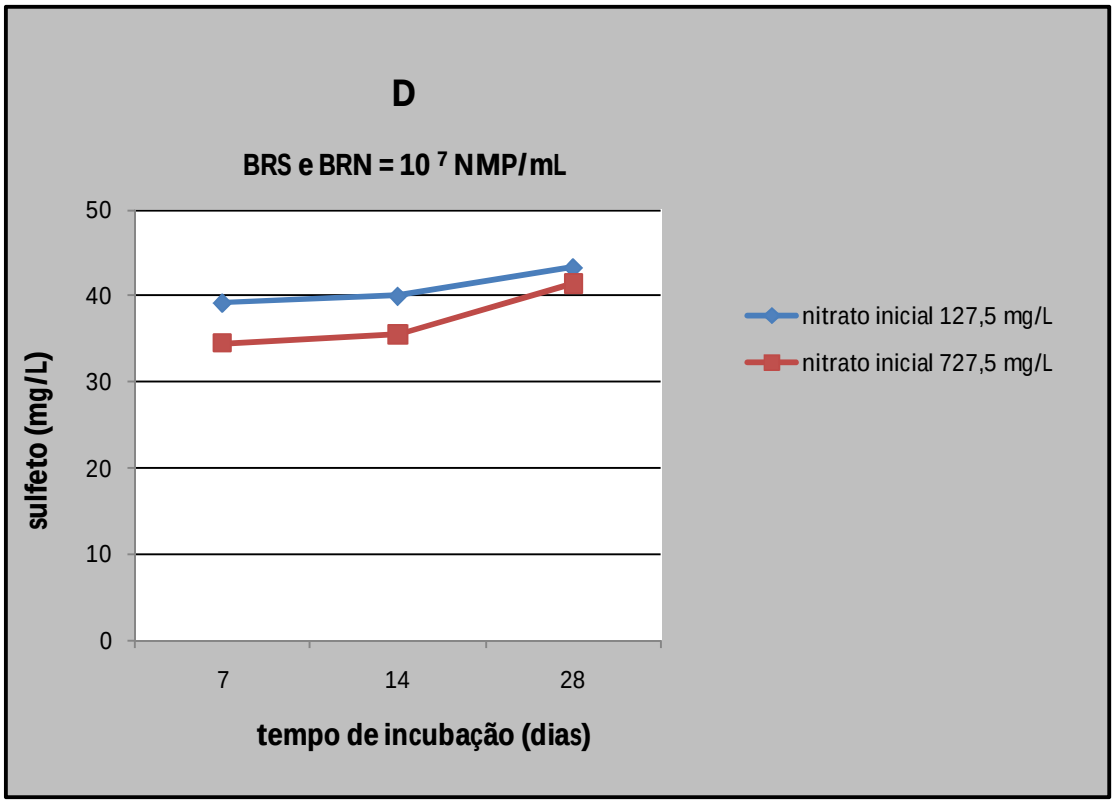


Figura 4.6: Produção de sulfeto sob diferentes condições iniciais de BRS, BRN e nitrato a 7, 14 e 28 dias de incubação. C e D.

A construção de modelos estatísticos, que explicassem a produção biogênica de sulfeto a 7 e 14 dias de incubação, mediante concentrações iniciais de nitrato e de BRS e BRN pré-estabelecidas, foi pertinente. Julgou-se necessário, no presente momento, estabelecer a interferência independente de outros parâmetros na produção biogênica de sulfeto, que não sofreram tratamento estatístico, mas que poderiam contribuir satisfatoriamente para o entendimento da dinâmica investigada, até mesmo no tempo de 28 dias de incubação. Os itens a seguir, estabelecem a relação desses parâmetros na produção de sulfeto.

4.3.2. O estudo da influência de outros parâmetros na produção biogênica de sulfeto

A finalidade do estudo foi compreender a dinâmica da produção biogênica de sulfeto em um sistema anóxico com nitrato e sob a influência de concentrações celulares inicialmente estabelecidas. Propôs-se anteriormente um modelo empírico de produção de sulfeto, perante o estabelecimento de condições pré-fixadas experimentalmente. Entretanto, considera-se pertinente a análise isolada, sem tratamento estatístico, de alguns parâmetros que pudessem contribuir para o entendimento dos mecanismos de mitigação de produção de sulfeto.

Assim, analisaram-se os consumos de nitrato e sulfato, a produção de nitrito, as estimativas de variação das populações de BRS e BRN e o potencial redox final ao término de cada etapa experimental. Destaca-se que o experimento 9 representa os valores médios das triplicatas realizadas no ponto central do planejamento experimental. Dividiu-se a atual discussão por tempo de incubação, ou seja, analisaram-se os dados em 7, 14 e 28 dias de incubação. Para todos os parâmetros ensaiados realizaram-se controles abióticos, e todos os valores expressos sofreram as devidas correções. Enfatiza-se também que foram calculados os desvios-padrão em todos os resultados obtidos.

- <u>Tempo de incubação de 7 dias</u>:

As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 apresentam, respectivamente, as estimativas da variação das populações de BRS e BRN, os consumos de nitrato e sulfato, a produção de nitrito e o potencial redox final para 7 dias de incubação.

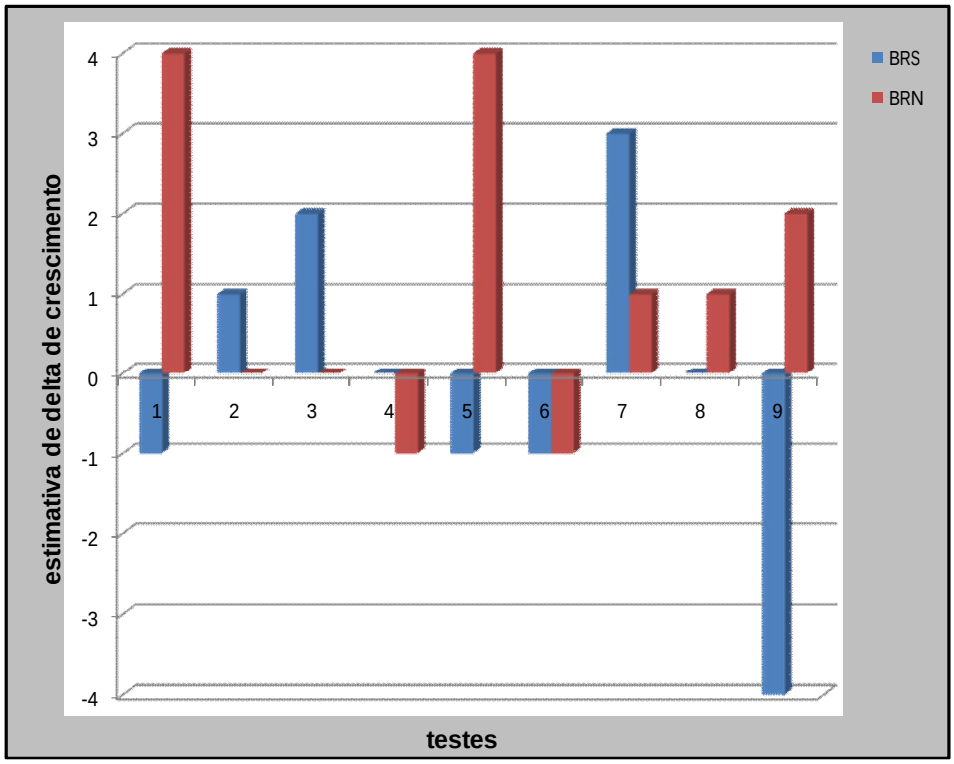


Figura 4.7: Estimativa da variação das populações de BRS e BRN a 7 dias de incubação no planejamento experimental

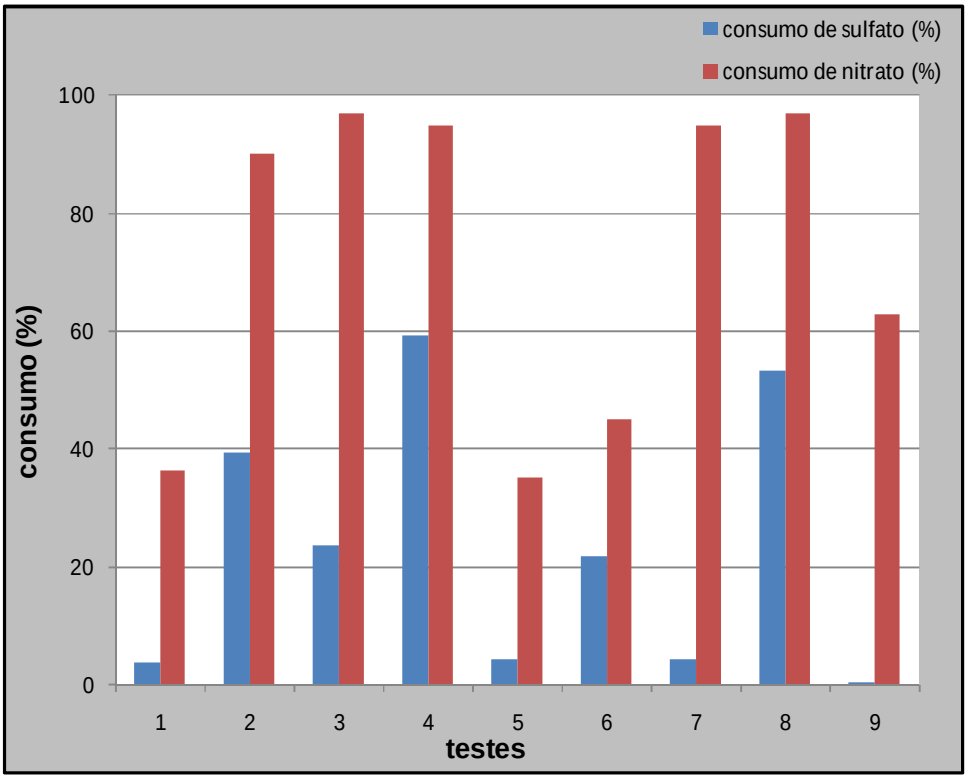


Figura 4.8: Consumos de nitrato e sulfato a 7 dias de incubação no planejamento experimental

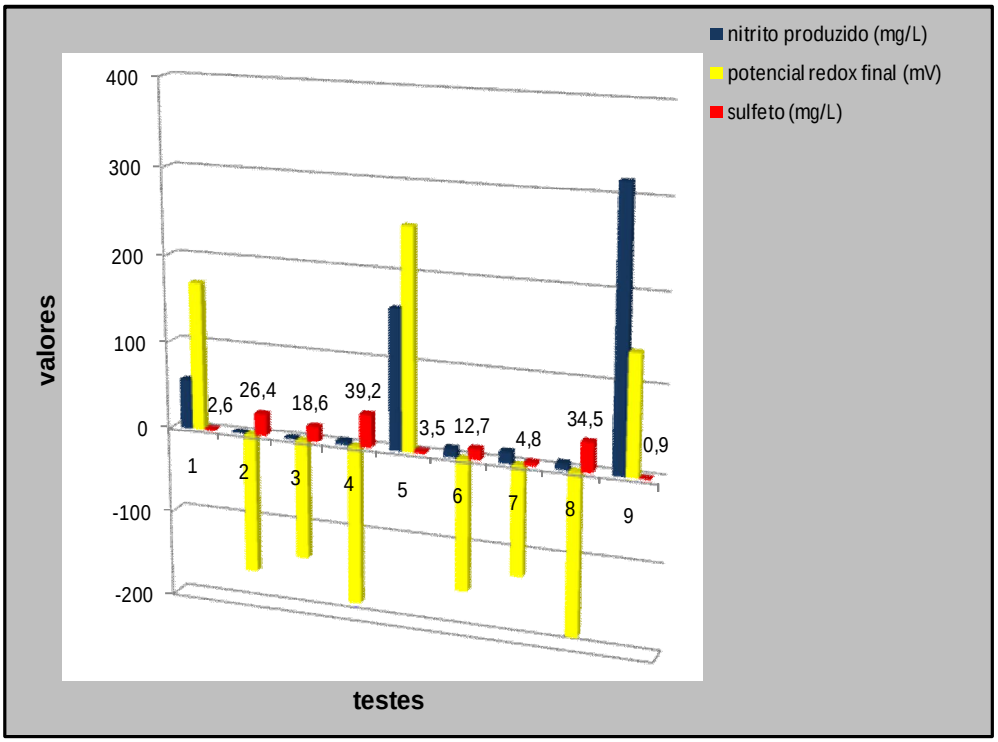


Figura 4.9: Produção de sulfeto e nitrito e os valores de potencial redox a 7 dias de incubação no planejamento experimental

Nos experimentos em que as concentrações iniciais de BRS e BRN foram 10^1 NMP/mL (experimentos 1 e 5), observa-se que a um intervalo de 7 dias, houve a mitigação de sulfeto (Figura 4.9), independentemente da concentração de nitrato injetada no início do experimento. Em ambos os experimentos, a variação da população de BRN foi positiva, registrando-se aumento de 4 ordens de grandeza (Figura 4.7). Em contrapartida, nesses mesmos experimentos, também independente da concentração de nitrato inicialmente empregada, houve declínio na população de BRS, ou seja, a variação da população foi negativa, uma vez que as populações diminuíram em uma ordem de grandeza (Figura 4.7). Os resultados evidenciam, para essas condições experimentais iniciais, um ganho de competição pelas BRN, visto que a um intervalo de 7 dias, conseguiram manter baixas as populações de BRS, independentemente da concentração de nitrato injetada.

Tais constatações tornaram-se mais claras ao analisar-se os percentuais de consumos dos aceptores finais de elétrons nos experimentos 1 e 5 (Figura 4.8). Percebe-se que os consumos de sulfato foram consideravelmente mais baixos que os de nitrato, registrando-se percentuais de consumo de sulfato de 3,8% (experimento 1) e 4,4% (experimento 5), enquanto os percentuais de consumo de nitrato foram de 36,5% (experimento 1) e 35,2%

(experimento 5). A aplicação de nitrato favorece a atividade de BRN, uma vez a redução do nitrato concede aos micro-organismos um ganho energético consideravelmente maior do que a redução do sulfato (VOORDOUW, 2008; HUBERT; VOORDOUW, 2007; ENERGY INSTITUTE, 2003).

Os consumos de nitrato, nesses experimentos, desencadearam a geração de um ambiente altamente oxidante, comprovado pelo aumento do potencial redox, em decorrência da produção de 57 mg/L (experimento 1) e 161,7 mg/L (experimento 5) de nitrito (Figura 4.9). O aumento do potencial redox para valores positivos de +170,4 e +253,2 mV nos experimentos 1 e 5, respectivamente, resultou em inibição do crescimento de BRS. Esses resultados apóiam-se em considerações feitas por Sturman (2001), Sturman e Goeres, (1999) e Reinsel et al.(1996), os quais atribuem a geração de um ambiente altamente oxidante em função da liberação de elétrons pela decomposição de íon nitrito em solução. Outro mecanismo pode ser atribuído à ação inibitória do nitrito sobre as BRS. Para Greene et al. (2003), o nitrito formado pode inibir a redução desassimilativa de sulfito a sulfeto, ou seja, o nitrito é capaz de inibir a ação da sulfito redutase desassimilativa das BRS.

Já nos experimentos 4 e 8, nos quais altas concentrações iniciais de BRS e BRN foram empregadas (10^7 NMP/mL), percebe-se que somente uma alta injeção de nitrato (727,5 mg/L) manteve uma variação de população positiva para as BRN, em uma ordem de grandeza, a um intervalo de 7 dias (experimento 8) (Figura 4.7). Entretanto, a manutenção dessa variação positiva, associada ao consumo de nitrato de 97% (Figura 4.8), não foi suficiente para manter a produção de sulfeto baixa. A prevalência de uma alta concentração de BRS (10^7 NMP/mL) nos experimentos 4 e 8, explicou o elevado consumo de sulfato no sistema, registrando-se valores de 59,4 e 53,3%, respectivamente (Figura 4.8). A manutenção da concentração de BRS nesses experimentos também pode ser associada ao consumo de nitrato por esses micro-organismos, que diante da disponibilidade do íon, ocasionou um desvio metabólico no início dos experimentos e, após esgotamento dessa fonte, passou a reduzir o sulfato. Segundo Dunsmore et al. (2004), citando Sietz e Cypionka (1986), algumas espécies de BRS são capazes de promover a troca da redução de sulfato por nitrato, quando concentrações ilimitadas, tanto de sulfato quanto de nitrato, estão presentes. Assim, pode-se entender o surgimento de uma competição entre espécies de BRS pelo nitrato quando ambas as espécies químicas (nitrato e sulfato) estão presentes no ambiente. Trabalhos como os de Bursakov; Carneiro; Almendra (1997) demonstraram a capacidade de algumas espécies de BRS em produzir nitrato redutase em sistemas que continham o íon nitrato. A indução da enzima

nitrato redutase permitia a utilização desta rota metabólica alternativa, convertendo nitrato a amônia, tendo nitrito como intermediário. Além disso, o reduzido tempo de permanência do nitrito no sistema, como intermediário da redução de nitrato, pode ter sido responsável pelos baixos valores de potencial redox registrados, -184,3 mV (experimento 4) e -188,95 mV (experimento 8) (Figura 4.9). Baixos valores de potenciais são essenciais para a manutenção de uma alta população de BRS (POSTGATE, 1984).

Nos experimentos 2 e 6, nos quais a concentração inicial de BRS foi cerca de 10^6 vezes maior que a população inicial de BRN, a injeção de 727,5 mg/L de nitrato (experimento 6) a um intervalo de incubação de 7 dias permitiu uma queda na produção de sulfeto de 26,4 mg/L para 12,7 mg/L (redução próxima de 52%). Nesta condição, a variação da população de BRS foi negativa (Figura 4.7), uma vez que diminuiu uma ordem de grandeza. Enquanto a aplicação de 127,5 mg/L (experimento 2), a 7 dias de incubação, aumentou a população de BRS em uma ordem de grandeza (Figura 4.7), resultando em maior produção de sulfeto.

Analisando os consumos de nitrato e sulfato, a 7 dias de incubação, percebe-se que no experimento 2 houve consumo de 90% do nitrato disponível, que começando a ser esgotado, desencadeou um consumo de 39,4% do sulfato do sistema, com conseqüente formação de 26,4 mg/L de sulfeto. A injeção de maior quantidade de nitrato (experimento 6) provocou consumo mais lento do nitrato (45%), o que acabou interferindo no consumo de sulfato (22%). Provavelmente, isso se deve ao tempo de permanência do nitrito no sistema, pois no experimento 6 registrou-se produção de 10,23 mg/L de nitrito (Figura 4.9), o que de certa maneira inibiu uma maior produção de sulfeto. Outra questão, que eventualmente pode ser levantada, diz respeito às concentrações iniciais de BRN necessárias à mitigação de *souring*, populações muito baixas podem não conseguir competir adequadamente mediante uma população alta e ativa de BRS. Tal questão ainda não foi objeto de investigação. Entretanto, Davidova et al. (2001) destacam em seu trabalho a pouca correlação existente entre os resultados de contagem de BRN e suas respectivas atividades específicas de redução. Os autores apontam para as dificuldades de se comparar diretamente os resultados dessas contagens com o potencial de redução de nitrato existente. Assim, reportam os poucos trabalhos publicados e a heterogeneidade de meios de quantificação usados.

Observou-se nos experimentos 3 e 7, nos quais as concentrações iniciais de BRN foram cerca de 10^6 vezes maiores que as concentrações iniciais de BRS, que uma injeção de 727,5 mg/L (experimento 7), a um intervalo de 7 dias, provocou uma redução considerável na

produção de sulfeto quando, nas mesmas condições, aplicaram-se 127,5 mg/L de nitrato (experimento 3), isso em percentuais chegou a 74%. Essa redução pode estar relacionada à variação da população de BRN, que no experimento 3 se manteve alta (10^7 NMP/mL) e no experimento 7 cresceu uma ordem de grandeza (10^8 NMP/mL) (Figura 4.7). A alta concentração de BRN, a um intervalo de 7 dias, conseguiu manter a produção de sulfeto inferior a 18,6 mg/L, mesmo com variações de população positivas para as BRS em 2 ordens de grandeza (experimento 3) (Figura 4.7) e 3 ordens de grandeza (experimento 7) (Figura 4.7).

Em paralelo, percebe-se acentuado consumo de nitrato nesses dois experimentos (Figura 4.8), sendo 97 e 95% para os experimentos 3 e 7, respectivamente. Observa-se que no experimento 7, mesmo tendo ocorrido praticamente o esgotamento do íon nitrato, manteve-se ainda a inibição da redução de sulfato, registrando-se apenas um consumo de 4,5% do sulfato disponível. Provavelmente, a manutenção de uma alta concentração de BRN associada a uma injeção de 727,5 mg/L de nitrato tenham sido responsáveis, considerando também que houve a detecção, a esse intervalo de tempo, de 13,45 mg/L de nitrito (Figura 4.9) no meio. Ressalta-se, no entanto, que esta concentração de nitrito não foi suficiente para elevar o valor do potencial redox do meio, ou seja, o potencial manteve-se baixo (-127,9 mV) e assegurou o crescimento de BRS e permitiu ainda uma baixa produção de sulfeto, de 4,8 mg/L.

O experimento 9 foi expresso pelos valores médios de triplicatas e, como ponto central do planejamento experimental, permitiu analisar a influência das concentrações iniciais intermediárias de micro-organismos e nitrato na mitigação de *souring*, ou seja, 10^4 NMP/mL para a concentração de BRS e BRN e 427,5 mg/L para a concentração de nitrato. Aqui, mediante a injeção de 427,5 mg/L de nitrato, a população de BRN apresentou uma variação positiva, subindo duas ordens de grandeza, enquanto a população de BRS sofreu uma queda de 4 ordens de grandeza, ou seja, apresentou uma variação de -4 (Figura 4.7). O consumo de nitrato de 62,7%, aliado a uma alta produção de 318 mg/L de nitrito (Figura 4.8), favoreceu a oxidação do meio, alcançando-se valores elevados de potencial redox (+137,5 mV) (Figura 4.9). A interação desses fatores desencadeados propiciou a inibição quase que completa do consumo de sulfato (0,45%) e a mitigação do sulfeto, que não passou de um valor médio de 1,4 mg/L.

A um intervalo de 7 dias de incubação, afere-se que as menores concentrações de sulfeto detectadas foram nos experimentos em que as populações de BRN e BRS foram

inferiores a 10^4 NMP/mL, e a concentração mínina inibitória de nitrato para mitigar o *souring* foi superior a 427,5 mg/L.

- Tempo de incubação de 14 dias:

As Figuras 4.10, 4.11 e 4.12 apresentam, respectivamente, a estimativa das variações das populações de BRS e BRN, os consumos de nitrato e sulfato, a produção de nitrito e o potencial redox final para o tempo de14 dias de incubação.

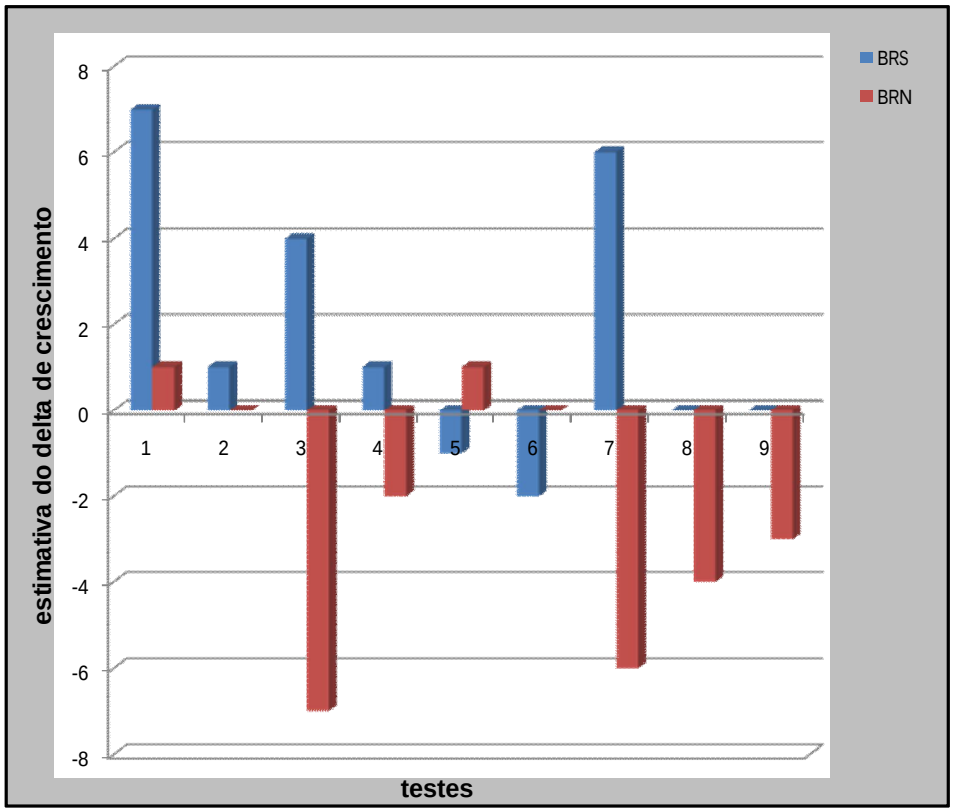


Figura 4.10: Estimativa das variações das populações de BRS e BRN a 14 dias de incubação no planejamento experimental

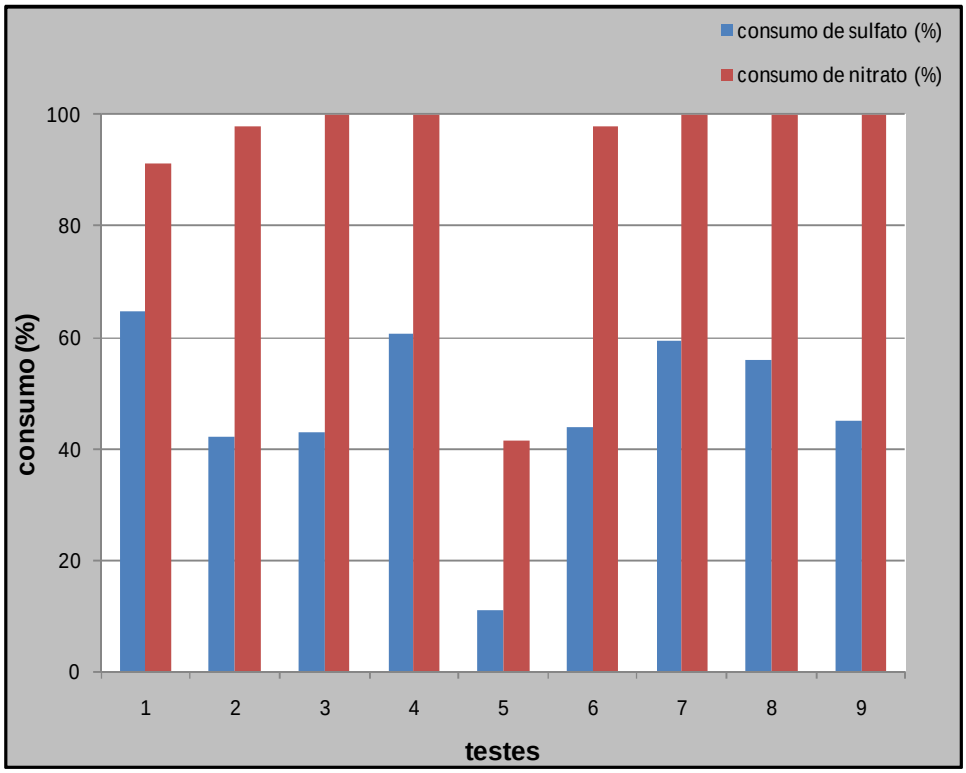


Figura 4.11: Consumos de nitrato e sulfato a 14 dias de incubação no planejamento experimental

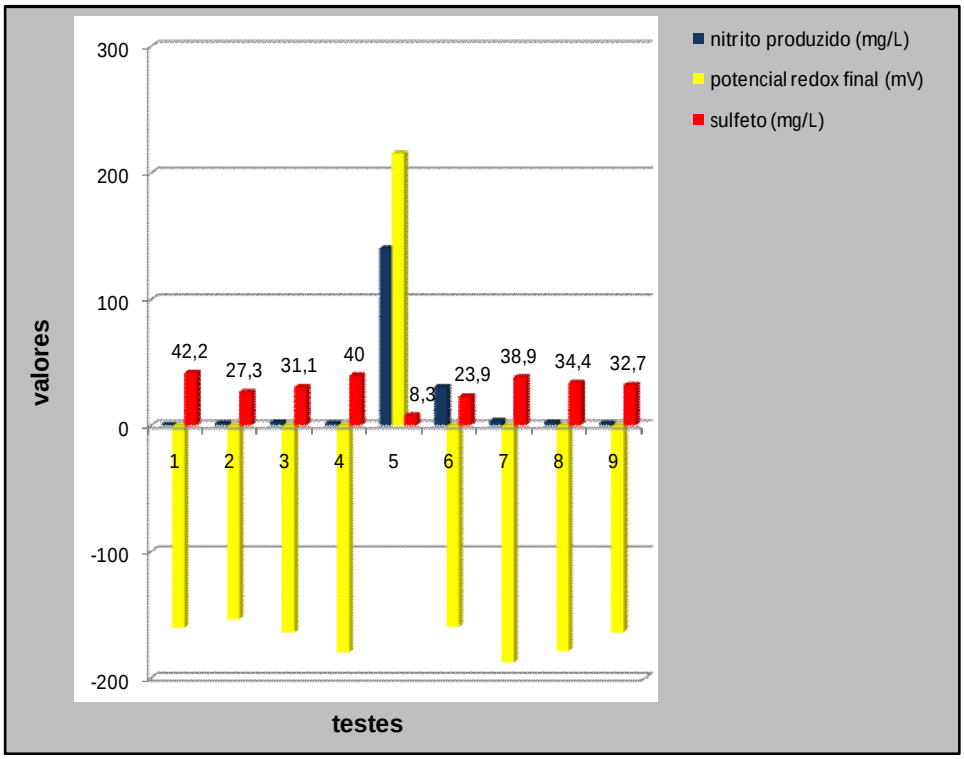


Figura 4.12: Produção de nitrito e sulfeto e valores de potencial redox final a 14 dias de incubação no planejamento experimental.

Analisando-se os experimentos 1 e 5, com concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^1 NMP/mL, percebe-se que a 14 dias de incubação ocorre uma mudança significativa no perfil de variação da concentração dos micro-organismos, principalmente em relação ao experimento 1. A esse intervalo de incubação, no experimento 1, em que a aplicação inicial de nitrato foi de 127,5 mg/L, a população de BRS cresceu 7 ordens de grandeza (10^8 NMP/mL), enquanto que a de BRN ganhou apenas uma ordem de grandeza (10^2 NMP/mL) (Figura 4.10), ou seja, a injeção inicial de 127,5 mg/L de nitrato não foi capaz de manter o crescimento de BRN nesse intervalo de tempo. Os dados demonstram que o elevado crescimento das BRS implicou na produção de 42,2 mg/L de sulfeto, uma vez que o consumo de sulfato registrado foi de 64,6% (Figura 4.11). O sulfato atingiu esse percentual de consumo provavelmente pela indisponibilidade do íon nitrato no sistema, uma vez que este foi consumido em cerca de 91% (Figura 4.11). Já no experimento 5, a injeção de 727,5 mg/L de nitrato a 14 dias de incubação, continuou mantendo a queda de uma ordem de grandeza da população de BRS. Em contrapartida, manteve em uma ordem de grandeza a população de BRN em relação à sua concentração inicial (Figura 4.10). A presença de um potencial redox alto (+215,45 mV) (Figura 4.12), como possível conseqüência da permanência de íon nitrito no meio (140,5 mg/L), pode ter assegurado a baixa produção de sulfeto (8,3 mg/L) (Figura 4.12) e o reduzido consumo de sulfato (11,13%) (Figura 4.11).

Nos experimentos 4 e 8 que se iniciaram com 10^7 NMP/mL de BRS e BRN, percebe-se que independentemente da concentração de nitrato injetada, altas concentrações de sulfeto foram detectadas, 40 e 34,4 mg/L de sulfeto, nos experimentos 4 e 8, respectivamente (Figura 4.12). Outros fatores a serem destacados são o consumo total de nitrato nos dois experimentos e o acentuado consumo de sulfato, da ordem de 60,59% (experimento 4) e 55, 9 % (experimento 8) (Figura 4.11). O acentuado consumo de sulfato nos dois experimentos reflete as elevadas populações de BRS presentes, 10^8 NMP/mL (experimento 4) e 10^7 NMP/mL (experimento 8) (Figura 4.10). Considera-se, mais uma vez, que esgotada a fonte de nitrato, passa a ocorrer o consumo de sulfato por parte das BRS. Baixos valores de potencial redox medidos nos experimentos 2 (-184,3 mV) e 8 (-188,95 mV) foram essenciais para a manutenção de uma população ativa de BRS num intervalo de 14 dias.

Quando as concentrações de BRS foram cerca de 10^6 NMP/mL maiores que as concentrações de BRN (experimentos 2 e 6), a partir de 14 dias de incubação percebe-se que, independentemente das concentrações de nitrato inicialmente injetadas, não foi possível mitigar a produção de sulfeto, registrando-se valores de 27,3 e 23,9 mg/L de sulfeto nos

experimentos 2 e 6, respectivamente. Nota-se, que mesmo que a variação da população de BRS tenha sofrido queda de duas ordens de grandeza no experimento 6 (Figura 4.10), isso não foi satisfatório para conter a produção de 23,9 mg/L de sulfeto no sistema (Figura 4.12). O consumo quase que total de nitrato (98%), em ambos os experimentos, possibilitou a redução de 42 e 44% do sulfato disponível, respectivamente, nos experimentos 2 e 6. Ademais, é necessário apontar os baixos potenciais redox nesses experimentos, -153,9 e -159,8 mV (Figura 4.12), talvez decorrentes da ausência de nitrito residual. Como constatado no intervalo de 7 dias, a presença de baixas populações de BRN podem não assegurar, mesmo mediante alta aplicação de nitrato, a mitigação do sulfeto.

Nos experimentos 3 e 7, nos quais a concentração inicial de BRN foi 10^6 NMP/mL maior que a concentração inicial de BRS, observa-se que a concentração de BRN nos experimentos 3 e 7, diminuiu 7 e 6 ordens de grandeza, respectivamente (Figura 4.10). A queda nas populações de BRN provavelmente deu-se pelo esgotamento da fonte de nitrato, pois nesses experimentos o nitrato foi totalmente consumido (Figura 4.11). Em paralelo, constata-se que a concentração de BRS com 14 dias de incubação, nos experimentos 3 e 7, aumentou em 2 e 4 ordens de grandeza, respectivamente (Figura 4.10), com consumos registrados de sulfato de 43% (experimento 3) e 55,9% (experimento 7). Assim, revelou-se que, independentemente da concentração de nitrato inicialmente injetada, a produção de sulfeto foi de 31,1 e 38,9 mg/L nos experimentos 3 e 7, respectivamente, mantendo-se baixos os valores de potencial redox (-164,4 e -187,5 mV).

Testando-se concentrações iniciais intermediárias de BRS e BRN, mediante a injeção de 427,5 mg/L de nitrato, percebe-se que não houve a inibição da produção de sulfeto a um intervalo de 14 dias de incubação (32,7 mg/L) (Figura 4.12). A alta produção de sulfeto associou-se com a queda acentuada da população de BRN em 3 ordens de grandeza e com a recuperação da população de BRS, que atingiu a mesma ordem de grandeza inicial (10^4 NMP/mL) (Figura 4.10). O declínio da concentração de BRN deu-se pelo esgotamento da fonte de nitrato, pois a esse intervalo de tempo, todo o nitrato disponível havia sido consumido e cerca de 45% do sulfato reduzido pela ação das BRS (Figura 4.11).

Até o presente momento, percebe-se que a mitigação de sulfeto a intervalo de 14 dias e, mediante uma única aplicação de nitrato, passa a ser em condições nas quais as populações iniciais de BRN e BRS encontram-se baixas (10^1 NMP/mL) e a concentração de nitrato alta (727,5 mg/L).

- Tempo de incubação de 28 dias:

As Figuras 4.13, 4.14 e 4.15 apresentam, respectivamente, a estimativa das variações das populações de BRS e BRN, os consumos de nitrato e sulfato, a produção de nitrito e o potencial redox final para o tempo de 28 dias de incubação.

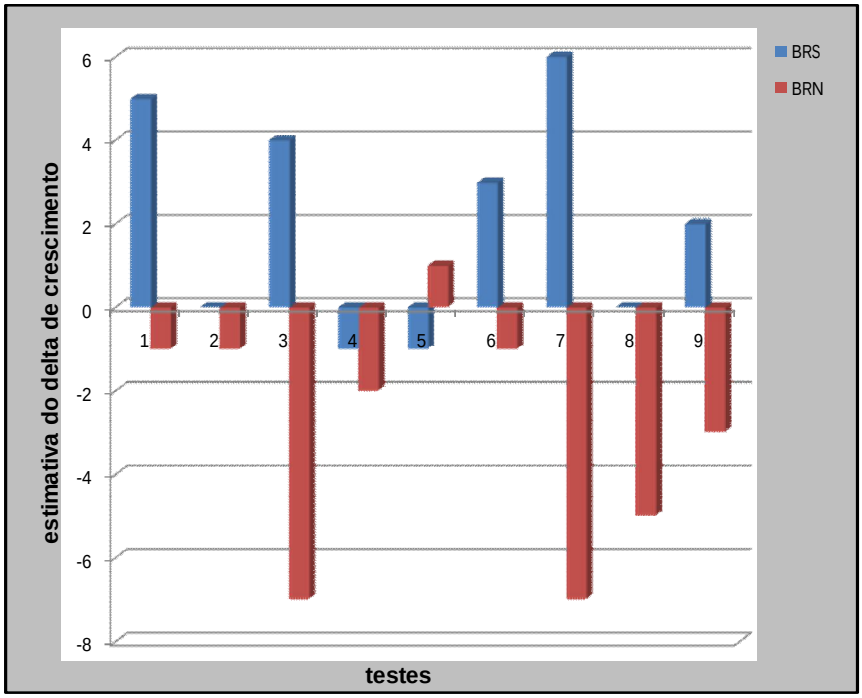


Figura 4.13: Estimativa das variações das populações de BRS e BRN a 28 dias de incubação no planejamento experimental

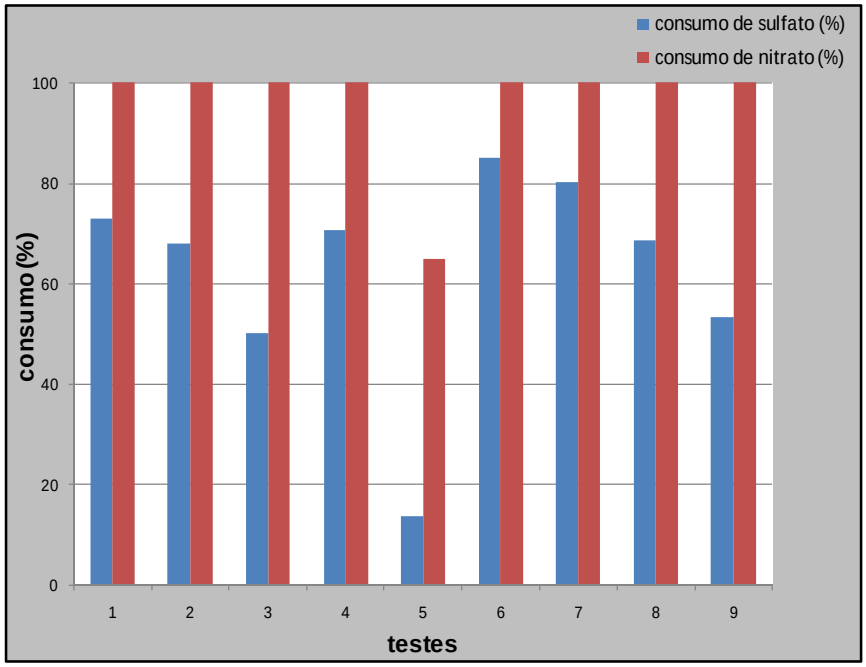


Figura 4.14: Consumos de nitrato e sulfato a 28 dias de incubação no planejamento experimental

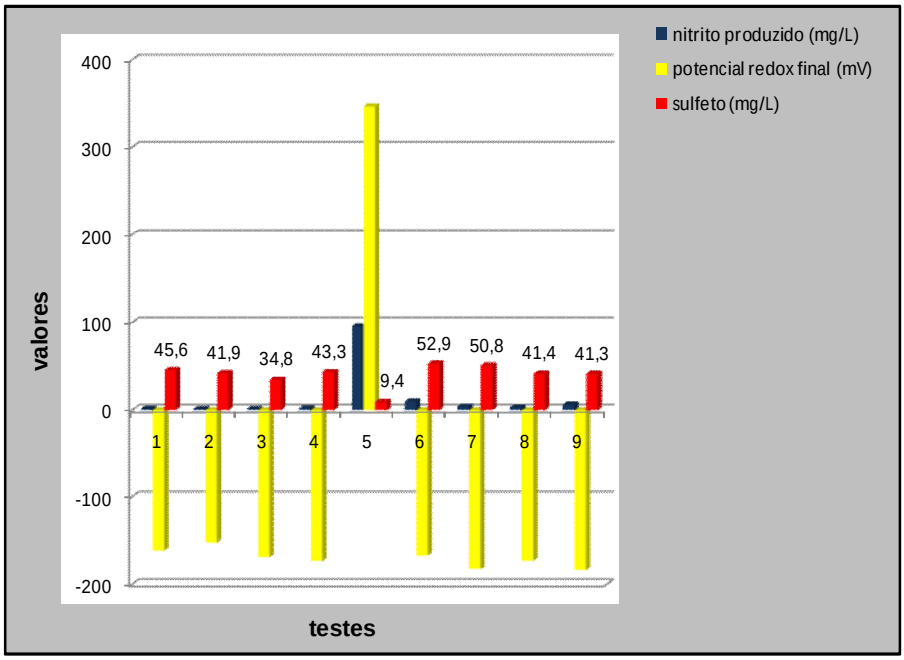


Figura 4.15: Produção de nitrito e sulfeto e valores de potencial redox a 28 dias de incubação no planejamento experimental

Experimentos nos quais concentrações baixas de BRS e BRN foram empregadas (experimentos 1 e 5), 10^1 NMP/mL, uma injeção de 727,5 mg/L de nitrato (experimento 5) conseguiu manter uma variação de população negativa para as BRS em uma ordem de grandeza (Figura 4.13), o que implicou na baixa produção de sulfeto (9,4 mg/L) (Figura 4.15). Constatou-se que no experimento 5, a permanência do íon nitrito no meio (95 mg/L) assegurou a manutenção de um potencial redox alto (+347,3 mV) (Figura 4.15). Percebeu-se que o consumo de nitrato em torno de 65% ainda impediu a redução de sulfato, que não passou de 13,8% (Figura 4.16). Em detrimento, o emprego da menor concentração de nitrato, 127,5 mg/L (experimento 1), não impediu, ao longo de 28 dias de incubação, o crescimento de 5 ordens de grandeza da população de BRS e provocou a queda em uma ordem de grandeza da população de BRN. Nessas condições, o nitrato esgotou-se (100% consumido) e a redução de sulfato atingiu 73,0% (Figura 4.14). Assim, o sulfeto não foi mitigado, registrando-se valores de 45,6 mg/L (Figura 4.15), com correspondente potencial redox de -162,5 mV.

Nos experimentos nos quais ocorreu a aplicação de altas concentrações de BRS e BRN (experimentos 4 e 8), independentemente da concentração inicial de nitrato injetada, registraram-se a produção de 43,3 e 41,4 mg/L de sulfeto nos experimentos 4 e 8, respectivamente (Figura 4.15). Atesta-se que nesses dois experimentos houve o esgotamento

da fonte de nitrato (100% consumido) e consumo de 70,6% (experimento 2) e 68,80% (experimento 8) do íon sulfato (Figura 4.14), onde registraram-se potenciais redox de -153,0 mV (experimento 2) e -173,6 mV (experimento 8) (Figura 4.15). Em relação às BRS, no experimento 8 (727,5 mg/L de nitrato injetado) não houve alteração na concentração de BRS, ou seja, a população foi mantida em torno de 10^7 NMP/mL (Figura 4.13). Entretanto, nesse mesmo experimento, a população de BRN diminuiu 5 ordens de grandeza (Figuras 4.17). Assim, afere-se que as altas concentrações de BRS mantidas foram responsáveis pela alta produção de sulfeto. A manutenção da mesma concentração de BRS no experimento 8 pode ser associada ao consumo dos íons nitrato por esses micro-organismos que, em altas concentrações ocasionou um desvio metabólico no início dos experimentos, e após um eventual esgotamento dessa fonte passou a reduzir o sulfato. No experimento 4, nota-se que as BRN diminuiram duas ordens de grandeza a 28 dias de incubação (Figura 4.16) enquanto a concentração de BRS se manteve praticamente inalterada, resultando na alta produção de sulfeto, em valores até maiores do que quando empregaram-se 727,5 mg/L de nitrato.

Nos experimentos nos quais as concentrações iniciais de BRS foram 10^6 NMP/mL maiores que as concentrações iniciais de BRN, a injeção de maiores concentrações de nitrato, a 28 dias de incubação, não impediu a produção de altos valores de sulfeto. No experimento 2 foi registrado uma produção de 41,9 mg/L de sulfeto e no experimento 6 uma produção de 52,9 mg/L, a maior atingida nos experimentos (Figura 4.15). Em relação às variações de população, no experimento 6 observou-se um aumento de 3 ordens de grandeza na população de BRS (Figura 4.13). Em contrapartida, nessa mesma condição, a população de BRN diminuiu uma ordem de grandeza (Figura 4.13). Para o experimento 2, em 28 dias de incubação, houve a manutenção de uma alta população de BRS (10^7 NMP/mL) com queda de uma ordem de grandeza na concentração de BRN. A 28 dias de incubação, o sulfato reduzido alcançou 68 e 85% (Figura 4.14), nos experimentos 2 e 6, respectivamente, com concomitantes baixos valores de potencial redox, -153,0 e -167,45 mV (Figura 4.15).

Nos experimentos 3 e 7, nos quais as concentrações iniciais de BRN foram 10^6 NMP/mL maiores que as concentrações de BRS, em 28 dias de incubação, nota-se que a concentração de BRN sofreu uma queda de 7 ordens de grandeza nos dois experimentos, enquanto a concentração de BRS aumentou em 4 e 6 ordens de grandeza nos experimentos 2 e 6, respectivamente (Figura 4.13). Altas populações de BRS nos dois experimentos provocaram a produção de 34,8 (experimento 3) e 50,8 mg/L de sulfeto (experimento 7) (Figura 4.15), corroborando com os altos percentuais de redução de sulfato de 50,20 e

80,35%, respectivamente, nos experimentos 3 e 7 (Figura 4.14). Destacando sempre a manutenção de baixos valores de potencial redox, -169,3 mV (experimento 3) e -183,0 mV (experimento 7).

No experimento 9, que testou concentrações intermediárias de BRS e BRN, bem como concentrações intermediárias de nitrato, percebe-se claramente que após o esgotamento do íon nitrato no sistema (100% consumido) (Figura 4.14) houve queda acentuada na população de BRN (Figura 4.13). A redução do sulfato alcançou 53,5% (Figura 4.14), mesmo com uma perceptível queda da população de BRS. De qualquer modo, essas interações foram suficientes para a produção de 37,7 mg/L de sulfeto e para a manutenção de um potencial redox baixo (-183,7 mV) (Figura 4.15).

Para o intervalo de 28 dias de incubação, a condição em que ocorreu a mitigação de sulfeto foi considerada a mesma que no intervalo de 14 dias de incubação. Assim, a mitigação de sulfeto se deu mediante uma única aplicação de nitrato no experimento em que as populações iniciais de BRN e BRS encontravam-se baixas (10^1 NMP/mL) e a concentração de nitrato alta (727,5 mg/L), ou seja, condições estabelecidas no experimento 5.

A análise dos dados sem tratamento estatístico permitiu o entendimento da interferência isolada de alguns parâmetros na produção de sulfeto. Embora perceba-se que os resultados obtidos pelo tratamento estatístico autenticam a análise efetuada, de um modo geral assegura-se que a mitigação da produção de sulfeto no sistema necessita levar em conta as concentrações celulares iniciais, bem como a dose mínima necessária de nitrato para tratar o sistema. Fica claro que o regime de tratamento deve ser também investigado, uma vez que percebeu-se que em todos os experimentos o esgotamento da fonte de nitrato provocou a redução de sulfato no sistema, com conseqüente produção de sulfeto. Outros aspectos também deveriam ser considerados, pois o planejamento experimental contemplou apenas a interferência dos micro-organismos planctônicos no problema investigado sob condição estática, e tão pouco analisou a possibilidade de ocorrência de corrosão relacionada ao tratamento com nitrato. Sendo assim, o presente estudo procurou reproduzir a melhor condição experimental em um sistema agitado, ao mesmo tempo em que investigou a ocorrência de corrosão em sistemas tratados com nitrato. Continuamente tem-se falado aqui no texto em estabelecer as condições ideais para mitigar a produção de sulfeto. A análise dos dados mostrou que a melhor condição foi aquela estabelecida no experimento 5, que manteve,

até um intervalo de 28 dias, os índices baixos da produção de sulfeto. No entanto, como a finalidade do estudo é estabelecer a menor produção de sulfeto, constata-se que o menor valor foi encontrado nos experimentos centrais do planejamento experimental a um intervalo de tempo inferior a 14 dias. Portanto, determinou-se que essa condição seria reproduzida no sistema agitado.

4.4. Produção de Sulfeto em Sistema Agitado

Nesta etapa, foram realizados ensaios com os dados levantados para mitigação de sulfeto no planejamento experimental. Assim, empregaram-se como condições iniciais de operação do biorreator aquelas relacionadas aos pontos centrais, ou seja, concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e nitrato de 427,5 mg/L em um tempo inferior a 14 dias. A descrição detalhada das condições operacionais de cada batelada foi apresentada no Quadro 3.1 (item 3.6). Foram contemplados: o modo de aplicação do nitrato e a relação do tratamento com o processo corrosivo. Nesta etapa experimental efetuaram-se diariamente análises das variáveis investigadas (descritas no Quadro 3.1), uma vez que o possível esgotamento de nitrato seria um dos fatores desencadeadores da produção de sulfeto no sistema, bem como a variação temporal dos micro-organismos envolvidos. Os resultados foram avaliados em função das análises dos valores de sulfeto total, das concentrações de BRS e BRN planctônicas e dos valores de sulfato detectados ao longo do processo nas distintas bateladas. Também foi feita a análise comparativa da biogênese de sulfeto total produzido diariamente na ausência de nitrato e diante de aplicação única ou intermitente de nitrato. Por fim, analisou-se o processo corrosivo envolvido em sistemas que utilizam o nitrato como alternativa de controle de *souring*, avaliando-se concomitantemente o papel dos micro-organismos sésseis.

4.4.1. Atividade de BRS planctônicas e geração de sulfeto na ausência de nitrato – ensaio Controle

No ensaio Controle estabeleceu-se apenas a concentração inicial de BRS em 10^4 NMP/mL, sendo o experimento realizado na ausência de nitrato e de BRN. Com isso, determinou-se a produção biogênica de sulfeto em sistema não tratado com nitrato e sem a

interferência de BRN. O processo foi monitorado diariamente, sendo as determinações analíticas executadas durante o ensaio apresentadas na Figura 4.16 a seguir.

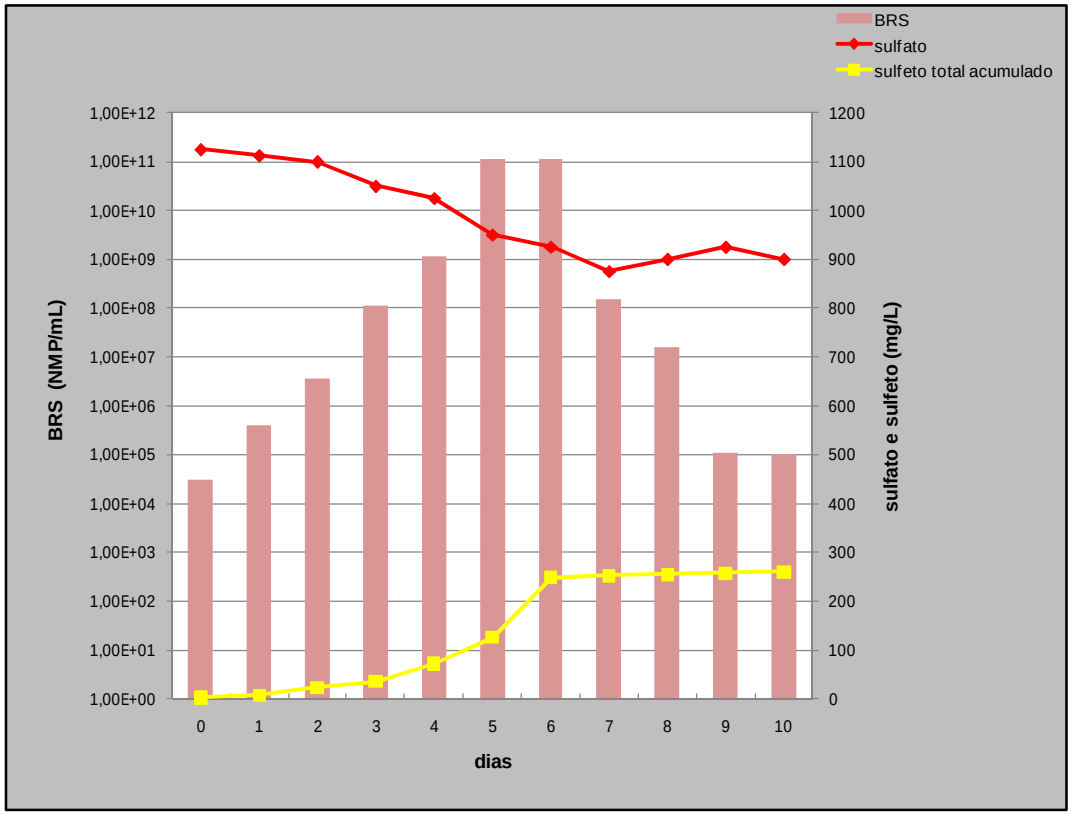


Figura 4.16: Variação da concentração de BRS, sulfato e sulfeto total durante o ensaio Controle (batelada 1) - concentração inicial de BRS de 10^4 NMP/mL e ausência de BRN e nitrato.

Percebe-se que a geração de sulfeto ocorreu vinculada à redução de sulfato a partir do segundo dia. Como se sabe, a produção de sulfeto é associada ao crescimento das BRS em decorrência do metabolismo desassimilativo do sulfato. A partir do 3º dia, observa-se claramente um aumento da taxa de produção de sulfeto total acumulado. No entanto, os valores de sulfeto determinados (35,5 a 248,5 mg/L) são consideravelmente maiores que os esperados somente pela redução de sulfato (25,0 a 66,7 mg/L). Como também constatado por Vieira (2003), os valores elevados de sulfeto podem ser resultado de outros fenômenos no meio reacional. Uma hipótese seria a liberação de sulfeto pela transformação química/biológica de compostos sulfurosos presentes na água produzida. Ocorre também, como destacado por Aitani; Ali; Al-Ali (2000), a capacidade de algumas espécies de BRS de promoverem a dessulfurização anaeróbia de compostos de enxofre encontrados no petróleo, que poderiam estar presentes na água produzida, como por exemplo o benzotiofeno e o dibenzotiofeno.

Com relação à população de BRS, observou-se que esta aumentou simultaneamente com a redução de sulfato, atingindo um máximo no 5º dia (10^{11} NMP/mL), que ainda foi mantido no 6º dia, sofrendo em seguida redução gradual até o fim do ensaio (10^5 NMP/mL). Ou seja, apesar da redução de concentração do 6º para o 10º dia, constatou-se que a população de BRS ao final do experimento apresentava valor superior (10^5 NMP/mL) à população inicial (10^4 NMP/mL). A redução da população de BRS ocorreu quando foram atingidos os valores máximos de sulfeto no meio reacional. Portanto, a redução da população de BRS pode ser atribuída à toxicidade de sulfeto sobre algumas espécies deste grupo microbiano. Embora o mecanismo exato de inibição por sulfeto seja desconhecido, atribui-se a inativação de células à permeabilidade do sulfeto não dissociado para dentro das células, com conseqüente destruição de suas proteínas (POSTGATE, 1984). Ou ainda, como destacado por Tang; Baskaran; Nemati (2009), citando os trabalhos de Reis et al. (2000) e Nagpal et al. (2000), a inibição das BRS por sulfeto seria devido a reação de H_2S com metais ou precipitados metálicos presentes no meio reacional, privando as células de elementos traços essenciais ao seu metabolismo. Tang; Baskaran; Nemati (2009), relatando diversos estudos, citam faixas de níveis inibitórios de sulfeto total de 64-2059 mg/L e de H_2S não dissociado de 57-550 mg/L, corroborando os dados obtidos no presente estudo (concentrações de sulfeto total em torno de 249 mg/L a partir do 6º dia).

4.4.2. Atividade de BRS e geração de sulfeto na presença de BRN mediante uma única injeção de nitrato

Neste ensaio foram estabelecidas as mesmas condições iniciais do ponto central do planejamento experimental, ou seja, concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e uma única injeção inicial de nitrato de 427,5 mg/L. Com isso, permitiu-se estabelecer a produção biogênica de sulfeto em sistema tratado com uma única dose de nitrato sob a interferência de BRN. Como ocorreu no ensaio Controle, o processo foi monitorado diariamente, sendo as determinações analíticas executadas durante o ensaio apresentadas na Figura 4.17.

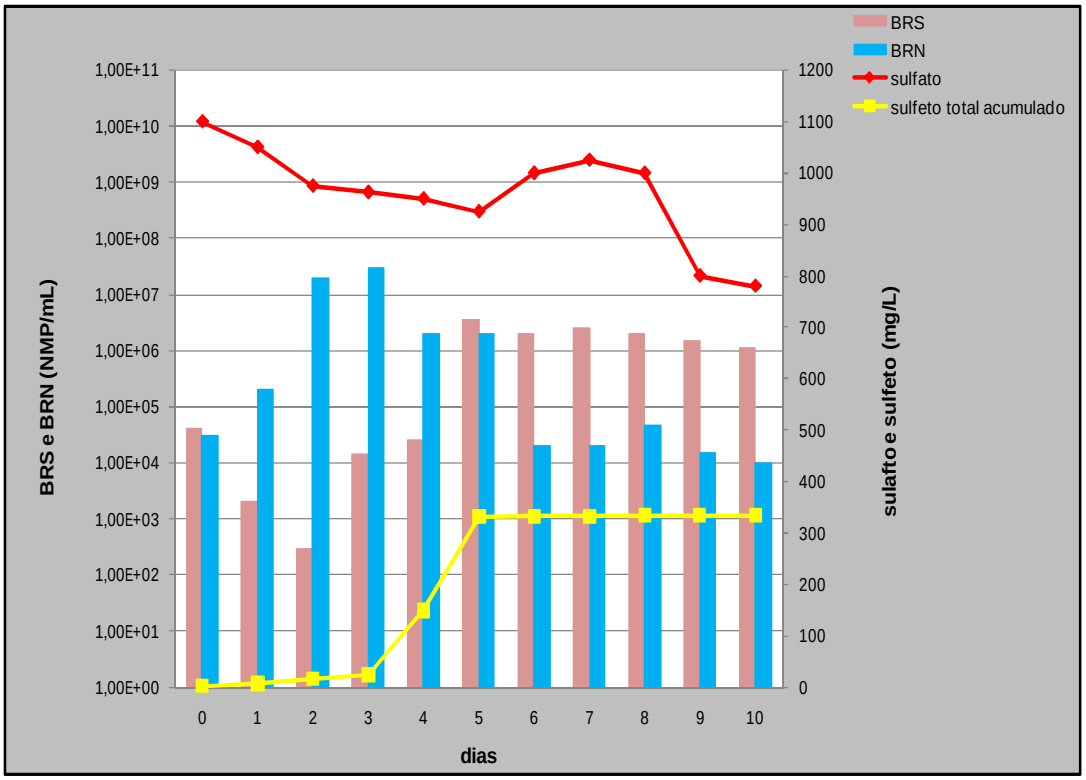


Figura 4.17: Variação das concentrações de BRS, BRN, sulfato e sulfeto total durante a batelada 2 – concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeção única de 427,5 mg/L de nitrato.

Analisando-se o perfil da produção de sulfeto total acumulado neste ensaio, percebe-se o mesmo comportamento identificado no ensaio Controle, ou seja, a geração de sulfeto não pode ser atribuída unicamente à redução de sulfato, conforme sugerido anteriormente. Uma observação pertinente diz respeito aos valores de sulfeto registrados neste ensaio quando comparados aos valores de sulfeto do ensaio Controle. A injeção inicial de 427,5 mg/L de nitrato, aliada à presença de uma população inicial de 10^4 NMP/mL de BRN, inibiu a biogênese de sulfeto nos três primeiros dias de ensaio, alcançando ao final desse período uma concentração de sulfeto total (23,7 mg/L) 33% menor que a obtida no ensaio Controle (35,5 mg/L). Provavelmente, no início do ensaio a disponibilidade do íon nitrato no meio reacional ocasionou a inibição da redução desassimilativa do sulfato pelas BRS. No entanto, mesmo na presença de nitrato, ainda houve produção de sulfeto, reforçando a hipótese da existência de outros meios de produção de sulfeto, não afetados pela presença de nitrato e BRN. Ou seja, a redução da produção de sulfeto detectada seria referente somente àquela associada ao metabolismo das BRS. No 4º dia de processo, o teor de sulfeto total acumulado foi superior ao do ensaio Controle, correspondendo a um aumento de cerca de 106% em relação ao valor

determinado no 4º dia do ensaio Controle. A evolução de sulfeto ocorreu até o quinto dia, provavelmente pelo esgotamento da fonte de nitrato e pela atuação da população de BRS. A partir do quinto dia até o final do processo, a concentração de sulfeto no meio reacional manteve-se inalterada, ao redor de 330 mg/L, valor maior do que a concentração detectada no ensaio Controle, que não ultrapassou 260 mg/L; indicativo de uma atividade de BRS mais efetiva neste ensaio.

Com relação às concentrações de sulfato no meio reacional, constatou-se um aumento do quinto ao sétimo dia de processo, diferentemente do que ocorreu no ensaio Controle. Esse aumento pode ser atribuído a ação de BRN-OS (bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto) possivelmente presentes no consórcio enriquecido de BRS. Trabalhos como os de Greene et al. (2003), Nemati; Jenneman; Voordouw (2001) e Gevertz et al. (2000) descrevem a importante atuação desse grupo microbiano em sistemas tratados com nitrato, como responsável pela redução dos níveis de sulfeto ao promover sua oxidação a sulfato ou a enxofre elementar.

Quanto à variação das populações microbianas, percebe-se que a concentração de BRS diminui até duas ordens de grandeza nos dois primeiros dias, mas retoma o crescimento, retornando à concentração inicial de 10^4 NMP/mL ao terceiro dia. O crescimento continua, atingindo o seu valor máximo (3,5 x 10^6 NMP/mL) no quinto dia e se mantém constante até o fim do ensaio. Em contrapartida, a concentração de BRN se eleva em três ordens de grandeza nos dois primeiros dias, se mantém praticamente inalterada nas 24 horas seguintes, quando sofre um decréscimo até o valor inicial (10^4 NMP/mL), pouco variando até o fim do processo. Essa dinâmica pode ser atribuída ao metabolismo prevalente das BRN devido à injeção de nitrato. Vários estudos indicam que a presença de nitrato favorece o crescimento das BRN em detrimento das BRS, embora, ao mesmo tempo, pode permitir o crescimento ou a sobrevida das espécies de BRS capazes de utilizar também o nitrato como aceptor final de elétrons (DUNSMORE et al., 2004; CYPIONKA, 1995; MOURA et al., 1997). Neste estudo, pode-se constatar que uma ou mais populações de BRS não foram capazes de utilizar nitrato em substituição ao sulfato, ou foram inibidas pela presença de nitrato ou nitrito (um possível produto da redução desassimilativa do nitrato), o que propiciou uma redução considerável da concentração inicial. No entanto, as células sobreviventes prontamente se recuperaram. Essa constatação permite inferir que sistemas tratados com uma única aplicação de nitrato, que eventualmente estejam sujeitos à ocorrência de espécies de BRS que utilizem o nitrato,

podem, dependendo das condições microbiológicas iniciais, resultar em aumento da produção de sulfeto após o esgotamento da fonte de nitrato.

A análise dos dados levantados no sistema agitado corroboram os prognósticos feitos para os ensaios estáticos do planejamento experimental na mesma condição, ou seja, a ocorrência de uma relação direta entre as concentrações iniciais de micro-organismos e do íon nitrato disponível e seu tempo de permanência no sistema. Ainda, nota-se, que a reprodução das condições do planejamento experimental no sistema agitado desencadeou uma intensificação da produção de sulfeto. Ou seja, ao se propor uma simulação mais condizente com as características de um reservatório, percebeu-se que diante de uma população de BRS e BRN em torno de 10^4 NMP/mL e de uma única dosagem de 427,5 mg/L de nitrato, a produção de sulfeto total acumulado alcançou valores próximos a 24 mg/L em apenas três dias de processo. Ao passo que no sistema estático a produção de sulfeto alcançou um valor médio de 0,9 mg/L após 7 dias de processo.

4.4.3. Atividade de BRS e geração de sulfeto na presença de BRN mediante injeções intermitentes de nitrato

A finalidade deste ensaio foi testar o modo de aplicação do nitrato necessário à mitigação do sulfeto. Para tanto, tomou-se a melhor condição estabelecida no planejamento experimental, na qual as concentrações iniciais de BRS e BRN foram de 10^4 NMP/mL com uma aplicação inicial de 427,5 mg/L de nitrato.

Determinou-se como ponto de partida para a aplicação intermitente do nitrato, o momento em que ocorresse visualmente a formação de sulfeto de ferro no meio reacional, ou seja, o escurecimento do meio reacional. Como anteriormente demonstrado nas bateladas realizadas, a formação do sulfeto de ferro era perceptível no terceiro dia de processo, isso tanto no ensaio Controle (batelada 1) quanto no ensaio com o nitrato aplicado somente no início do processo (batelada 2). As aplicações foram executadas diariamente até que houvesse a completa ausência de sulfeto de ferro e a paralisação da produção diária de sulfeto total no sistema. Cada aplicação foi feita de modo a estabelecer no meio reacional uma concentração de 427,5 mg/L de nitrato. Para tanto, nos cálculos foram considerados os valores residuais de nitrato no sistema. A Figura 4.18 apresenta as variáveis analisadas durante a realização do ensaio.

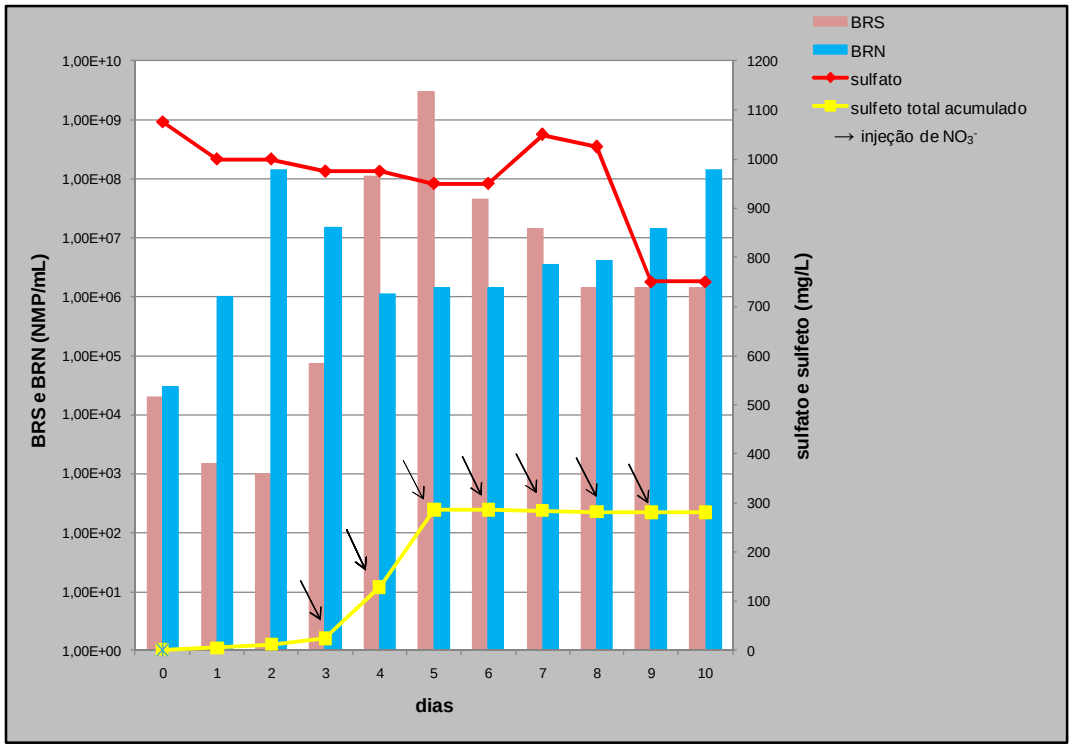


Figura 4.18: Variação das concentrações de BRS, BRN, sulfato e sulfeto total durante a batelada 3 – concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeções intermitentes de nitrato.

A injeção inicial de nitrato, como na batelada 2, provocou uma redução de 29,6% nos níveis de sulfeto nos três primeiros dias de processo, em comparação aos níveis obtidos no mesmo período no ensaio Controle. Outro ponto a ser destacado, e que também foi ressaltado na análise da batelada 2, foi a possibilidade de atuação de BRN-OS nos ensaios, uma vez que também foi observado aumento nos níveis de sulfato no reator.

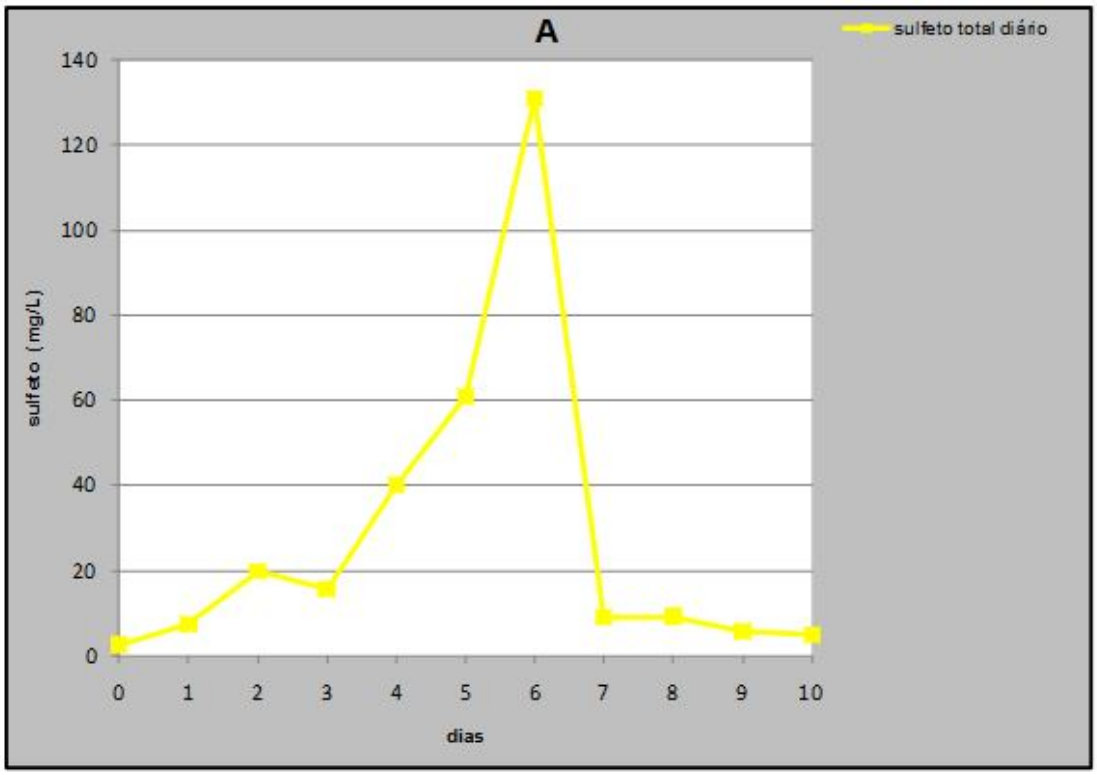
Como também registrado na batelada 2, a concentração de BRS sofreu uma queda inicial (de apenas uma ordem de grandeza), seguida de uma recuperação, retornando ao valor correspondente à concentração inicial entre o segundo e terceiro dia de processo. Diferentemente da batelada 2, a população de BRS no quarto dia de processo apresentou um aumento considerável (10^8 NMP/mL), concluindo-se que a injeção de nitrato estimulou o crescimento de espécies de BRS que utilizam o nitrato como aceptor final de elétrons. De fato, as injeções diárias de nitrato permitiram manter elevada a concentração de BRS no decorrer do processo, o que não resultou em aumento da produção de sulfeto total acumulado, pois logo após a primeira injeção de nitrato ocorreu uma queda de 13,5% na produção de

sulfeto total acumulado em comparação aos valores estimados na batelada 2, submetida a uma única injeção de nitrato. Afere-se que as injeções intermitentes de nitrato no reator determinaram, ao final do processo, uma diminuição de cerca de 16% dos níveis de sulfeto total acumulado em relação aos valores da batelada 2.

Inicialmente, a população de BRN apresentou praticamente o mesmo comportamento da batelada 2, ou seja, até o segundo dia de processo a população aumentou quatro ordens de grandeza (de 10^4 para 10^8 NMP/mL), o que lhe assegurou um ganho de competição com as BRS e, conseqüentemente, a redução dos níveis de sulfeto produzido, como constatado anteriormente. E, apesar das injeções diárias de 427,5 mg/L de nitrato, a concentração de BRN decresceu ou se manteve constante, voltando a haver aumento no nono e décimo dias de processo (10^7 e 10^8 NMP/mL, respectivamente), ou seja, a população manteve-se em torno de 10^6 NMP/mL mesmo com a disponibilidade do íon no meio reacional. Portanto, em situações em que espécies de BRS que utilizam nitrato estão presentes, aplicações intermitentes de nitrato podem apenas inibir a redução de sulfato e não a atividade desse grupo microbiano, com a eventual ausência do íon desencadeando novamente a produção de sulfeto.

4.4.4. Avaliação comparativa da biogênese de sulfeto

Neste item discutir-se-ão os valores de sulfetos totais diariamente produzidos e sua relação com os valores de nitrato consumidos e de nitrito registrados no processo. A Figura 4.19 a seguir apresenta a variação dos valores acima citados nas bateladas 1, 2 e 3.



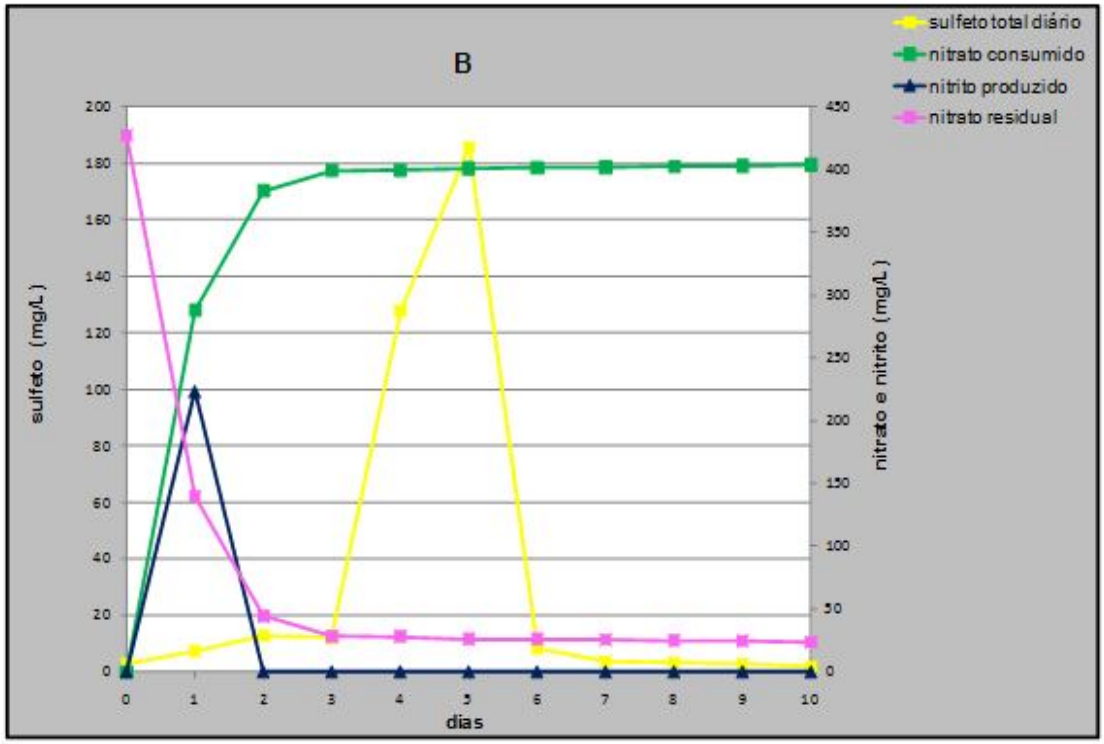


Figura 4.19: Variação das concentrações diárias de sulfeto total, nitrato consumido e nitrito durante as bateladas 1 (A - concentração inicial de BRS de 10^4 NMP/mL e ausência de BRN e nitrato) e 2 (B - concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeção única de 427,5 mg/L de nitrato).

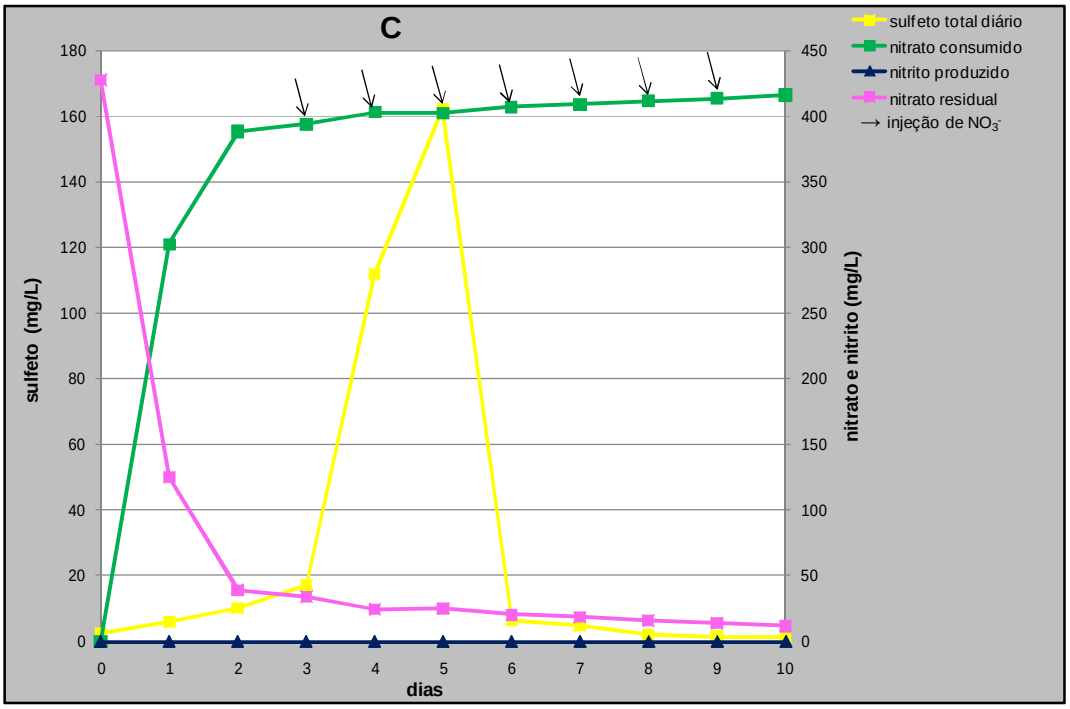


Figura 4.19: Variação das concentrações diárias de sulfeto total, nitrato consumido e nitrito durante a batelada 3 (C - concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e injeções intermitentes de nitrato).

Comparativamente, os valores de sulfeto total diário nas bateladas 1, 2 e 3 assumem o mesmo comportamento cinético. No entanto, percebe-se que os valores numéricos apresentam certas particularidades. No ensaio Controle (batelada 1- Figura 4.19 A), o ápice da produção diária de sulfeto total se deu no sexto dia de processo (131 mg/L), sofrendo brusca queda logo em seguida, e ao final de 10 dias de processo registrando-se um valor de apenas 4,9 mg/L de sulfeto. A máxima produção de sulfeto coincidiu com a queda da população de BRS, constatando-se o efeito inibitório do sulfeto sobre algumas espécies de BRS presentes no consórcio. Assim, em um sistema agitado, na ausência de nitrato e sem a interferência de BRN, e mediante uma população inicial de BRS de 10^4 NMP/mL, a maior produção de sulfeto total ocorreu no sexto dia de processo.

Ao se analisar a batelada 2 (Figura 4.19 B) nota-se que o ápice da produção de sulfeto (185,7 mg/L) ocorreu no quinto dia de processo, representando um aumento de cerca de 42%, quando comparado ao maior valor registrado no ensaio Controle. A aplicação inicial de nitrato no sistema assegurou uma menor produção diária de sulfeto até o terceiro dia de processo, sendo essa redução de 36% e 23%, comparativamente aos valores diários obtidos na batelada 1, no segundo e terceiro dias de processo, respectivamente. Ao sexto dia de processo,

foi registrada queda acentuada da produção diária de sulfeto, que se manteve baixa (1,8 mg/L) nos dias subseqüentes. Analisando-se o consumo de nitrato, ao terceiro dia de processo cerca de 93,4 % do íon já havia sido consumido e o nitrato residual (28,2 mg/L) não foi suficiente para conter a produção diária de 127,8 mg/L de sulfeto medida no quarto dia. O nitrito só foi detectado no primeiro dia do processo, o que indica seu uso subseqüente pelos micro-organismos

Os resultados obtidos provam, como continuamente destacado no decorrer do trabalho, que a presença de nitrato permite tanto o crescimento de BRN quanto de espécies de BRS que utilizam o nitrato, e que o esgotamento desse íon desencadeia novamente a produção de sulfeto que, no presente trabalho, atingiu valor superior ao determinado para o ensaio Controle.

O perfil das produções diárias da batelada 3 (Figura 4.19 C) foi semelhante ao da batelada 2, embora algumas particularidades devam ser destacadas. Na batelada 3, a injeção inicial de nitrato também manteve baixos os níveis de sulfeto totais diários, quando comparados ao Controle, apenas até o segundo dia de processo. Ao terceiro dia de processo registrou-se um pequeno aumento para 17,2 mg/L; valor semelhante ao do registrado para o ensaio Controle (15,7 mg/L).

O acelerado consumo de nitrato na batelada 3 pode ser uma possível explicação para a não detecção de nitrito no meio reacional. Visualmente, como anteriormente destacado, a formação de sulfeto de ferro no meio reacional foi o ponto de partida para o início das injeções intermitentes de nitrato. A primeira injeção de nitrato, no terceiro dia de processo, promoveu uma redução do nível de sulfeto total diário de 12,4%, quando comparado ao valor determinado na batelada 2. A aplicação subseqüente de 427,5 mg/L de nitrato (4º dia de processo) também conferiu redução similar (12,7%) em relação aos valores da batelada 2. Outro dado importante revelado foi o aumento das taxas de consumo do nitrato. Percebeu-se que praticamente todo o nitrato injetado era rapidamente consumido no intervalo de 24 horas, o que corrobora com as altas populações de BRS e BRN quantificadas (Figura 4.18). Sendo assim, pode-se concluir que as adições intermitentes de nitrato desencadearam uma redução gradual da produção diária de sulfeto. No entanto, esta redução não foi vinculada à redução da população de BRS, pois ao final do processo quantificaram-se valores de 10^6 NMP/mL para este grupo microbiano.

4.4.5. Avaliação da biocorrosão em aço carbono em sistema submetido ao tratamento com nitrato

A produção biogênica de sulfeto é certamente um problema para a indústria petrolífera, principalmente devido aos processos de acidificação de reservatórios e aos riscos associados à corrosão. A efetividade do íon nitrato como inibidor seletivo da atividade de BRS tem sido continuamente descrita na literatura (B∅DTKER et al., 2009; VOORDOUW, 2008; HUBERT; VOORDOUW, 2007; GARCIA-DE-LOMAS et al., 2007; DINNING et al., 2005; DUNSMORE et al., 2004; GREENE et al., 2003) e, conseqüentemente, acabou por ser associada ao controle da corrosão biogênica do sulfeto. No entanto, alguns estudos têm apresentado justamente os riscos de corrosão relacionados ao emprego deste íon (B∅DTKER et al., 2008; REMPEL; EVITTS; NEMATI, 2006; HUBERT et al., 2005). Assim, neste estudo, tornaram-se necessárias as investigações sobre o processo corrosivo que envolve o uso do nitrato como alternativa de controle de *souring*.

No presente estudo, o planejamento experimental anteriormente realizado estabeleceu que as melhores condições para mitigação de sulfeto foram aquelas relacionadas aos pontos centrais, ou seja, concentrações iniciais de BRS e BRN de 10^4 NMP/mL e concentração inicial de nitrato de 427,5 mg/L em tempo inferior a 14 dias de processo. O estudo dessas variáveis em sistema agitado apontou para a necessidade de aplicações intermitentes do íon nitrato para a mitigação de *souring*, uma vez que o tempo de residência do nitrato no meio reacional foi consideravelmente baixo, devido ao seu alto consumo pelas populações microbianas presentes. Portanto, o estudo sobre o processo corrosivo foi direcionado em função de sistemas que aplicam intermitentemente o nitrato no controle de *souring*.

Na Tabela 4.7 são apresentadas as variáveis medidas durante os ensaios de biocorrosão, a partir da exposição de corpos de prova ao meio MAP na presença de BRS e ausência de nitrato e BRN (batelada 4 - Controle) e mediante injeções intermitentes de nitrato e na presença de BRS e BRN (batelada 5). Toda a metodologia analítica das variáveis investigadas nestes ensaios foi descrita no item 3.7. A discussão subseqüente foi em torno dos dados aqui expostos.

Tabela 4.7: Variáveis relacionadas à biocorrosão medidas nos corpos de prova após 10 dias de exposição.

Ensaios	**Biofilme**			**Taxa de Corrosão** (mm/ano)	**Corrovisidade**
	BRS (NMP/cm^2)	**BRN** (NMP/cm^2)	**EPS** (mg/cm^2)		
Batelada 4 – controle	$6,2 \times 10^9$	---	0,0414	0,09	Moderada
Batelada 5 – injeções intermitentes de NO_3^-	$4,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^9$	0,1372	0,38	Severa

O monitoramento microbiológico revelou a colonização dos cupons expostos ao MAP na presença apenas de BRS planctônicas (população inicial de 10^4 NMP/mL - batelada 4 - Controle). Decorridos os 10 dias de processo, detectou-se um alto número de BRS no biofilme formado ($6,2 \times 10^9$ NMP/cm^2). O considerável número de BRS demonstrou a capacidade das BRS planctônicas na adesão e colonização de superfícies sólidas, em condições de cultivo consideradas propícias. Observa-se que o número de BRS presentes no biofilme foi consideravelmente maior que o determinado em alguns estudos. Na literatura encontram-se relatos de populações de BRS variando de 10^3 a 10^5 NMP/cm^2 em biofilmes formados sobre cupons de aço carbono expostos à água do mar e submetidos a altos teores de fonte de carbono decorrentes da contaminação de despejos domésticos e industriais. Nesses estudos as populações de BRS planctônicas eram relativamente baixas, entre 10^2-10^3 NMP/mL, e freqüentemente estavam associadas a outras espécies microbianas, dentre elas bactérias com capacidade de sintetizar exopolissacarídeos (GONÇALVES; SÉRVULO; FRANÇA, 2003; TORRES, 2001).

As condições nutricionais do meio MAP favoreceram uma colonização mais intensa dos corpos de prova pelas BRS, sendo a aderência provavelmente relacionada ao material polimérico extracelular produzido pelas próprias BRS, o que inclusive já foi descrito por outros estudos (GALVÃO, 2008; PÉREZ et al., 2007; CHAN; XU; FANG, 2002). A presença de 0,0414 mg/cm^2 de exopolissacarídeos (EPS) no biofilme, formados durante o ensaio Controle (batelada 4), vem confirmar a existência de espécies capazes de sintetizar material polimérico no consórcio enriquecido de BRS empregado no estudo.

Na batelada 5, sujeita a aplicações intermitentes de nitrato na presença de BRS (10^4 NMP/mL) e BRN (10^4 NMP/mL) na fase planctônica, registrou-se a formação de um biofilme constituído de um aumento considerável de ambas as populações, predominando uma população de BRN de $4,3 \times 10^9$ NMP/cm^2, e uma população de BRS de $4,3 \times 10^6$ NMP/cm^2.

Uma provável razão para o alto número de BRS sésseis no biofilme é a ocorrência de espécies de BRS capazes de utilizar o nitrato como aceptor final de elétrons durante o tratamento.

Segundo Sietz; Cypionka apud Dunsmore et al. (2004), a troca respiratória de sulfato por nitrato pelas BRS pode ocorrer mesmo quando concentrações ilimitadas de sulfato e nitrato estão presentes, o que acaba gerando competição entre BRS e BRN pelo íon nitrato quando ambas as espécies químicas estão disponíveis no ambiente. Algumas espécies dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e *Desulfomonas* são capazes de utilizar nitrato como aceptor final de elétrons, formando amônia como produto final, através de uma via desassimilativa que envolve a ação da enzima nitrato redutase (DUNSMORE et al., 2004; CYPIONKA, 1995; MOURA et al., 1997). B∅dtker et al. (2008) monitoraram o efeito a longo prazo da aplicação de nitrato sobre a atividade de BRS e relataram que baixas aplicações contínuas do íon (cerca de 20,5 mg/L) foram capazes de reduzir a população de BRS presentes em biofilmes. No entanto, os autores destacaram que, embora o predomínio no biofilme tratado continuamente com nitrato fosse de populações de BRN (10^6 - 10^7 células/cm^2), ocasionalmente houve a quantificação de populações de BRS até 10^8 células/cm^2.

Com relação aos valores de EPS presentes no biofilme, observa-se que a presença de BRN resultou em aumento considerável da síntese do biopolímero, sendo determinado um valor de 0,1372 mg/cm^2 de EPS em biofilmes formados sobre os cupons de aço carbono expostos à água de produção aos 10 dias de exposição.

Com o propósito de fundamentar os resultados levantados pelas análises microbiológicas, bem como compor uma avaliação mais criteriosa dos biofilmes formados, foram feitas observações dos materiais aderidos aos corpos de prova através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 4.20 e 4.22). Simultaneamente, algumas partes visualizadas por MEV foram analisadas por espectroscopia de energia dispersiva (Figuras 4.21 e 4.23), que são apresentados nas figuras a seguir.

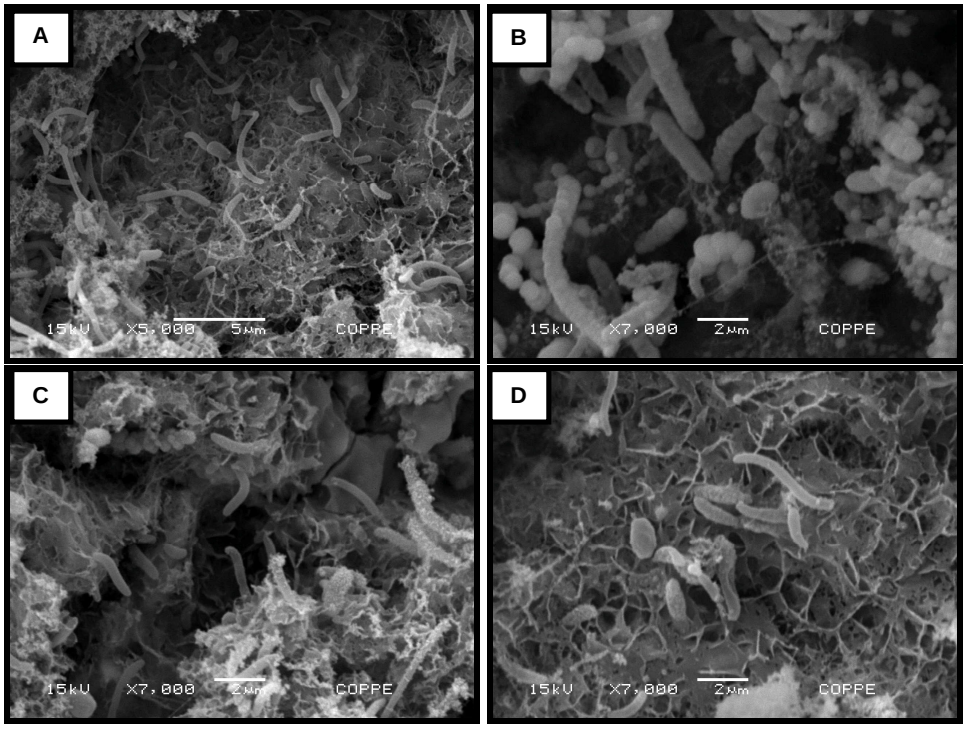


Figura 4.20: Micrografia Eletrônica de Varredura dos biofilmes formados pela exposição de cupons de aço carbono à água de produção na presença de BRS e ausência de nitrato e BRN (batelada 4 - Controle). (A) Aumento: 5000 X. (B) Aumento: 7000X. (C) Aumento: 7000 X. (D) Aumento: 7000 X.

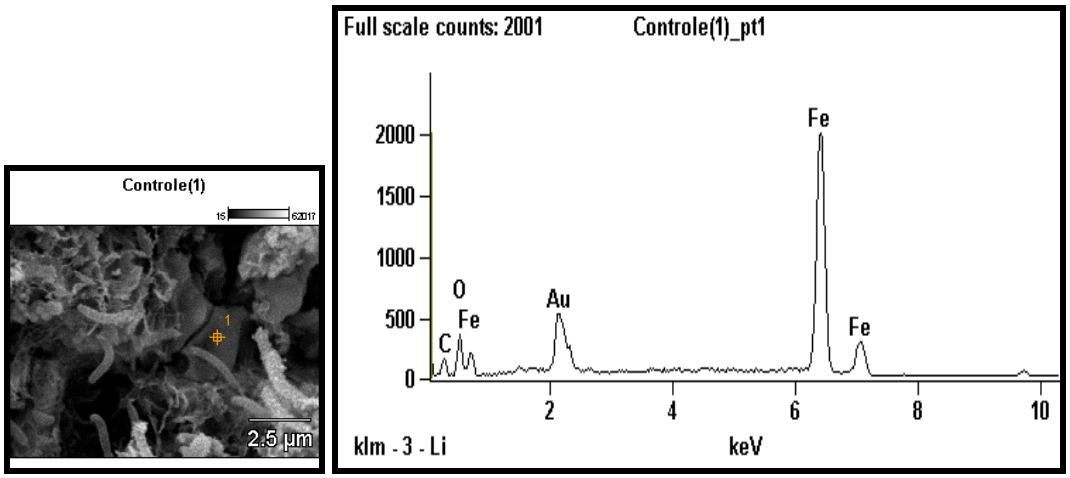


Figura 4.21: Gráfico de EDS dos produtos de corrosão formados sobre os corpos de prova expostos à água de produção na presença de BRS e ausência de nitrato e BRN (batelada 4- Controle)

Na batelada 4, isto é, na presença de BRS e ausência de nitrato e BRN, as imagens da MEV (Figuras 4.20 A, B, C e D), realizadas em distintos pontos dos corpos de prova,

revelaram a presença expressiva de BRS e de material polimérico, o que corrobora os valores determinados para concentração celular e para EPS. Morfologicamente, verifica-se principalmente a ocorrência de bacilos curvos (Figura 4.20 C e D). Como constatado na Figura 4.21, o gráfico de EDS revelou a presença elevada de ferro, possivelmente resultante do processo corrosivo do corpo de prova, desencadeado pelo sulfeto gerado pela atividade metabólica das BRS. Como anteriormente mencionado, o sulfeto de ferro, é um agente comprovadamente corrosivo. Segundo Gentil (2003), as BRS como micro-organismos anaeróbios, conduzem a corrosão abaixo de tubérculos (camadas de produto de corrosão), sob os quais desenvolvem-se pites profundos, em função do ataque ao metal pelos sulfetos produzidos durante seu metabolismo.

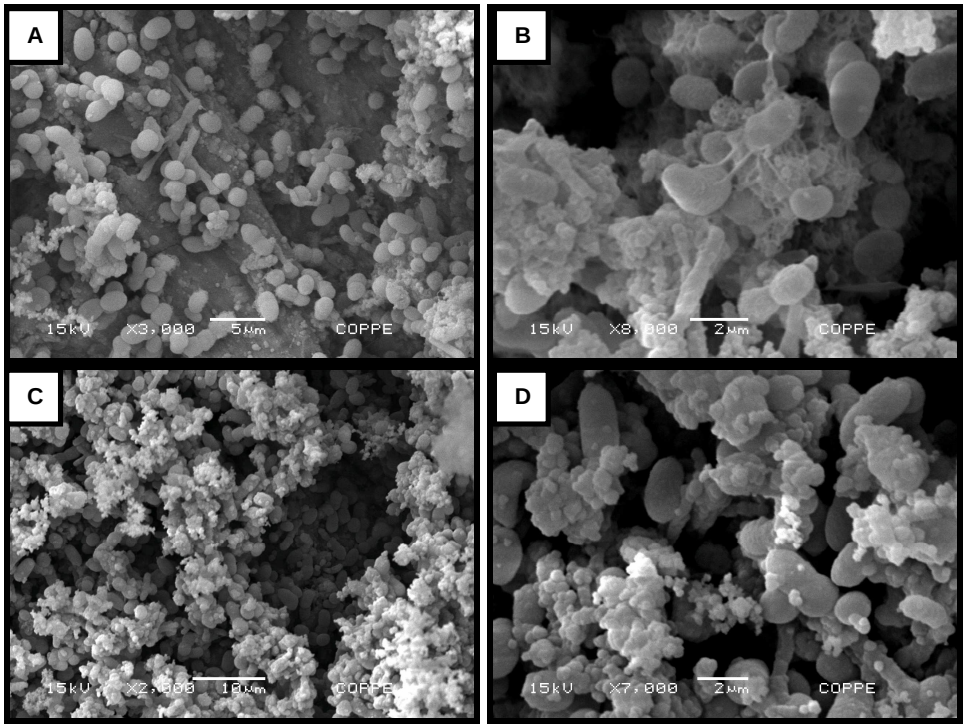


Figura 4.22: Micrografia Eletrônica de Varredura dos biofilmes formados pela exposição de cupons de aço carbono à água de produção na presença de BRS e BRN e de injeções intermitentes de nitrato (batelada 5) (A) Aumento: 3000 X. (B) Aumento: 8000X. (C) Aumento: 2000 X. (D) Aumento: 7000 X.

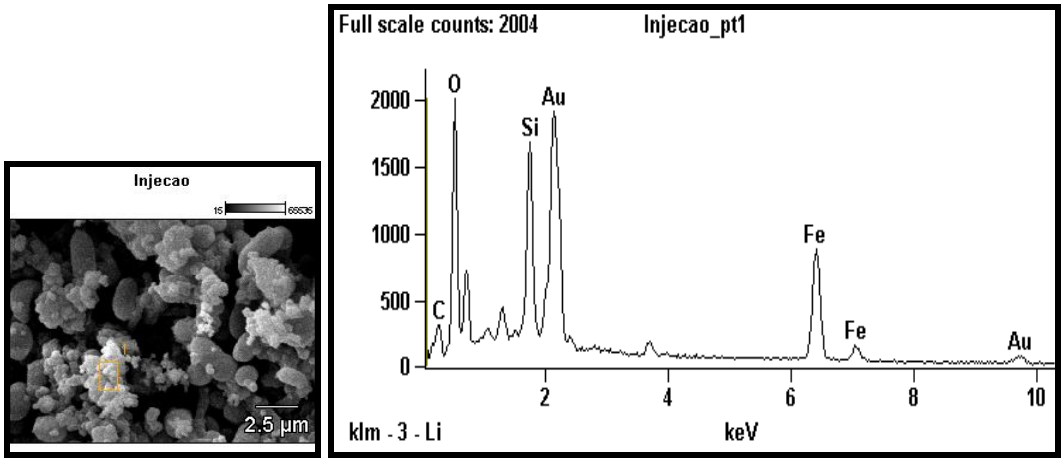


Figura 4.23: Gráfico de EDS dos produtos de corrosão formados sobre os corpos de prova expostos à água de produção presença de BRS e BRN e de injeções intermitentes de nitrato (batelada 5)

As imagens de MEV dos biofilmes formados sobre os corpos de provas nas condições da batelada 5 (injeção intermitente de nitrato e presença de BRS e BRN) demonstram claramente a presença de BRN (*Halomonas halodenitrificans*), pela morfologia na forma de cocos, comprovando a sua elevada concentração celular determinada nos biofilmes (Figuras 4.22 A, B, C e D). E, embora a quantificação de BRS sésseis tenha revelado uma população de 4,3 x 10^6 NMP/cm^2, as imagens da MEV não identificaram, pelo menos nas várias regiões observadas, a presença de BRS. Possivelmente, isso se deve à colonização desses micro-organismos em nichos mais profundos do biofilme (regiões anaeróbias). As imagens também revelam claramente a presença de EPS (Figura 4.22 B), provavelmente sintetizado pelas BRN, o que corrobora com estudos realizados com o gênero *Halomonas*, que descrevem a capacidade desses micro-organismos halofílicos em sintetizar EPS (ROJAS; MIRANDA; AMARO, 2009; KAZAK, et al., 2007; MATA, et al., 2006; MARTÍNEZ-CÁNOVAS, et al., 2004; BOUCHOTROCH, et al., 2001). Com relação ao gráfico de EDS (Figura 4.23) a presença de elevados teores de oxigênio e baixos teores de ferro depositados podem indicar que a presença das BRN inibiu parcialmente a atividade metabólica das BRS, que não mais produziram sulfeto.

As Figuras 4.24 e 4.25 apresentam os corpos de prova submetidos aos ensaios de perda de massa executados nas bateladas 4 e 5, respectivamente. Aportando-se diretamente aos valores de taxas de corrosão para as bateladas 4 e 5, estimados através dos ensaios de perda de massa, notou-se que os corpos de prova nas condições da batelada 4 (Controle) apresentaram um valor (0,09 mm/ano) menor do que a registrada para aqueles retirados da

batelada 5 (0,38 mm/ano). Segundo os parâmetros de corrosividade (Norma NACE RP-07-75, 1999), a corrosão nas condições da batelada 4 pode ser classificada como moderada, ao passo que na batelada 5 a corrosão foi severa.

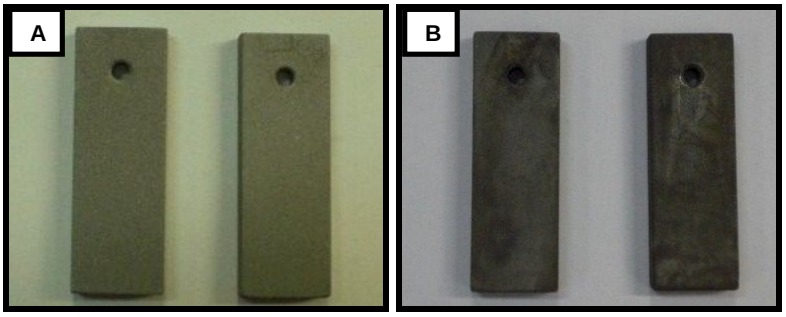


Figura 4.24: Corpos de prova utilizados nos ensaios de perda de massa na batelada 4. (A) visão dos corpos de prova antes do ensaio; (B) visão dos corpos de prova ao final do ensaio

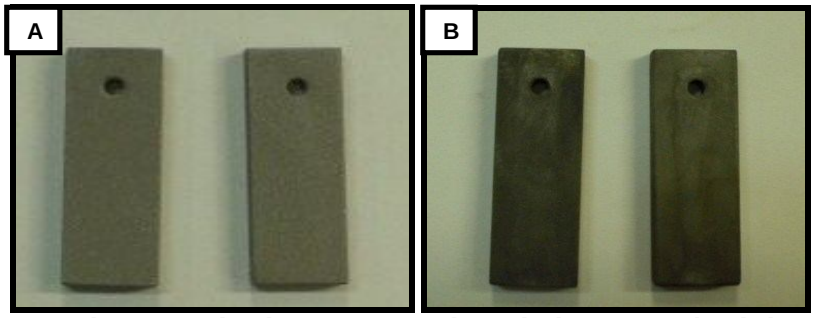


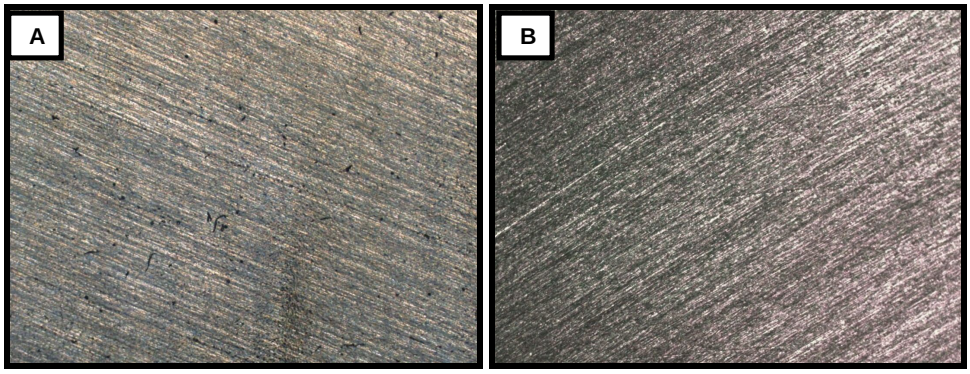
Figura 4.25: Corpos de prova utilizados nos ensaios de perda de massa na batelada 5. (A) visão dos corpos de prova antes do ensaio; (B) visão dos corpos de prova ao final do ensaio

A alta salinidade do MAP deve ser um fator a ser considerado, uma vez que essa característica torna o ambiente altamente corrosivo. Comparativamente, a perda de massa inferior registrada na batelada 4, pode ser atribuída à formação de um filme passivante de FeS que conferiu à superfície metálica uma certa proteção contra o ataque de íons cloreto (NASCIMENTO, 2003; MA et al.,2000). Os filmes de FeS, quando altas concentrações de sulfeto são presentes, são duros e aderentes à superfície do aço. Em contrapartida, quando as concentrações de sulfeto são baixas, a camada de sulfeto de ferro produzido não é aderente e têm aspecto gelatinoso, conferindo pequena ou nenhuma proteção ao metal (SHANNON;

BOGGS 1975). Logo, a formação de uma camada relativamente protetora de FeS (Figura 4.24 B) possivelmente relacionou-se com a presença de altas concentrações de sulfeto no meio reacional da batelada 4, que ao final de 10 dias se situavam em torno de 265,8 mg/L (sulfeto total acumulado). No entanto, mesmo com a formação de uma camada eventualmente protetora de FeS, as taxas de corrosão registradas na batelada 4 são superiores àquelas descritas na literatura. Nemati; Jenneman; Voordouw (2001) reportam uma taxa média de 0,01 a 0,06 mm/ano para culturas puras de *Desulfovibrio* sp Lac 6 e para consórcio de BRS, respectivamente. Rempel; Evitts; Nemati (2006) apontam para taxas de corrosão ainda mais baixas de 0,003 a 0,02 mm/ano, mediante a presença de somente BRS. E Hubert et al. (2005) descrevem taxas de 0,01 a 0,4 mm/ano para cupons atacadas por cultura mista de BRS.

Já o registro de altas taxas de corrosão, apresentado na batelada 5, pode ter sido relacionado à presença contínua de nitrato no meio e atividade de BRN. Embora a produção de sulfeto total acumulado tenha sido elevada e, ao final de 10 dias de processo conseguiu alcançar um valor de 285,2 mg/L, esse alto valor de sulfeto no meio reacional não conferiu a mesma proteção ocorrida na batelada 4. Trabalhos como os de Voordouw; Nemati; Jenneman (2002) verificaram que aplicações de nitrato providenciaram aumentos consideráveis nas taxas de corrosão. Segundo os autores, a taxa de corrosão na ausência de BRS e BRN-OS e de sulfeto foi de 0,004 mm/ano, independente da concentração de nitrato aplicada. Já na presença exclusiva de sulfeto (sem a presença de BRS e BRN-OS), as taxas de corrosão apresentaram resultados similares. No entanto, a adição de sulfeto e de BRN-OS desencadeou um aumento da taxa de corrosão para 0,040 mm/ano. Houve ainda a elevação das taxas de corrosão para 0,075 mm/ano quando presentes 620 mg/L de nitrato, BRS e BRN-OS. Nemati; Jenneman; Voordouw (2001) descrevem taxas de corrosão para sistemas tratados somente com nitrato de 0,14 mm/ano e para sistemas tratados com nitrato e BRN-OS de 0,1 mm/ano. Percebe-se, entretanto, que os valores registrados no presente estudo são bem superiores, possivelmente em função das aplicações intermitentes de nitrato no sistema. Taxas similares, variando de 0,23 a 0,48 mm/ano, foram detectadas nos estudos de B∅dtker et al. (2008) em sistemas tratados com injeções contínuas de nitrato.

As Figuras 4.26 A e B apresentam as superfícies metálicas dos corpos de prova, antes do início dos experimentos, submetidos às condições das bateladas 4 e 5, respectivamente



Figuras 4.26: Superfície dos corpos de prova antes de serem submetidos às condições da batelada 4 (A) (Aumento 50 X) e da batelada 5 (B) (Aumento 50 X)

As Figuras 4.27 A e B apresentam as superfícies metálicas dos corpos de prova após a condução dos ensaios da batelada 4. A análise das superfícies metálicas permitiu observar uma corrosão localizada na forma de pites, o que corrobora as baixas taxas de corrosão verificadas através dos ensaios de perda de massa. Nos corpos de prova examinados, notou-se que duas áreas sofreram ataque localizado, para as quais foi estimada uma densidade média de 3,8 x 10^6 pites/m^2, com uma profundidade média de 9,4 µm (Figura 4.28). O valor de delta z na Figura 4.28 representa a estimativa da profundidade do pite

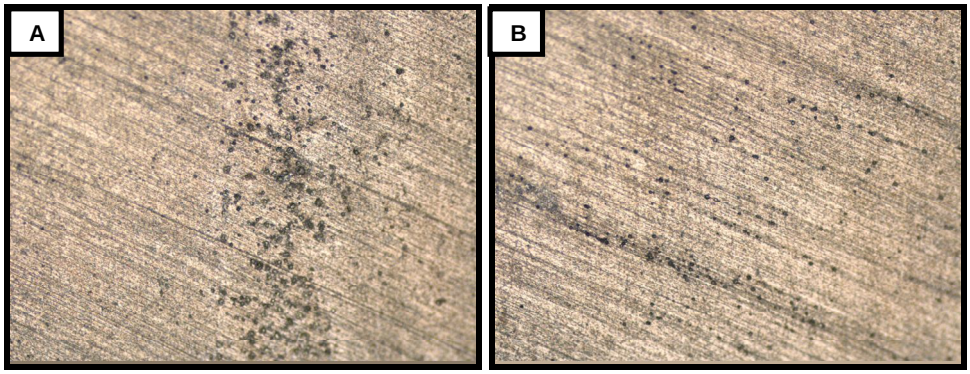


Figura 4.27: Superfícies metálicas de duas áreas distintas (A e B), dos corpos de prova após os ensaios de avaliação da corrosão por pite na batelada 4 (Aumento de 200 X)

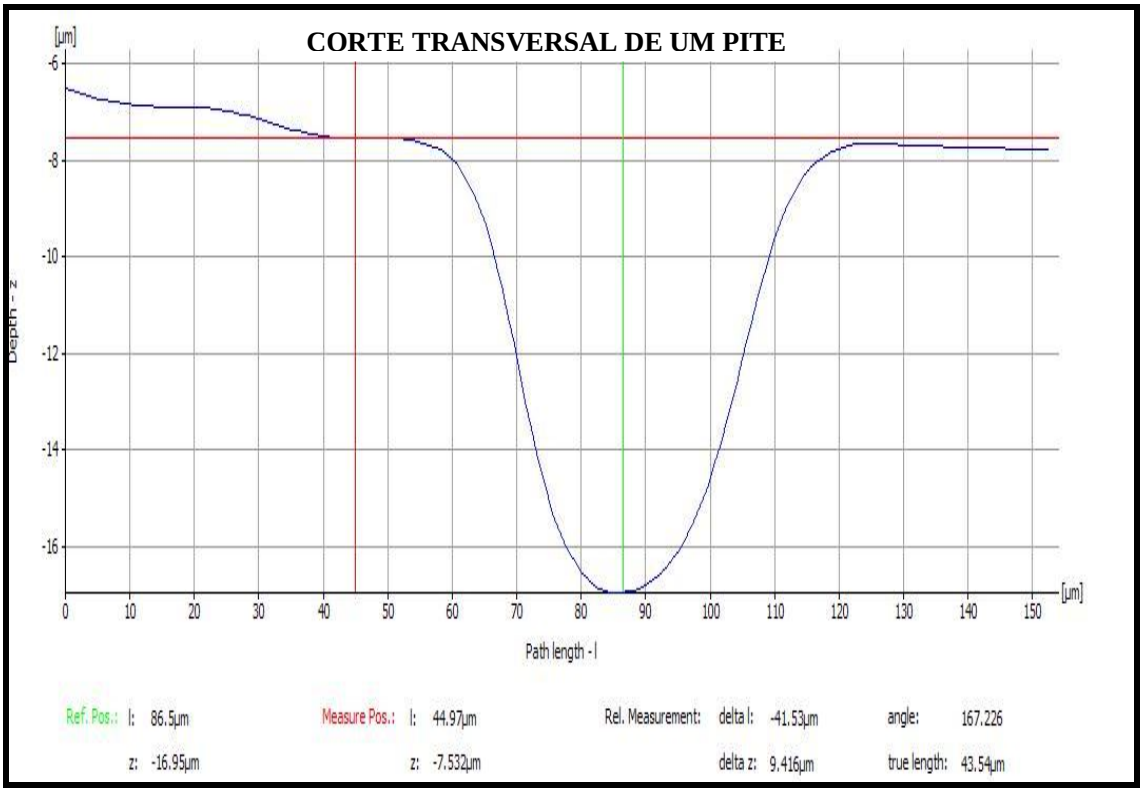
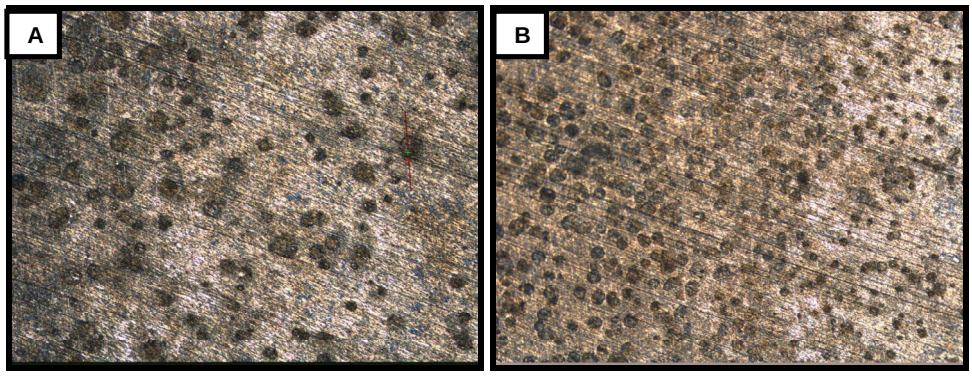


Figura 4.28: Imagem representativa do corte transversal de um pite

Diferentemente da batelada 4, notou-se que para a batelada 5, as altas taxas de corrosão provavelmente associaram-se com corrosão por perda de massa e não especificamente com corrosão localizada. Isso é evidente ao se examinar as imagens das Figuras 4.29 A e B.



Figuras 4.29: Superfícies metálicas, de duas áreas distintas (A e B), dos corpos de prova após os ensaios de avaliação da corrosão por pites na batelada 5 (Aumento de 200 X - A) e (Aumento de 100 X - B)

Sabe-se também, que o nitrato pode se tornar potencialmente corrosivo quando convertido biologicamente a nitrito, sendo a capacidade corrosiva desse íon dependente de sua concentração. O nitrito em concentrações elevadas torna-se um agente inibidor da corrosão, pois acaba sendo responsável pela formação de uma camada passivante sobre o aço carbono. Entretanto, em baixas concentrações acaba se associando ao aumento do processo corrosivo, quer pela distribuição não uniforme do material aderido quer pela formação de pites (GENTIL, 2003). Supostamente, a disponibilidade de baixas concentrações de nitrito na batelada 5 tenha sido o fator desencadeador do processo corrosivo dos corpos de prova, uma vez que este íon, pela metodologia aplicada no estudo, não foi detectado no meio reacional. Provavelmente, a baixa disponibilidade do nitrito se deve a seu uso como aceptor final de elétrons pelas BRN e pelas BRS presentes no consórcio capazes também de utilizar este íon. A capacidade de algumas espécies de BRS utilizarem nitrito já foi documentada por Moura et al. (1997) e Mitchell; Jones; Cole (1986).

Alguns estudos destacam que a aplicação de nitrato para controle de *souring* pode ser relacionado também com o surgimento de corrosão localizada na forma de pites, principalmente em sistemas em que o íon nitrito esteja presente. Rempel; Evitts; Nemati (2006) estudaram três cenários: sistemas tratados somente com nitrito, sistemas tratados somente com nitrato e sistemas tratados com nitrato e BRN-OS. Nos três cenários foi evidenciada aceleração das taxas de corrosão e da corrosão localizada, registrando-se os seguintes valores: 0,3 mm/ano, 1,4 mm/ano e 0,72 mm/ano, respectivamente. O estudo cita apenas a ocorrência de corrosão localizada por pites e não avalia a densidade ou profundidade dos mesmos.

O presente estudo confirma a relevância da análise da presença de pite para determinar a natureza do processo corrosivo. Além disso, mostra o risco de corrosão associado ao uso de nitrato como alternativa de mitigação do *souring*. Os dados ainda corroboram com a descrição da literatura, ao relatar a intensificação das taxas de corrosão quando presente uma população de BRN, principalmente as BRN-OS, que eventualmente poderiam estar presentes no consórcio enriquecido de BRS usado no presente estudo. As investigações realizadas também permitiram comprovar a manutenção de alta população de BRS sésseis, mesmo após a introdução de bactérias redutoras de nitrato (BRN) e injeções intermitentes de nitrato (427,5 mg/L).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

Em relação ao planejamento experimental pode-se concluir que:

- A produção de sulfeto pode ser reduzida pela adição de nitrato quando baixas concentrações de BRS e BRN estão presentes, sendo o menor valor de sulfeto obtido nesta condição com uma maior concentração de nitrato e em intervalo menor que 14 dias. Os resultados também sugeriram que as aplicações de nitrato para controle do processo de *souring* devem seguir um regime intermitente.

- A condição mais efetiva para a redução da produção de sulfeto (concentrações finais de 0,4 – 1,6 mg/L) foi obtida com população inicial de BRS e BRN de 10^4 NMP/ mL e 427,5 mg/L de nitrato.

No estudo agitado da produção biogênica de sulfeto concluiu-se que:

- Na presença exclusiva de BRS e ausência de nitrato, a geração de sulfeto ocorreu vinculada à redução de sulfato pela ação de BRS, estando a liberação de sulfeto também associada à transformação química/biológica de compostos sulfurosos presentes na água produzida;

- Na presença de BRS e BRN e mediante aplicação única ou intermitente de 427,5 mg/L de nitrato, caso o sistema a ser tratado esteja sujeito à ocorrência de espécies de BRS que utilizam o nitrato como aceptor final de elétrons, a aplicação de nitrato pode apenas inibir a redução de sulfato e não a atividade das BRS, ocorrendo o aumento da produção de sulfeto após o esgotamento da fonte de nitrato.

- As análises dos dados levantados no sistema agitado confirmaram as constatações encontradas pelos ensaios estáticos do planejamento experimental na mesma condição, ou seja, a ocorrência de uma relação direta entre as concentrações iniciais de micro-

organismos e do íon nitrato disponível e seu tempo de permanência no sistema. Enfatiza-se que a reprodução das condições do planejamento experimental no sistema agitado desencadeou uma intensificação da produção de sulfeto.

Em relação aos ensaios de corrosão concluiu-se que:

- As taxas de corrosão no sistema tratado com injeções intermitentes de nitrato foram superiores àquelas registradas em sistema não tratado com o íon, confirmando a associação entre corrosão e o uso intermitente de nitrato para mitigação de *souring*.

5.2. Sugestões

- Incluir pontos axiais no planejamento experimental, com a finalidade de tornar mais criteriosa a análise estatística dos dados;
- Testar o efeito de outros sais de nitrato na mitigação do *souring*;
- Testar o efeito do tratamento com nitrato em condição de termofilia, uma vez que no modelo de zona de mistura considera-se uma faixa maior de temperatura para a produção de sulfeto biogênico;
- Testar o efeito de aplicações contínuas do íon nitrato para o controle do *souring*;
- Monitorar a evolução dos grupos microbianos envolvidos nas diferentes condições experimentais, empregando-se técnicas de biologia molecular;
- Avaliar a biogênese de sulfeto com diferentes culturas puras de BRS, BRN e BRN-OS, a fim de comprovar o papel de cada grupo microbiano no processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITANI, A.; ALI, M. F.; AL-ALI, H. H. A review of non-conventional methods for the desulfurization of residual fuel oil. **Petroleum Science and Technology**, v.18, n. 5-6, p. 537-553, 2000.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and waster**. 18. ed. Washington: APHA, AWWA, WPCF, 1992.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM G46-94**: Examination and evaluation of pitting corrosion. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 2005. 8p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM G1-90** (Reapproved 1999): Standard practice for preparing, cleaning, and evaluating corrosion test specimens. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1999. 8p.

BØDTKER, G; LYSNES, K.; TORSVIK, T.; BJØRNESTAD, E. Ø.; SUNDE, E. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir. **Journal Industrial Biotechnology**, v.36, p. 439-450, 2009.

BØDTKER, G; THORSTENSON, T.; LILLEBØ, B. P.; THORBJØRNSEN, B.; ULVØEN, R.; SUNDE, E.; TORSVIK, T. The effect of long-term nitrate treatment on SRB activity, corrosion rate and bacterial community composition on offshore water injection systems. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1625-1636, 2008.

BARTON, L. L.; TOMEI, F. A. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: BARTON, L. L.(Ed.). **Sulfate-reducing bacteria**. New York: Plenum Press, 1995. cap. 1, p. 1-32. (Biotechnology Handbooks, 8).

BEER; D.; STOODLEY, P.. Microbial Biofilms. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes.** 5.ed. Nova Iorque: Springer, 2006. 1 v. cap.3.10, p. 904-937.

BOUCHOTROCH, S.; QUESADA, E.; DEL MORAL, A.; LLAMAS, I.; BÉJAR, V. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1625–1632, 2001.

BRYERS, J.; CHARACKLIS, W.G. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics. **Water Research.** v. 15, p. 483-491. 1981.

BURSAKOV, S. A.; CARNEIRO, C.; ALMENDRA, M. J. Enzymatic properties and effect of ionic strength on periplasmic nitrate reductase (NAP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 239, n. RC977560, p. 816–822, 1997.

CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 1-4, 1998.

CHAN, K.Y., XU, L.C., FANG, H.H.P. Anaerobic electrochemical corrosion of mild steel in the presence of extracellular polymeric substances produced by a culture enriched in sulfate-reducing bacteria. **Environmental Science Technology**, v. 36, n.8, p.1720-1727, 2002.

CHANG, Y. J.; CHANG, Y. T.; CHEN, H. I. A method for controlling hydrogen sulfide in water by adding solid phase oxygen. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 478-483, 2007.

CLARK, J. B.; LUPPENS, J. C.; TUCKER, P. T. Using ultraviolet radiation for controlling sulfate-reducing bacteria in injection water. In: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 1984, Houston. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1984. paper SPE 13245.

COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1, p. 29-46, 1995.

CYPIONKA, H. Solute transport and cell energetics. In: BARTON, L. L.(Ed.). **Sulfate-reducing bacteria**. New York: Plenum Press, 1995. cap. 6, p. 151-184. (Biotechnology Handbooks, 8).

DAVIDOVA, I.; HICKS, M. S.; FEDORAK, P. M.; SULFITA, J. M. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of Industrial Mirobiology & Biotechnology**, v. 27, p. 80-86, 2001.

DINNING, A. J.; JENNERMAN, G. E.; VOLDUM, K.; VIK, E. **A. The use of nitrate/nitrite on control in PWRI – experiences Ekofisk Field**. 2004: Trabalho apresentado ao 15º INTERNATIONAL OILFIELD CHEMISTRY SYMPOSIUM, Geilo, 2004.

DINNING, A. J.; OLIPHANT, D.; VIK, E. A.; BRUAS, L. Initial souring monitoring and souring-mitigation testing using an online souring-mitigation cabinet (SMC) prior to live produced water reinjection (PWRI) and nitrate-based souring-mitigation treatment on Norske Shell's Draugen Platform. In: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 2005, Houston. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 2005. paper SPE 93281.

DOLLA, A.; FOURNIER, M.; DERMOUN, Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. **Journal of Biotechnology**, v.129, p. 87-100, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p. 350 – 356, 1956.

DUNSMORE, B; EVANS, P. **Produced water re-injection and its impact on reservoir souring**. 2005. Trabalho apresentado ao Produced Water Club/Nel Meeting, Aberdeen, Reino Unido, 2005. Disponivel em: <www. oilplus.co.uk/company/techpapers.htm>. Acesso em: 15 dez. 2006.

DUNSMORE, B. C.; WHITFIELD, T. B.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D. Corrosion by sulfate-reducing bacteria that utilize nitrate. In: CORROSION 2004, New Orleans. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2004. paper 04763.

ECKFORD, R. E.; FEDORAK, P. M. Chemical and microbiological changes in laboratory incubations of nitrate amendment "sour" produced waters from three western Canadian oil field. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 242-254, 2002a.

_____ Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 83-92, 2002b.

ENERGY INSTITUTE. **The stimulation of nitrate-reducing bacteria (NRB) in oilfiled systems to control sulphate-reducing bacteria (SRB), microbiologically influenced corrosion (MIC) and reservoir**: an introductory review. London: Energy Institute, 2003. 24p.

FAUQUE, G. Ecology of sulfate-reducing bacteria. In: BARTON, L. L.(Ed.). **Sulfate-reducing bacteria**. New York: Plenum Press, 1995. cap. 8, p. 217-242. (Biotechnology Handbooks, 8).

FAUQUHAR, G. B. Review and update of technology related to formation *souring*. In: CORROSION 1997, New Orleans. **Proceedings**....Houston: NACE International, 1997. paper 210**.**

FREIRE, D. D. C.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L.; A proposed methods modification for the determination of COD in saline water. **Environmental Technology**, v. 19, p. 1243-1247, 1998.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE (Rio de Janeiro). **Métodos FEEMA.** Rio de Janeiro, 1983. 2v.

GALVÃO, M. M. **Efeito do potencial de proteção catódica na corrosão microbiologicamente induzida**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GARCIA-DE-LOMAS, J.; CORZO, A.; PORTILLO, M. C.; GONZALEZ, J. M.; ANDRADES, J. A., SAIZ-JIMENEZ, C.; GARCIA-ROBLEDO, E. Nitrate stimulation of indigenous nitrate-reducing, sulfide-oxidising bacterial community in wastewater anaerobic biofilms. **Water Research**, v. 41, p. 3121 – 3131, 2007.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 354-360, 2002.

GENTIL, V. **Corrosão**. 4.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003. 341p. (Livros Técnicos e Científicos)

GEVERTZ, D.; TELANG, A. J.; VOORDOUW, G.; JENNEMAN, G.E. Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2491-2501, 2000.

GOLDSTEIN, J.; NEWBURY, D.; JOY, D.; LYMAN, C.; ECHLIN, P.; LIFSHIN, E.; SAWYE, L.; MICHAEL, J. Advanced scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. 3 ed. New York: Plenum Press , 2003. 724p.

GONÇALVES, N.J.; FRANÇA, F.P.; SÉRVULO, E.F.C. Evaluation of commercial biocides efficacy on biofilm during shock treatment. In: 5º CONGRESO DE CORROSIÓN DE LA NACE REGIÓN LATINOAMERICA, 2003, Santiago. **Anais**…Santiago, 2003, p. 894-899.

GREENE, E. A.; HUBERT, C.; NEMATI, M.; JENNEMAN, G. E. VOORDOUW, G. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 607-617, 2003.

HARLEY, J. P.; PRESCOTT, L. M. **Laboratory Exercises in Microbiology**. 5 ed. Berkshire: McGraw-Hill, 2001, p. 202-203.

HARRICAN, W. F; MACCANCE, M. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. 1 ed. London: Academic Press, 1976. 464p.

HARRISON JÚNIOR, A. P. Microbial sucession ansd mineral leaching in a artificial coal spoil. **Apllied and Environmental Microbiology**, n. 131, p. 68-76, 1982.

HAVEMAN, S. A.; GREENE, E. A.; VOORDOUW, G. Gene expression analysis of the mechanism of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1461-1465, 2005.

HITZMAN, D. O.; DENNIS, D. M. Sulfide removal and prevention in gas wells. SPE **Reservoir Evaluation & Engineering**. Society of Petroleum Engineers, paper SPE 50980, p. 367-371. 1998

HITZMAN, D. O.; SPERL, G. T. A new microbial technology for enhanced oil recovery and sulfide prevention and reduction. In: SPE/DOE SYMPOSIUM ON IMPROVED OIL RECOVERY, 9., 1994, Tulsa. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1994. paper SPE/DOE 27752.

HSI, C. D.; DUDZIK, D. S.; LANE, R. H.; BUETTNER, J. W. NEIRA, R. D. Formation injectivy damage due to produced water reinjection. In: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 1994, Houston. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1994. paper SPE 27395.

HUBERT, C.; NEMATI, M.; JENNEMAN, G.; VOORDOUW. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Applied Microbiology Biotchnology**, v. 68, p. 272-282, 2005.

_____. Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 338-345, 2003.

HUBERT, C.; VOORDOUW**,** G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron eonors **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2644-2652. Apr. 2007,

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo, 1985. 1 v.

JACOBS, M. B.; BRAVERMAN, M. M. ;HOCHEISER, S. Ultramicrodetermination of sulfides in air. **Analytical Chemistry**, v. 29, p. 1349-1351, 1957.

JENNEMAN, G. E.; DINNING, A. J.; VOLDUM, K.; VIK, E. **A. The effect of nitrate/nitrite on control of souring in produced water at the Ekofisk Field**. 2004. Trabalho apresentado ao NIF Internacional Produced Water Conference, Stavanger, 2004.

JENNEMAN, G. E.; MOFFITT, P. D.; BALA, G. A.; WEBB, R. H. Sulfide removal in reservoir brine by indigenous bacteria. **Society of Petroleum Engineers Production & Facilities**, v. 14, n. 3, p. 219-225, 1999.

JORDAN, L. C.; WALSH, J. M. Selection of an active souring management solution for a Gulf of Mexico waterflood. In: CORROSION 2004, New Orleans. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2004. paper 04759**.**

KASTER, K. M.; GRIGORIYAN, A.; JENNEMAN, G.; VOORDOUW. Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field int he North Sea. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 195-203, May 2007. Supplement 9.

KAZAK, H.; GÜRLEYENDAG B.; POLI, A.; ÖNER, E. T.; NICOLAUS, B. Exopolysaccharide production by *Halomonas* strains isolated from Turkey. Journal of Biotechnology, v. 131, n. 2, p. S163, Set. 2007. Supplement 1.

KHATIB, Z. I.; SALANITRO, J. P. Reservoir souring: analysis of surveys and experience in sour waterfloods. In: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 1997, San Antonio. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1997. paper SPE 38795.

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

LABAS, M. D.; MARTÍN, C. A.; CASSANO, A. E.. Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium. **Chemical Engineering Journal**, v. 114, p. 87-97, 2005.

LARSEN, J. SANDERS, P. F.; TALBOT, R. E. Experience with the use of tetrakishydroxymethylphosphonium sulfate (THPS) for the control of downhole hydrogen sulfide. In: CORROSION 2000, San Diego. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2004. paper 00123.

LENS, P. N. L.; VISSER, A.; JANSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Biotechnological treatment of organic sulphate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41-88, 1998.

LENS, P.; MASSONE, A.; ROZZI, A.; VERSTRAETE, W. Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors. **Water Research**, v. 29, n. 3, p. 857-870, 1995.

LEWANDOWSKI, Z., STOODLEY, P., ROE, F. Internal mass transport in heterogeneous biofilms: recent advances. In: CORROSION 1995, New Orleans. **Proceedings**....Houston: NACE International, 1995. paper 222.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452-463, 2007.

LIGTHELM, D. J.; DE BOER, R. B.; BRINT, J. F.; SCHULTE, W. M. Reservoir souring: an analytical model for H_2S generation and transportation in an oil reservoir owing to bacterial activity. **Society of Petroleum Engineers**, Richardson, SPE 23141, 1991. Trabalho apresentado a Offshore Europe Conference, 1991. Aberdeen.

LONDRY, K. L.; SULFITA, J. M. Use of nitrate to control sulfide generation by sulfate-reducing bacteria associated with oily waste. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 582-589, 1999.

LYSNES, K.; B∅DTKER, G.; TORSVIK, T.; BJ∅RNESTAD, E. ∅.; SUNDE, E. Microbial response to reinjection of produced water in an oil reservoir. **Applied Microbiology Biotechnology**. DOI. 10.1007/s00253-009-2015-7, 2009.

MA, H. The influence of hydrogen sulfide on corrosion of iron under different conditions. **Corrosion Science**, v.42, n.10, p.1669-1683, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Tradução de Cynthia Maria Kiaw. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MAGOT, M.; BASSO, O.; TARDY-JACQUENOD, C.; CAUMETTE, P. *Desulfovibrio bastinni* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderatety halophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1693-1697, 2004.

MALI, P. V.; KHANRA, A.; SAGAR, P. K.; MESHRAM, P. N.; SINGH, R. K.; JOHARI, A. Strategies to mitigate corrosion caused due to H_2S in wells and well fluid lines of Mumbai Offshore, Índia. In: SPE MIDDLE EAST OIL SHOW & CONFERENCE, 13., 2003, Bahrain. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 2003. paper SPE 81457.

MARIETOU, A.; RICHARDSON, D.; COLE, J.; MOHAN, S. Nitrate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*: a periplasmic nitrate reductase system that lacks NapB, but includes a unique tetraheme *c*-type cytochrome, NapM. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 217-225, 2005

MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M. J.; QUESADA, E.; LLAMAS, I.; BÉJAR, V. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharideproducing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 733–737, 2004.

MATA, J. A.; BÉJAR, V.; LLAMAS, I.; ARIAS, S.; BRESSOLLIER, P.; TALLON, R.; URDACI, M. C.; QUESADA, E. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 827-835, Nov. 2006.

MAXWELL, S.; SPARK, I. Souring of reservoirs by bacterial activity during seawater waterfloodung. In: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 2005, Houston. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 2005. paper SPE 93231.

MCINERNEY, M. J.; BHUPATHIRAJU, V. K.; SUBLETTE, K. L. Evalutional of a microbial method to reduce hydrogen sulfide levels in a porous rock biofilm. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 53-58, 1992.

MCINERNEY, M. J.; WOFFORD, N. Q.; SUBLETTE, K. L. Microbial control of hydrogen sulfite production in a porous medium. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 57-58, p. 933-944, 1996.

MIRANDA-TELLO, E.; FARDEAU, M. L.; FERNANDÉZ, L.; RAMIRÉZ, F.; CAYOL, J. L.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; OLLIVIER, B. *Desulfovibrio capillatus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico. **Anaerobe**, v. 8, p. 97-103, 2003a.

MIRANDA-TELLO, E.; FARDEAU, M. L.; SEPÚLVEDA, J.; FERNANDÉZ, L.; CAYOL, J. L.; THOMAS, P.; OLLIVIER, B. *Garciella nitratireducens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, nitrate-and thiosulfate-reducing bacterium isolated from an oilfield separator in the Gulf of Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 97-103, 2003b.

MITCHELL, G. J.; JONES, J. G.; COLE, J. A. Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. **Archives Microbiology**, v. 144, p. 35-40, 1986.

MOHAN, S. V.; RAO, N. C.; PRASAD, K. K.; SARMA, P.N. Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2849-2857. 2005.

MOURA, I.; BURSAKOV, S.; COSTA, C.; MOURA, J. J. G. Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. **Anaerobe**, v. 3, p. 279-290, 1997.

MUNSHI, H. A.; SASIKUMAR, N.; JAMALUDDIN, A. T.; MOHAMMED, K. Evaluation of ultra-violet radiation disinfection on the bacterial growth in the swro pilot plant, Al-Jubail. In: Gulf Water Conference, 4., 1999, Bahrain. **Proceedings**... Bahrain, 1999.

MYHR, S.; LILLEB∅, B. L. P.; SUNDE, E.; BEEDER, J.; TORSVIK, T. Inhibition of microbial H_2S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 400-408, 2002.

MYHR, S.; TORSVIK, T. *Denitrovibrio acetiphilus*, a novel genus and species of dissimilatory nitrate-reducing bacterium isolated from an oil reservoir model column.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 50, p. 1611–1619, 2000.

NASCIMENTO, J. R. **Avaliação da tecnologia de exclusão biocompetitiva para o controle de processos de acidificação biogênica (*souring*) e corrosão microbiológica na indústria do petróleo**. 2006. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

NATIONAL ASSOCIATION OF CORROSION ENGINEERS. **NACE-RP-07-75**: **p**reparation, installation, analysis, and interpretation of corrosion coupons in oilfield operations. Houston, 1999. 19 p.

NEMATI, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Mechanistic study of Microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 5, p. 424-434, 2001.

NEMATI, M.; MAZUTINEC, T. J.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G. Control of biogenic H_2S production with nitrite and molybdate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 350-355, 2001.

NGA, D. P.; CAMHA, D. T.; HIEN, L. T.; STAN-LOTTER, H. *Desulfovibrio vietnamensis* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium from vietnamese oil fields. **Anaerobe**, v. 2, p. 385-392, 1996.

PENNA, M. O.; OLIVEIRA, H. B.; SILVA, E. D. Avaliação da atividade metabólica (produção de H_2S) de culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS). **Boletim Técnico.da Petrobras**, v. 46, n. 3-4. p. 208 – 219, Jul/Dez. 2003.

PEREIRA, I. A. C., LEGALL, J.; XAVIER, V. A.; TEIXEIRA, M. Characterization of heme c nitrite reductase from a non-ammonifying microorganism, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1481, p. 119-130, 2000.

PEREIRA, I. C.; ABREU, I. A.; XAVIER, A. V.; LEGALL, J.; TEIXEIRA, M. Nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) – a heterooligomer heme protein with sulfite reductase activity. **Biochemical and Biophiysical Research Communications**. v. 224, p. 611-618. paper 1074. 1996.

PEREZ, E. J.; CABRERA-SIERRA, R.; GONZALEZ, I.; RAMIREZ-VIVES, F. Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. **Corrosion Science**, v.49, p. 3580- 3597, 2007.

POL HULSHOFF, L. W.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. **Biodegradation**, v. 9, p. 213-224, 1998.

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2. ed. Cambridge: University Press, 1984. 209 p.

REINSEL, M. A.; SEARS, J. T.; STEWART, P. S.; MCINERNEY, M. J. Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sanstone column. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 17, p. 128-136, 1996.

REMPEL, C.L.; EVITTS, R.W.; NEMATI, M. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 878-886, 2006.

RIZK, T. Y.; STOTT, J.; EDEN, R. D.; DAVIS, R.; MCELHINEY, J. E.; DI IORIO, C. The effect of desulphated seawater injection on microbiological hydrogen sulphide generation and implication for corrosion control. In: CORROSION 1998, San Diego. **Proceedings**....Houston: NACE International, 1998. paper 287.

ROBINSON, K. **Produced water management: an integrated approach**. 2003. Trabalho apresentado ao 1st NEL Produced Water Workshop, Aberdeen, Reino Unido, 2003. Disponivel em: <www. oilplus.co.uk/company/techpapers.htm>. Acesso em: 15 dez. 2006.

ROCHA, S. M. S. **Avaliação da utilização de nitrato por cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS) em efluente contendo sulfato**. 2006. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

ROJAS, R.; MIRANDA, C. D.; AMARO, A, M. Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the

chilean scallop Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819). **Microbiology Ecology**, v. 57, p. 129–139, 2009.

SALINAS, M. B.; FARDEAU, M. L.; CAYOL, J. L.; CASALOT, L.; PATEL, B. K. C.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; OLLIVIER, B. *Petrobacter succinatimandebs* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v. 54, p. 645-649, 2004.

SANDERS, P. F. Overview of souring, corrosion & plugging due to reservoir organisms. In: UK CORROSION 98, Sheffield. **Proceedings**...., 1998. paper 15.

SCHWERMER, C. U.; LAVIK, G.; ABED, R. M. M.; DUNSMORE, T.; FERDELMAN, T. G.; STOODLEY, P.; GIESEKE, A.; BEER, D. Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for injection of seawater into oil fields. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2841-2851, 2008.

SHANNON, J.S.; BOGGS, J.D.A. Nature of sulphides and their corrosive effect on ferrous metals: a review. **Journal Brazilian Corrosion**, v.10, n.3, p.136-142, 1975.

STURMAN, P. J. Solving the oilfield souring puzzle: control of downhole hydrogen sulphide production using nitrite. In: UK CORROSION 2001, Sheffield. **Proceedings**...., 2001. paper 19.

STURMAN, P. J.; GOERES, D. M. Control of hydrogen sulfide in oil and gas wells with nitrite injection. In: SPE ANNUAL TECHNICAL CONFERENCE AND EXHIBITION, 1999, Houston. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1999. paper SPE 566772.

SUNDE, E.; LILLEB∅, B. P.; B∅DTKER, G. TORSVIK, T. THORSTENSON, T. H_2S inhibition by nitrate injection on the Gullfaks Field. In: CORROSION 2004, New Orleans. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2004. paper 04760.

SUNDE, E.; THORSTENSON, T.; TORSVIK, T.; VAAG, J. E.; ESPEDAL, M. S. Field-related mathematical model to predict and reduce reservoir souring. In: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 1993, New Orleans. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1993. p. 449-456.

TAJ, S.; ROAD, H.; PAPAVINASAM, S.; REVIE, R. W. Development of green inhibitors for oil and gas applications. In: CORROSION NACEXPO 2006 – ANNUAL CONFERENCE & EXPOSITION. 61., San Diego. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2006. paper 06656.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009

TELANG, A. J.; EBERT, S.; FOGHT, J. M.; WESTLAKE, D. W. S.; JENNEMAN, G. E.; GEVERTZ, D.; VOORDOUW, G. Effect of nitrate injection on the microbial community in an oil field as monitored by reverse sample genome probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1785-1793, 1997

THORSTENSON, T.; BØDTKER, G.; LILLEBØ, B. P.; TORSVIK, T.; SUNDE, E.; BEEDER, J. Biocide replacement by nitrate in sea water injection systems. In: CORROSION 2002, Denver. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2002. paper 02033.

TORRES, E. S. Cinética **de parâmetros microbiológicos na formação de biofilmes**. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

TYRIE, J. J. Predicted increase in Gullfasks H_2S production associated with injected sea water: application of Biofilm Model. In: ANNUAL TECHNICAL AND EXHIBITION OF THE SOCIETY OF PETROLEUM ENGINEERS, 68., 1993, Houston. **Proceedings**...Richardson: Society of Petroleum Engineers, 1993. paper SPE 26700.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE. Donald O. Hitzman; George T. Sperl; Kenneth A. Sandbeck. **Composition for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system, particularly in an aqueous system used in oil field applications**. N. 5.750.392, 12 mai. 1998.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE. Donald O. Hitzman; George T. Sperl; Kenneth A. Sandbeck. **Method for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system.** N. 5.405.531, 11 abri. 1995.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE. Gary E. Jenneman; Diane Gevertz. **Sulfide-oxidizing bacteria**. N. 5.686.293, 11 nov. 1997.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE. Robert E. Tatnall. **Finely divided anthraquinone formulations as inhibitors of sulfide production from sulfate-reducing bacteria.** N. 5.500.368, 19 mar. 1996.

VIEIRA, D. S. **Avaliação da biodegradação anaeróbia no tratamento de água de produção**. 2003. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

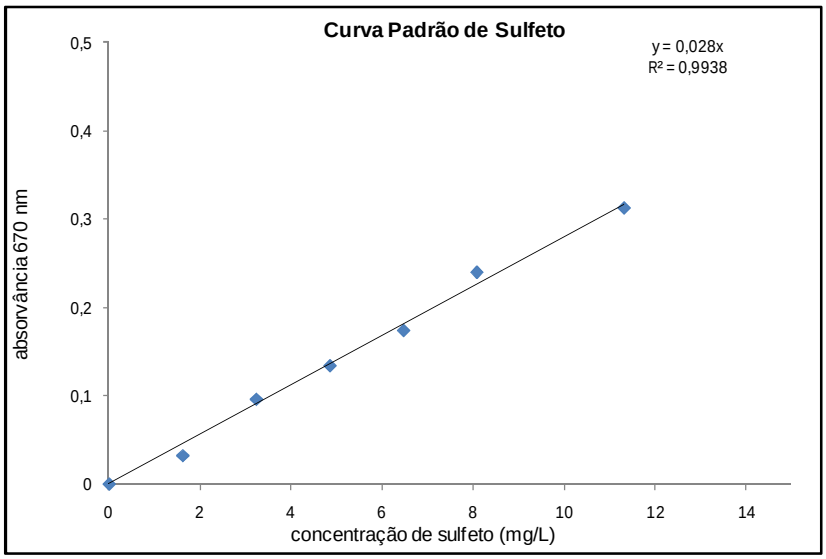
VOORDOUW, G. Impact of nitrate on the sulfur cycle in oil fields. In. DAHL C.; FRIEDRICH, C.G. (Eds). **Microbial Sulfur Metabolism**. Springer, Berlin New York, 2008. cap 23. p. 297-302.

VOORDOUW, G.; JACK, T. **Proposal for NSERC industrial research chair in petroleum microbiology: development of a competency cluster within ISEEE at the University of Calgary**. Calgary, 2005. 10p.

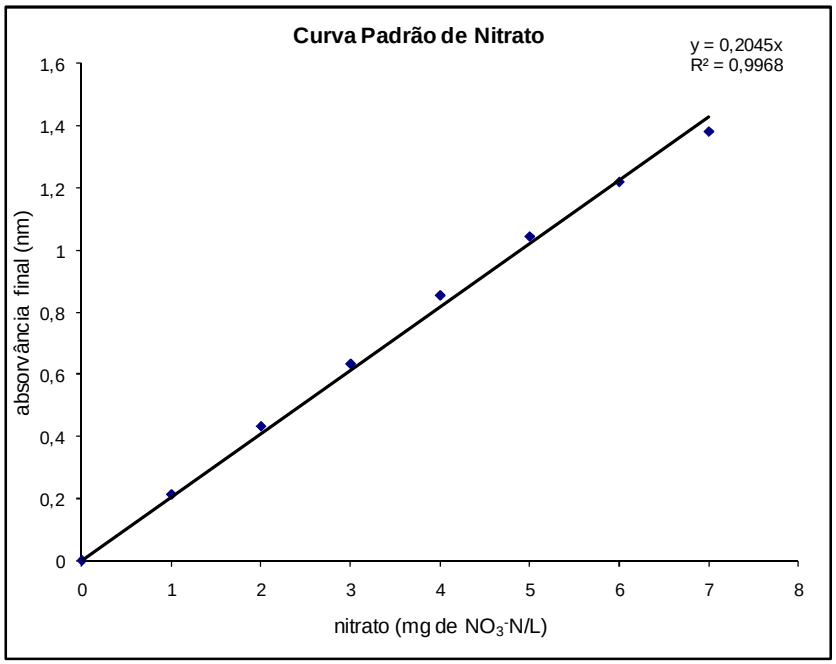
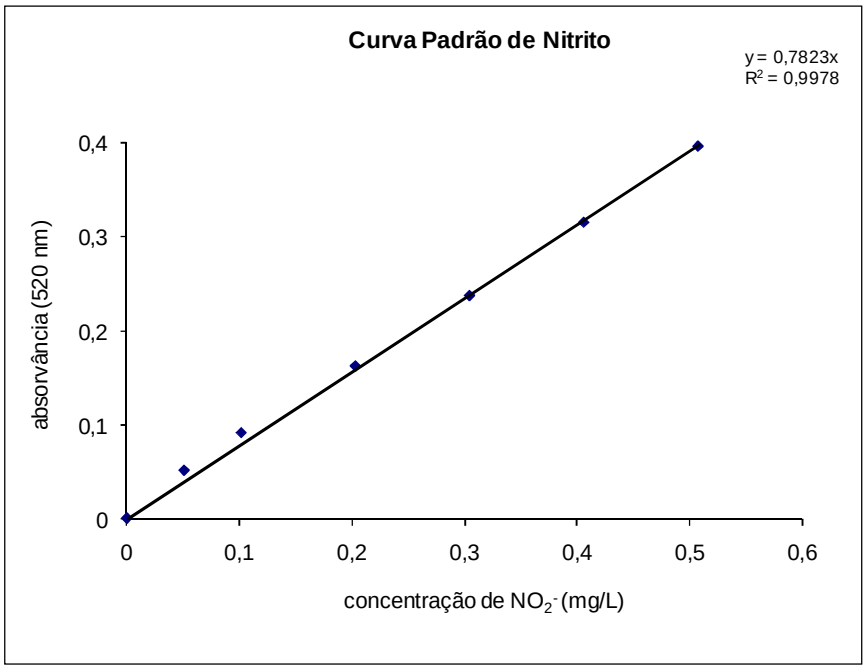
VOORDOUW, G.; NEMATI , M; JENNEMAN, G. E. Use of nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria to reduce souring in oil fields: interactions with SRB and effects on corrosion. In: CORROSION 2002, Denver. **Proceedings**....Houston: NACE International, 2002. paper 02034.

7. ANEXOS

7.1. Curva Padrão Sulfeto



7.2. Curva Padrão de Nitrato



7.3. Curva Padrão de Nitrito