



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Gustavo de Souza Sant'anna

**Monitoramento microbiológico e físico-químico de tanques de
armazenamento de óleo e água**

Rio de Janeiro

2009

Gustavo de Souza Sant'Anna

**Monitoramento microbiológico e físico-químico de tanques de armazenamento
de óleo e água**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa
Dra. Maria Luiza Bragança Tristão

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/ BIBLIOTECA CTC/Q

S232 Sant'Anna, Gustavo de Souza.
Monitoramento microbiológico e físico-químico de tanques
de armazenamento de óleo e água / Gustavo de Souza
Sant'Anna. – 2009.
98 f.

Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa
Orientador: Maria Luiza Bragança Tristão.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio
de Janeiro, Instituto de Química.

1. Tanques de armazenamento – Teses. 2. Bactérias –
Teses. 3. Petróleo – Teses. I. Costa, Antonio Carlos Augusto
da. II. Tristão, Maria Luiza Bragança. III. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU621.642.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese.

Assinatura

Data

Gustavo de Souza Sant'Anna

**Monitoramento microbiológico e físico-químico de tanques de armazenamento
de óleo e água**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 21 de dezembro de 2009

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Dra. Maria Luiza Bragança Tristão (Orientadora)
CENPES / PETROBRAS

Prof. Dr. Aderval Severino Luna
Instituto de Química da UERJ

Dra. Ana Cristina de Melo Ferreira
IRD/CNEN

Prof. Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Escola de Química da UFRJ

Rio de Janeiro
2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Enoch e Marilene, por me ensinarem a sempre agradecer pela vida, sorrir e ser feliz, independente das dificuldades que a vida impõe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por abençoar a mim e meus amigos, e por esta enorme dádiva que é viver.

Aos meus pais pelo seu amor incondicional.

Ao meu orientador Antonio Carlos Augusto da Costa, por sua sincera amizade e por me proporcionar momentos de grande aprendizado a todo instante.

À minha orientadora Maria Luiza Bragança Tristão pela sua competente orientação.

Ao CENPES/PETROBRAS por ceder as amostras para este trabalho.

À Marcia Monteiro M. Gonçalves e Márcia de Viveiros Carreira pelas suas amizades, ensinamentos constantes, risadas, bolos e biscoitos “orelhinha”.

Em especial à minha amiga Paula Moraes Veiga, por toda a sua ajuda e companhia.

Aos amigos Ellen Cristina, Otávio Bernardes, Rodrigo Mascarenhas e Hallan Bruno pelos momentos de descontração.

RESUMO

SANT'ANNA, Gustavo de Souza. *Monitoramento microbiológico e físico-químico de tanques de armazenamento de óleo e água*, 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A injeção da água do mar nos campos marítimos (*offshore*), processo este conhecido como recuperação secundária de petróleo, gera muitos resíduos e efluentes. Dentre estes, pode-se destacar a água produzida, que consiste de água de formação, água naturalmente presente na formação geológica do reservatório de petróleo, e água de injeção, aquela normalmente injetada no reservatório para aumento de produção. Sete tanques de armazenamento de água/óleo de um terminal foram monitorados quanto à presença de micro-organismos e teores de sulfato, sulfeto, pH e condutividade. Particularmente, as bactérias redutoras de sulfato (BRS), que agem às expensas da atividade de outras espécies, reduzindo sulfato à sulfeto, constituindo-se num problema-chave. Os tanques de óleo codificados como Verde, Ciano, Roxo, Cinza, Vermelho, Amarelo e Azul, apresentaram comportamentos distintos quanto aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Após este monitoramento, de acordo com valores referência adotados, e levando-se em conta como principais parâmetros classificatórios concentrações de BRS, bactérias anaeróbias totais e sulfeto, os dois tanques considerados “mais limpos” do monitoramento foram os tanques roxo e ciano. Analogamente, por apresentarem os piores desempenhos frente aos três principais parâmetros, os tanques amarelo e cinza foram considerados os “mais sujos” de todo o monitoramento. Após esta segregação, esses três principais parâmetros, mais a concentração de sulfato, foram inter-relacionados a fim de se corroborar esta classificação. Foi possível observar que o sulfeto instantâneo não foi o parâmetro mais adequado para se avaliar o potencial metabólico de uma amostra. Por este motivo, foram verificados os perfis metabólicos das BRS presentes nas amostras, confirmando a segregação dos tanques, baseada em parâmetros em batelada.

Palavras-chave: Tanques de armazenamento. Corrosão. Bactéria redutora de sulfato. Recuperação secundária de petróleo.

ABSTRACT

Seawater injection for offshore petroleum recovery known as secondary petroleum, produces a high amount of residues and effluents. Among those waste solutions, produced water, consisting of formation water, naturally present during the geological formation of oil, and injection water, normally injected in the reservoir in order to increase oil recovery, deserves special attention. Seven water/oil storage tanks from an oil producing terminal were monitored for the presence of microorganisms, sulfate, sulfide, pH and conductivity. Particularly, sulfate-reducing bacteria (SRB), acting with the help of other microbial species, deserve particular attention, due to its ability to reduce sulfate to sulfide. The storage tanks, coded as Green, Cyano, Purple, Gray, Red, Yellow and Blue, presented distinct behavior in relation to the microbiological and physico-chemical parameters. After the monitoring, according to reference values adopted for each parameter, and considering the main contribution of SRB cells, total anaerobic cells and sulfide, two tanks were considered the cleanest ones (purple and cyano). Analogously, considering the same parameters, the yellow and gray tanks were considered the dirtiest ones. After this initial segregation, those three main parameters and sulfate concentration were inter-related in order to corroborate the obtained classification for the tanks. It was possible to observe that sulfide concentration was not the most suitable parameter to be considered to predict the metabolic potential of a specific water sample. Due to this, the metabolic profiles of the SRB cells present in the samples were quantified, considering four tanks with different bacterial populations. This profile was consistent with the classification, confirming the segregation of the tanks, based on batch parameters.

Keywords: Storage tanks. Corrosion. Sulfate-reducing bacteria. Secondary petroleum recovery.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|--------------------------------------|
| | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 1.1 | Água produzida | 13 |
| 1.2 | Acidificação (souring) biogênica | 15 |
| 1.3 | Corrosão microbiológica | 17 |
| 1.4 | Bactérias facultativas e anaeróbias heterotróficas | 19 |
| 1.4.1 | <u>Primeira etapa: Hidrólise e Fermentação</u> | 20 |
| 1.4.2 | <u>Segunda etapa: Acetogênese e Desidrogenação</u> | 21 |
| 1.4.3 | <u>Terceira etapa: Metanogênese</u> | 23 |
| 1.5 | Bactérias redutoras de sulfato (BRS) | 23 |
| 1.6 | Metabolismo de BRS | 30 |
| 1.7 | Bactérias precipitantes de ferro (BPF) | 32 |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| 2.1 | Quantificação de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT) | 35 |
| 2.2 | Quantificação de bactérias facultativas heterotróficas totais (BFHT) e bactérias precipitantes de ferro (BPF) | 38 |
| 2.3 | Quantificação de sulfeto total na amostra | 39 |
| 2.4 | Avaliação da atividade metabólica ao longo de quinze dias | 41 |
| 2.5 | Quantificação de sulfato total na amostra | 42 |
| 2.6 | Determinação dos valores de condutividade e pH | 43 |
| 2.7 | Meios de cultura | 43 |
| 2.7.1 | <u>Meio Postgate E - modificado</u> | 43 |
| 2.7.2 | <u>Meio Postgate C</u> | Erro! Indicador não definido. |
| 2.7.3 | <u>Meio para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT)</u> | Erro! Indicador não definido. |
| 2.7.4 | <u>Solução de diluição para os meios de cultivo de BRS e BANHT</u> | 46 |
| 2.7.5 | <u>Meio de cultura para bactérias facultativas heterotróficas totais (BFHT)</u> | 47 |
| 2.7.6 | <u>Solução de diluição para o meio de BFHT</u> | 47 |
| 2.7.7 | <u>Meio de cultura para bactérias precipitantes de ferro (BPF)</u> | 48 |
| 2.7.8 | <u>Solução de diluição para o meio de BPF</u> | 48 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 50 |
| 3.1 | Monitoramento da população de bactérias redutoras de sulfato (BRS) | 50 |
| 3.2 | Monitoramento da população de bactérias anaérobias heterotróficas totais (BANHT) | 52 |
| 3.3 | Monitoramento da população de bactérias facultativas heterotróficas totais (BFHT) | 54 |
| 3.4 | Monitoramento da população de bactérias precipitantes de ferro (BPF) | 56 |
| 3.5 | Monitoramento da concentração de sulfeto total | 58 |
| 3.6 | Monitoramento mensal da concentração de sulfato total | 60 |
| 3.7 | Monitoramento mensal dos valores de condutividade e pH | 62 |
| 3.8 | Determinação dos dois melhores e dois piores tanques do terminal | 64 |
| 3.9 | Inter-relação entre os parâmetros monitorados nos tanques classificados | 66 |
| 3.9.1 | <u>Tanque amarelo</u> | 67 |
| 3.9.2 | <u>Tanque cinza</u> | 70 |
| 3.9.3 | <u>Tanque roxo</u> | 72 |
| 3.9.4 | <u>Tanque ciano</u> | 74 |
| 3.10 | Avaliação da atividade metabólica contínua (AMC) de amostras dos tanques classificados | 76 |
| 3.10.1 | <u>AMC para o tanque amarelo</u> | 77 |
| 3.10.2 | <u>AMC para o tanque cinza</u> | 80 |
| 3.10.3 | <u>AMC para o tanque ciano</u> | 83 |
| 3.10.4 | <u>AMC para o tanque roxo</u> | 86 |
| 4 | CONCLUSÕES | 89 |
| | REFERÊNCIAS | 90 |

INTRODUÇÃO

A injeção da água do mar nos campos marítimos (*offshore*), processo este conhecido como recuperação secundária de petróleo, intensificou-se durante os últimos anos por sua capacidade de elevar a eficiência da remoção de óleo de poços que não possuem pressão interna suficiente para tal fim.

Esta técnica de recuperação leva a geração de rejeitos e efluentes, destacando-se a água produzida junto com o petróleo e gás, e que consiste de água de formação, água naturalmente presente na formação geológica do reservatório de petróleo e água de injeção, aquela normalmente injetada no reservatório para aumento de produção (GABARDO, 2007).

No caso da recuperação secundária, fazendo-se uso de água, a sua qualidade e a sua compatibilidade com as características do reservatório são de extrema importância para manter a produtividade dos poços e paradoxalmente auxiliar nos fenômenos de corrosão desencadeado pela presença de micro-organismos (NASCIMENTO, 2006).

Os micro-organismos mais comuns e problemáticos em termos econômicos para a indústria petrolífera são as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (HAMILTON & LEE, 1995). Os principais efeitos atribuídos à presença de BRS nos processos de produção de petróleo são evidenciados, principalmente, pelos problemas ligados à corrosão induzida por micro-organismos (CIM) e a toxicidade do gás sulfídrico gerado pelo seu metabolismo.

A produção intensiva de H₂S em reservatórios (*souring* biogênico) tem sido um dos maiores problemas na indústria de petróleo devido ao aumento do uso de água do mar como meio de recuperação secundária do óleo. Os problemas associados ao aumento da produção de gás sulfídrico incluem o comprometimento dos materiais de equipamentos de produção, transporte e armazenamento, assim como a qualidade do fluido pode ser comprometida levando a gastos elevados para seu tratamento (PENNA *et al.*, 2003).

O gás sulfídrico é extremamente tóxico e a intoxicação por esta substância acarreta efeitos prejudiciais à saúde humana, porém, isto depende da concentração do gás no ambiente, da duração e da frequência de exposição e a suscetibilidade

individual. O limite de tolerância de exposição ao H₂S é de 8 mg/L para uma jornada de 8 horas diárias, conforme NR-15 da Portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho.

É difícil estimar os custos da corrosão microbiológica, mas Videla (2003) apresenta uma estimativa britânica do final da década de 70 revelando que o custo aproximado seria em torno de 20% do total da corrosão em geral, o que significa aproximadamente 60 bilhões de dólares por ano, ou 0,84% do PIB britânico. As origens destes gastos são muito diversas, mas podem estar relacionadas a paradas nas instalações para substituição das estruturas corroídas, limpeza, manutenção e substituição de elementos filtrantes e de medição, remoção de depósitos biológicos em sistemas de armazenamento, tubulações, etc.

A decomposição microbiana de petróleo e dos seus derivados apresenta considerável importância econômica e ambiental. Por ser o petróleo uma fonte rica em matéria orgânica, e composta de hidrocarbonetos que podem ser degradados por uma variedade de micro-organismos, não é de surpreender que, ao entrar em contato com o ar e a umidade, o petróleo sofra intenso ataque microbiano. Em determinadas circunstâncias, tais como em tanques de armazenamento em massa, o crescimento microbiano é indesejável (MADIGAN *et al.*, 2004).

Em um terminal de tanques de armazenamento de água/óleo, esta carga proveniente de processos de extração de petróleo é tratada como um rejeito (água produzida) e que possui um ambiente propício à proliferação de micro-organismos, em especial BRS. Estocar este tipo de material para o seu posterior descarte é uma operação que merece atenção. Como no interior destes tanques há uma intensa geração de H₂S, devido às condições “*in situ*”, suas estruturas podem ser comprometidas por um ataque ácido deste gás.

Portanto, num eventual rodízio de funcionamento, visando uma parada de um determinado tanque de estocagem para a sua limpeza e tratamento, é economicamente e logisticamente mais interessante que o tanque retirado de funcionamento seja o mais comprometido.

Uma ferramenta interessante para que se otimize esta operação é o monitoramento dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos que sustentam o consórcio microbiano formado no interior do conteúdo armazenado no tanque e que propicia as BRS gerarem H₂S através do seu metabolismo.

Dessa forma, este trabalho se propõe a trazer subsídios para otimizar a seleção dos tanques de armazenamento de água/óleo que devem sofrer uma

parada no seu funcionamento, procurando, sempre que possível, classificá-los quanto ao estado atual de contaminação microbiana e níveis de sulfeto e sulfato.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi monitorar ao longo de um ano amostras de sete tanques de armazenamento de água/óleo quanto aos seus parâmetros microbiológicos: bactérias redutoras de sulfato, bactérias heterotróficas facultativas e anaeróbias e bactérias precipitantes de ferro. Monitorar também estas amostras com relação aos seus parâmetros físico-químicos: teor de sulfato e sulfeto, pH e condutividade. Após o monitoramento, utilizar os resultados com ocorrência acima de limites pré-estabelecidos para determinados parâmetros a fim de segregar os dois melhores e dois piores tanques do terminal com relação aos parâmetros monitorados. Por fim, verificar se para estes quatro tanques previamente classificados existiria uma correlação entre as concentrações de bactérias redutoras de sulfato, bactérias anaeróbias heterotróficas totais, sulfato e sulfeto que corroborassem esta classificação.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Água produzida

A extração do petróleo dos reservatórios nas plataformas em campos marítimos é realizada pelos processos de recuperação primária e recuperação secundária (ALMEIDA, 2007). Quando a pressão inicial do reservatório é suficiente, o óleo e o gás fluem normalmente pela coluna de extração, processo esse conhecido como recuperação primária. Quando a pressão do reservatório não é mais suficiente para a prospecção espontânea do óleo, então é introduzida água do mar para que se mantenha a pressão do reservatório, aumentando a recuperação de petróleo e gás (AGRAWAL *et al.*, 2009; NASCIMENTO, 2006). A técnica da recuperação secundária propicia a recuperação de mais de 15% das reservas de petróleo, se for comparada a recuperação primária. Por este motivo, seu uso tem se intensificado nos últimos anos. Controlar os parâmetros ligados à qualidade da água a ser injetada no reservatório está relacionado à eficiência da recuperação secundária, pois fatores como a presença de bactérias de diferentes grupos fisiológicos, o teor de oxigênio dissolvido e a presença de partículas em suspensão são associados a fenômenos corrosivos, os quais implicam em sérios problemas para a indústria petrolífera (PENNA, 2004).

Assim como na maioria dos processos de produção, os processos de produção de gás e óleo geram grandes volumes de efluentes líquidos. Quando a opção então é a injeção de água para recuperação do óleo, a água do mar é a opção mais comum, particularmente em operações *offshore*. Esta preferência está atribuída a sua abundância e compatibilidade aceitável com a maioria das águas que formam reservatórios (BADER, 2007a). De acordo com dados da Associação Internacional de Produtores de Óleo & Gás (OGP), para cada tonelada de hidrocarboneto (óleo e gás) produzida em 2008, 0,6 toneladas de água produzida foram descarregadas e 0,9 toneladas de água produzida foram re-injetadas em reservatórios. O Brasil possui a maior área sedimentar da América do Sul, cerca de

6.430.000 km² de bacias sedimentares, das quais 4.880.000 km² são em terra (*onshore*) e 1.550.000 km² em plataforma continental (*offshore*) (PARENTE *et al.*, 2005). Segundo dados do Anuário Estatístico 2008 da Agência Nacional do Petróleo (ANP), neste ano o Brasil produziu 568.398.000 barris de petróleo provenientes de campos *offshore*. Ainda, de acordo com estes dados, as refinarias processaram 12.418.395 barris de outras cargas que incluem resíduos de petróleo, de terminais e de derivados que são reprocessados em unidades de destilação atmosférica juntamente com as cargas de petróleo e condensados. Dentro desta classe de resíduos estão grandes volumes de água produzida. A resolução CONAMA nº 393 de 2007 define a água normalmente produzida com o petróleo como “água de processo”, “água de produção” ou “água produzida”.

Os dois principais fatores que determinam as propriedades físicas, químicas e biológicas da água produzida em campos de petróleo são: a formação geológica e a localização geográfica do reservatório. Estes dois fatores ditam o tipo e a concentração de espécies inorgânicas na água de formação (sedimentos, sais, materiais radioativos de ocorrência natural e metais) e também o tipo e especificação de hidrocarbonetos coexistentes (óleo cru leve ou pesado e gases ácidos). Assim, água produzida de campos de petróleo são misturas muito complexas com significantes variações em seus volumes e concentrações de espécies inorgânicas, orgânicas (incluindo hidrocarbonetos) e espécies biológicas ao longo do tempo em que se produziu a água. Podem ter características muito variáveis de poço para poço e também variações dependendo do campo de produção de óleo e gás (BADER, 2007b; ÇAKMAKCE *et al.*, 2008).

As companhias de produção de petróleo inevitavelmente geram grandes quantidades de água produzida, especialmente no caso de poços mais maduros onde a produção de água corresponde a 95% do total da mistura água/óleo produzida. Descartar esta água produzida pode poluir a superfície e as camadas mais profundas do solo e do mar. Por outro lado, há uma dificuldade em estocar esta enorme quantidade de água produzida (BADER, 2007a). Esta água é então estocada em grandes tanques de armazenamento, e as bactérias redutoras de sulfato (devido à existência de sulfato na água de formação ou devido à introdução de sulfato através da injeção de água do mar) e/ou bactérias anaeróbias em geral podem estar presentes, e suas populações podem aumentar com o tempo de estocagem. O H₂S produzido pelas BRS reage com o ferro quando ele está disposto

nas paredes do tanque, gerando um precipitado que causa deterioração desta estrutura. A eliminação de grandes volumes de água produzida no oceano tem sido condenada por agências governamentais e organizações não-governamentais (AHMADUN *et al.*, 2009; BADER, 2007b; KAUR *et al.*, 2009).

Os tanques de resíduos armazenam produtos fora de especificação ou provenientes de operações indevidas que necessitam de reprocessamento. O material mais empregado na fabricação de tanques de armazenamento é o aço-carbono. O emprego de outros materiais é raro, contudo encontram-se tanques de pequeno porte de alumínio e aço inoxidável, e de polímeros especiais para produtos químicos diversos. Tendo em vista a corrosão atmosférica do aço em ambiente industrial, a corrosão em contato com o fluido armazenado, água acumulada no fundo etc., os tanques são sempre revestidos externa e internamente com pintura ou películas protetoras adequadas.

1.2. Acidificação (**SOURING**) biogênica

Segundo Farquhar (1997), o *souring* biogênico é definido como sendo um processo no qual alguns reservatórios apresentam um aumento na produção de gás sulfídrico (H₂S) durante o período de produção em campo.

Diversos micro-organismos como bactérias redutoras de sulfato, bactérias fermentativas, oxidantes/redutoras de metais e metanogênicas são frequentemente encontradas em campos de petróleo, ambientes geológicos profundos que possuem condições físico-químicas *in situ* que permitem a coexistências desses micro-organismos. Não está bem elucidado se estas bactérias são indígenas ao reservatório ou se foram antropologicamente introduzidas (VOORDOUW *et al.*, 1996).

Perfurando e também utilizando água para pressurizar reservatórios e aumentar a recuperação do óleo, introduz-se micro-organismos e compostos químicos (nutrientes e aceptores de elétrons) que estimulam o crescimento das bactérias já presentes no reservatório. Além disso, a emulsão água/óleo formada possui condições favoráveis ao crescimento de bactérias degradadoras de

hidrocarbonetos, que de maneira geral fornecerão substratos para outras bactérias incluindo as redutoras de sulfato (RÖLING *et al.*, 2003). Segundo Odom (1993), quando a água do mar é injetada, aproximadamente 2700 mg/L de sulfato tornam-se disponíveis para redução através do metabolismo de BRS, que certamente estão ou estarão presentes como inóculo nessa emulsão. Acredita-se que as BRS são as maiores causadoras dos casos de *souring* em reservatórios de óleo (Tang *et al.*, 2009).

Como foi reportado por Nascimento (2006) existem ainda mais quatro tipos de processos associados à geração de H₂S:

- Craqueamento térmico;
- Dissolução de metal pirítico;
- Reações de oxi-redução de produtos sequestrantes de oxigênio;
- Redução dos íons sulfato por ação termoquímica.

Dentre os problemas que a indústria do petróleo enfrenta com o *souring*, pode-se citar a toxicidade do H₂S, aceleração da corrosão de dutos de transporte de carga, equipamentos de produção e processamento, decrescendo também a eficiência da recuperação do óleo por causa da obstrução dos equipamentos utilizados na extração pelo acúmulo de biomassa e também pela precipitação de sulfetos metálicos (TANG *et al.*, 2009).

Elevadas concentrações de H₂S nos fluidos gerados (água produzida, óleo e gás) geram graves problemas relacionados à saúde humana e ao meio ambiente. De acordo com Almeida (2007), sua ação tóxica pode levar um indivíduo à morte por paralisia das vias respiratórias quando o mesmo está exposto a quantidades acima do limite tolerável. De acordo com a NR-15 da Portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho, o limite de tolerância de exposição ao H₂S é de 8 mg/L para uma jornada de 8 horas/dia.

1.3. Corrosão microbiológica

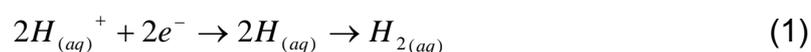
Num aspecto muito difundido e aceito universalmente, pode-se definir a corrosão como a deterioração de um material, geralmente metálico, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente aliado ou não a esforços mecânicos (GENTIL, 2003). Nos países industrializados, a corrosão chega a custar 4% do produto interno bruto, e deste percentual, 10% são devidos a biocorrosão. (DUPONT-MORRAL, 2004 *apud* MEHANNA *et al.*, 2008). Estes números mostram que a corrosão microbiológica não é menos importante no cenário mundial que a corrosão química (SANT'ANNA, 2007). Muitos termos são utilizados para se referir à corrosão influenciada por micro-organismos. São eles: corrosão biológica, corrosão induzida microbiologicamente, corrosão assistida microbiologicamente e biocorrosão, entre outros (PENNA, 2004). Todos eles se referem a um conceito básico: a participação de micro-organismos. Segundo Videla (2003), a atuação dos micro-organismos se dá pela modificação da interface metal/solução induzindo, acelerando e/ou inibindo o processo anódico ou catódico que controla a reação de corrosão. A biocorrosão pode ser então definida como o resultado de interações frequentemente sinérgicas, entre a superfície do metal, produtos de corrosão abiótica, células bacterianas e seus metabólitos (BEECH & SUNNER, 2004). A biocorrosão é responsável pela maioria dos casos de corrosão interna em dutos de transporte de óleo e tanques de armazenamento (MARUTHAMUTHU *et al.*, 2003).

Uma grande quantidade de organismos e mecanismos podem estar envolvidos na corrosão microbiológica; e os seus efeitos podem ser específicos, como a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} por *Gallionella* ou a produção de ácidos orgânicos por *Cladosporium*, ou, de maneira mais geral, a aparição de células de aeração diferencial pela formação de colônias ou irregularidades no biofilme (HAMILTON & LEE, 1995).

A biocorrosão do aço-carbono em ambientes anaeróbios envolvendo a presença de bactérias redutoras de sulfato tem sido o foco da maioria das pesquisas em biocorrosão (VIDELA & HERRERA, 2004). É bastante documentado que os piores casos de corrosão envolvendo as BRS são normalmente associados com o ingresso do oxigênio. Essas características derivam da ocorrência comum de BRS

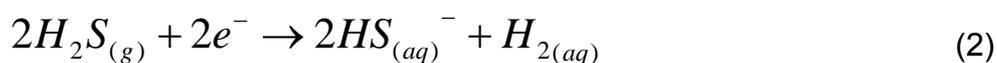
em ambientes naturais como componentes de consórcios microbianos mistos, onde convivem sinergicamente com bactérias aeróbias e facultativas, visto suprir nutrientes para as BRS com os produtos de seus metabolismos parciais dos nutrientes primários, e também geram condição de anaerobiose necessária para o crescimento de BRS no consórcio (HAMILTON & LEE, 1995).

Provavelmente a teoria mais aceita para o mecanismo da biocorrosão induzida por BRS é a clássica Teoria da Despolarização Catódica (VON WOLZOGEN KUHR & VAN DER VLUGHT, 1934). Nesta teoria, que foi formulada para ambientes ácidos e anóxicos, o H^+ proveniente da dissociação da água atua como acceptor catódico de elétrons, primeiro com a formação de hidrogênio atômico e subsequentemente há a formação de hidrogênio molecular (reação 1):

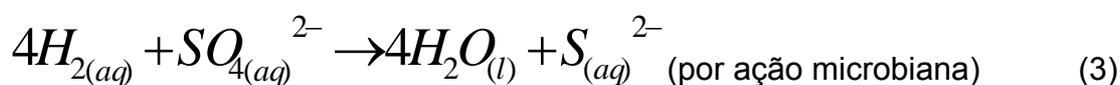


As reações que se seguem, e por consequência todo o processo global de corrosão, sofre inibição pelo efeito polarizante da acumulação de um filme de hidrogênio molecular na superfície do metal. Quando o hidrogênio molecular é oxidado por BRS que possuem a enzima hidrogenase, o resultado é a despolarização catódica com a consequente estimulação da dissolução do metal no anodo.

Alternativamente, Costello (1974) *apud* Odom (1983) propôs que em valores de pH próximos da neutralidade o H_2S é o acceptor de elétrons, novamente com hidrogênio como produto catódico chave (reação 2).



Existem dois pontos em comum entre estes dois propósitos: a estimulação catódica e a produção do sulfeto metálico como produto da corrosão (reações 3 e 4):





A reação 4 possui a estequiometria influenciada pela quantidade de sulfeto produzido, devido à redução de sulfato ocorrida no crescimento das BRS utilizando vários substratos orgânicos e independente da despolarização catódica (HAMILTON & LEE, 1995).

1.4. Bactérias heterotróficas facultativas e anaeróbias

Em vez de competir diretamente pelos mesmos recursos, alguns micro-organismos trabalham em conjunto para realizar uma transformação específica, a qual nenhum dos organismos seria capaz de realizar individualmente. Esses tipos de interações microbianas, denominadas **sintrofia**, são cruciais ao sucesso competitivo de determinadas bactérias anaeróbias (MADIGAN *et al.*, 2004).

Segundo Smith (1993), os ambientes anaeróbios geralmente possuem uma variada mistura de substâncias orgânicas e mineralizar completamente este material inicial requer que diversos tipos diferentes de metabolismo microbiano ocorra de forma associada. Em uma cadeia alimentar microbiológica, a função de cada grupo microbiano é produzir seu metabólito, que servirá de substrato para outro até que ocorra a oxidação completa da matéria orgânica (FAUQUE, 1995). Micro-organismos fermentativos são capazes de utilizar substâncias orgânicas como carboidratos e peptídeos para o seu crescimento produzindo ácidos orgânicos, amônia e hidrogênio como produtos da fermentação (BIRKELAND, 2004).

Birkeland (2004) relatou que seis novas espécies pertencentes ao gênero *Thermotoga*, *Petrotoga* e *Thermosipho*, todas pertencentes à ordem Thermotogales, foram isoladas de reservatórios de óleo e descritas nos últimos nove anos.

Com relação à sua nutrição, os organismos heterotróficos são muito versáteis, fermentando uma grande variedade de substratos orgânicos, como mono, di e polissacarídeos e proteínas hidrolisáveis (BIRKELAND, 2004).

Parte desta população é composta por bactérias anaeróbias facultativas, que possuem como função secundária auxiliar na manutenção dos baixos teores de

oxigênio dentro do sistema metanogênico, uma vez que a maioria da população consiste de bactérias anaeróbias estritas. Assim, necessita-se de baixos potenciais de oxi-redução, da ordem de - 300mV, o que auxilia no crescimento dos micro-organismos que são mais exigentes quanto a ausência de oxigênio (VAZOLLER, 1993).

Os micro-organismos convertem substâncias orgânicas por processos fermentativos, apresentando uma relação de interdependência, simbiose, de forma que um grupo produz o substrato e as condições de microclima necessárias ao crescimento do outro até a completa oxidação da matéria orgânica. Assim, o processo biológico anaeróbio representa um sistema ecológico delicadamente balanceado, onde cada micro-organismo possui uma função especial (ALMEIDA, 2007).

O processo anaeróbio é dividido em três etapas:

- Primeira etapa: Hidrólise e Fermentação
- Segunda etapa: Acetogênese e Desidrogenação
- Terceira etapa: Metanogênese

Na Figura 1 está representado o esquema do processo de degradação anaeróbia, apresentando os três principais estágios envolvidos no processo, bem como as diferentes classes de micro-organismos responsáveis por cada um deles.

1.4.1. Primeira etapa: hidrólise e fermentação

A primeira etapa da degradação anaeróbia corresponde à hidrólise e fermentação das substâncias orgânicas de cadeia longa. Nesta etapa, atuam as bactérias fermentativas e hidrolíticas, responsáveis pela quebra das cadeias de polímeros (proteínas, polissacarídeos, lipídeos, ácidos nucleicos) e consequente fermentação dos respectivos monômeros (aminoácidos, açúcares, ácidos graxos, nucleotídeos). Para processar estas conversões, estas bactérias fazem uso de

exoenzimas (lipases, proteases, celulasas e amilases) (ALMEIDA, 2007; FAUQUE, 1995).

As células assimilam os monômeros produzidos, metabolizando-os por rotas fermentativas dando origem a outras substâncias, como ácidos orgânicos voláteis (principalmente ácido acético), hidrogênio e dióxido de carbono.

As bactérias hidrolíticas fermentativas compreendem uma grande variedade de espécies, muitas são anaeróbias estritas, como as do gênero *Clostridium*, e algumas são facultativas, como as do gênero *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Escherichia* (ALMEIDA, 2007).

1.4.2. Segunda etapa: acetogênese e desidrogenação

Nesta segunda etapa, as bactérias denominadas acetogênicas degradam ácidos orgânicos voláteis, como o propiônico e o butírico, e/ou os ácidos com cadeia maior cujo produto final é o ácido acético, produzindo hidrogênio como produto final (VAZOLLER, 1993). Este hidrogênio produzido é consumido por dois grupos de bactérias denominados metanogênicas e hidrogenotróficas e convertido em metano, por bactérias redutoras de sulfato (BRS), e ainda pelas bactérias homoacetogênicas (PATIDAR & TARE, 2005; ALMEIDA, 2007).

Normalmente, as BRS são encontradas em associação com as metanogênicas. A redução do íon sulfato a sulfeto é energeticamente favorecida em relação à produção de metano. Em sistemas anaeróbios com concentrações baixas de íons sulfato elas exercem o papel de formadoras de substratos metanogênicos, principalmente acetato e hidrogênio a partir de outros substratos orgânicos solúveis (VAZOLLER, 1993). No entanto, em presença de elevadas concentrações de íons sulfato, as BRS passam a competir com as metanogênicas pelo mesmo substrato, isto é, acetato e H₂ (LIMA, 1996).

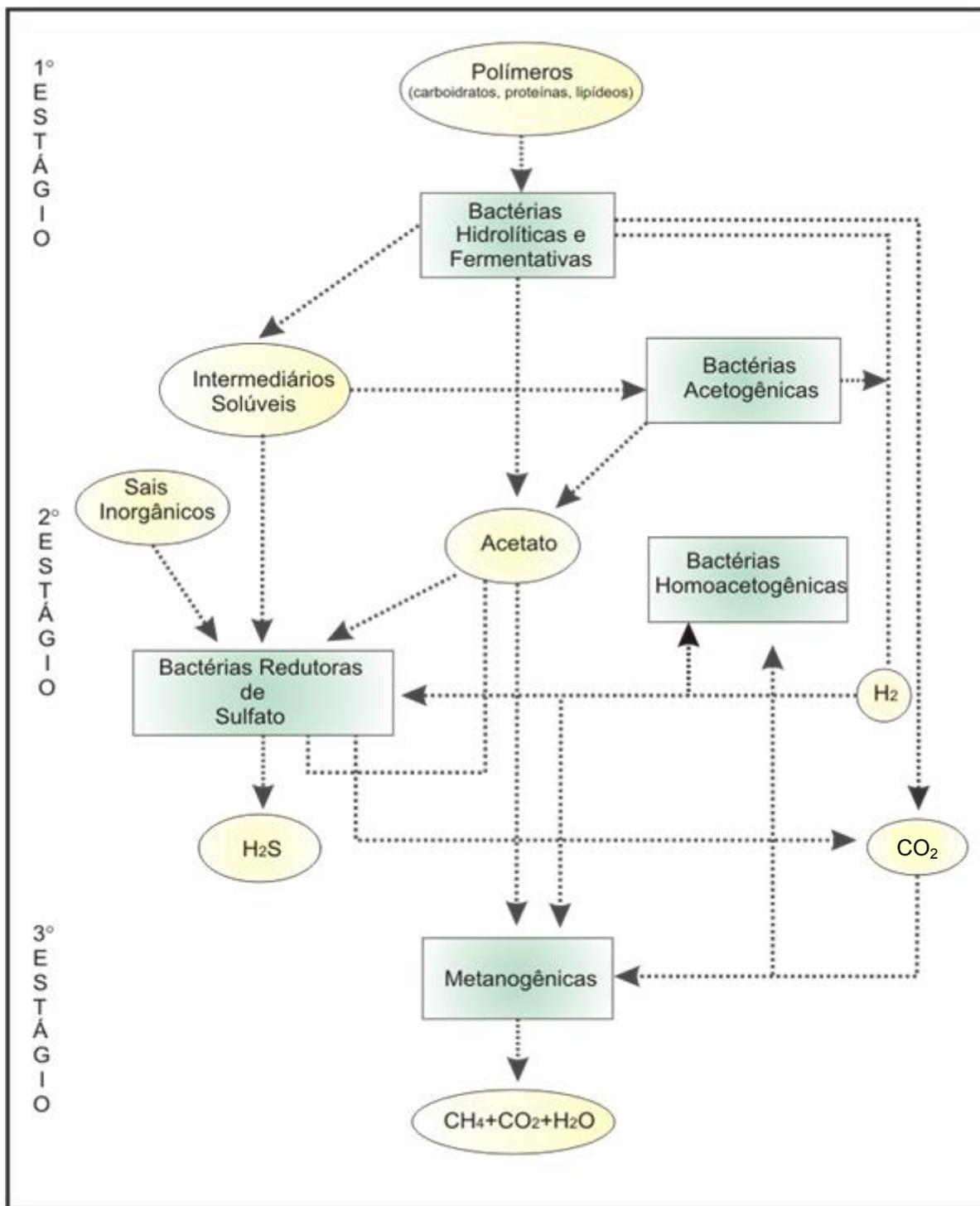


Figura 1 - Representação dos estágios da fermentação anaeróbica (Adaptado de GONÇALVES, 2001).

1.4.3. Terceira etapa: metanogênese

A terceira etapa do processo de degradação anaeróbia tem como principal atuação as *Archae* metanogênicas que produzem o metano através da conversão do hidrogênio (homohidrogenotróficas) e através do acetato (acetotróficas). As espécies mais comuns são de metanogênicas homohidrogenotróficas representadas pelas espécies *Methanobacterium bryantii*, *Methanospirillum hungatei* e *Methanosarcina barkeri* e o principal gênero que compreende as acetotróficas as *Methanosarcinas* sp. e *Methanothrix* sp. (VAZZOLER, 1993).

A metanogênese e a redução desassimilatória de sulfato são os dois processos que encerram a mineralização anaeróbia, e a predominância de um processo em detrimento do outro depende principalmente da disponibilidade de sulfato (FAUQUE, 1995).

1.5. **Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)**

As bactérias redutoras de sulfato constituem um diverso grupo de procariotos que contribuem para uma variedade de funções essenciais em ambientes anaeróbios. São um grupo de micro-organismos metabolicamente versátil, pertencendo a diferentes famílias e gêneros.

As BRS fazem parte de três grandes ramificações:

- As δ -subclasses de proteobactérias (mais de 25 gêneros);
- As bactérias Gram-positivas (*Desulfotomaculum* e *Desulfosporosinus*);
- E a ramificação formada pelas *Thermodesulfobacterium* e *Thermodesulfovibrio*, com estas famílias sendo termofílicas, enquanto que os dois primeiros englobam espécies psicrófilicas, mesofílicas e termofílicas (TANG *et al.*, 2009).

São micro-organismos anaeróbios, que possuem como principal característica a capacidade de utilizar sulfato ou outras substâncias oxidadas de enxofre como acceptor final de elétrons, processo esse conhecido como redução desassimilatória de sulfato (LENS *et al.*, 2001).

Assim como age o oxigênio na respiração convencional, na redução desassimilatória de sulfato esse íon atua como agente oxidante para a metabolização da matéria orgânica. De todo o sulfato reduzido, uma pequena quantidade de enxofre é assimilada pelo micro-organismo, e virtualmente todo ele é lançado ao meio externo sob a forma de sulfeto, normalmente hidrolisado como H₂S livre. Analogamente, na rota assimilatória, os micro-organismos assimilam as substâncias de enxofre reduzidas e os utilizam na biossíntese de aminoácidos e proteínas que contêm em sua estrutura este elemento, não levando então à excreção direta de sulfeto (POSTGATE, 1984). Além de utilizar sulfato como acceptor de elétrons, muitas BRS podem crescer utilizando nitrato (NO₃⁻) como acceptor de elétrons, reduzindo NO₃⁻ a NH₃, ou ainda sulfonatos, tais como isetionato ($HO - CH_2 - CH_2 - SO_3^-$) ou enxofre elementar (S^0), ambos reduzidos a H₂S. Esses organismos também são capazes de utilizar certas substâncias orgânicas para a geração de energia, por vias fermentativas, na total ausência de aceptores de elétrons terminais (MADIGAN *et al.*, 2004).

Segundo Tang *et al.* (2009), as BRS podem utilizar uma ampla variedade de substâncias como doadores de elétrons, e se for necessário, também como fonte de carbono. Mas em sua grande maioria, as BRS utilizam como fonte de carbono substâncias de baixa massa molecular (ANNACHHATRE *et al.*, 2007). Estes incluem, mas não estão limitados somente, as seguintes classes de compostos: hidrogênio, ácidos mono e dicarboxílicos, alcoóis e acetaldeídos. Aminoácidos, compostos de enxofre, hidrocarbonetos saturados e aromáticos também são fontes conhecidas de energia para o metabolismo de BRS. Na

Tabela 1 estão listados os substratos energéticos para as BRS, agrupados por classe conforme Almeida (2007).

Apesar de serem consideradas anaeróbias obrigatórias, as BRS têm sido isoladas também de ambientes aeróbicos (HAMILTON & LEE, 1995). Diversas estratégias de defesa foram desenvolvidas por estas bactérias para sobreviver à exposição ao oxigênio. Essas estratégias incluem comportamentos peculiares na presença de oxigênio, como agregação e sistemas enzimáticos dedicados a redução e eliminação do oxigênio e suas espécies reativas (DOLLA *et al.*, 2006). Marschall *et al.* (1993) *apud* Dolla *et al.* (2006) mostraram que em culturas homogeneamente aeradas de diversas BRS, a taxa de formação de sulfeto derivado da redução de sulfato decresce com o aumento da concentração de oxigênio, e é abolida acima de uma concentração 15 μ M de oxigênio. A viabilidade e a disponibilidade da célula decrescem com o tempo quando as células são expostas ao oxigênio. Krekeler *et al.* (1997) *apud* Dolla *et al.* (2006) observaram que em culturas contínuas de *Desulfovibrio oxyclinae*, a redução de sulfato foi inibida pela presença de 1% de oxigênio em fase gasosa. Além do mais, a presença de oxigênio induz mudanças morfológicas, como foi observado por Sass *et al.* (1998) *apud* Dolla *et al.* (2006) em linhagens de *Desulfovibrio* que desenvolveram células atipicamente alongadas quando crescidas em presença de oxigênio.

Tabela 1 - Possíveis substratos energéticos para as BRS (Almeida, 2007).

| Classe das substâncias | Nome das substâncias |
|---|--|
| Sais dos ácidos carboxílicos alifáticos | Formato, acetato, propionato, butirato, isobutirato, 2 metil butirato, 3 metil butirato, piruvato e lactato |
| Sais dos ácidos dicarboxílicos | Succinato, fumarato, malato, oxalato, maleinato, glutarato, pimelato |
| Álcoois | Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, etilenoglicol, 1,2-propanodiol, glicerol |
| Aminoácidos | Glicina, serina, alanina, cisteína, cistina, treonina, valina, leucina, isoleucina, aspartato, glutamato, fenilalanina |
| Açúcares | Frutose, glicose, manose, xilose, raminose |
| Substâncias aromáticas | Acima de 35 compostos aromáticos, incluindo benzoato, fenol, indol, resorcinol, catecol, p-cresol, quinolina, fenilactato, vanilina, etc |
| Substâncias inorgânicas | H ₂ |
| Diversos | Betaína, colina, furfural, acetona, cicloexanona |

Quanto à sua morfologia, as BRS se apresentam como bacilos curvos (em forma de vírgula), às vezes espiralados, tendo de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro e 3,0 a 5,0 μm de comprimento (VIDELA, 2003).

De acordo com as considerações de Fauque (1995), em ambientes naturais, pode ser decisivo no crescimento e atividade dos micro-organismos a sua capacidade de se adaptar às variações dos fatores físico-químicos e biológicos.

Os valores de pH ideais para o crescimento de BRS varia na faixa entre 5,0 e 9,0 (WILLOW *et al.*, 2003). Valores de pH fora desta faixa usualmente resultam em atividades reduzidas (Neculita *et al.*, 2007).

No que diz respeito à temperatura, as BRS englobam linhagens tanto mesofílicas como termofílicas, sendo que a temperatura pode afetar significativamente o crescimento e a cinética de redução do sulfato (WEIJMA *et al.*, 2000). No caso do gênero *Dessulfotomaculum*, existem espécies termófilas que crescem em temperaturas superiores a 55°C, e frequentemente são encontradas em águas de injeção na indústria do petróleo (VIDELA, 2003). As BRS obrigatoriamente psicrófilas não são isoladas com facilidade, mas segundo Madigan *et al.* (2004), já foi identificado no gênero *Desulfohopalus* uma espécie psicrófila adaptada a crescer em temperaturas entre 0 e 24°C. É interessante frisar que a adaptação das BRS a baixas temperaturas necessita de um extenso período de tempo, mas uma vez que estas bactérias estejam adaptadas, os efeitos da temperatura tornam-se insignificantes (Tsukamoto *et al.*, 2004).

| <i>Gênero</i> | <i>Morfologia</i> | <i>Célula Parede/membrana</i> | <i>Formação de esporos</i> | <i>Temperatura crescimento</i> | <i>Nº de espécies</i> |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>Desulfovibrio</i> | Vibrios ou bacilos | Gram (+) | Não | Mesofílica | 11 |
| <i>Desulfotomaculum</i> ^(a) | Bacilos curvos | Gram (+) | endosporos | Termofílica | 1 |
| <i>Desulfomicrobium</i> | Bacilos | Gram (-) | Não | Mesofílica | 6 |
| <i>Desulfobulbus</i> | Células ovais ou em forma de limão | Gram (-) | Não | Termofílica | 4 |
| <i>Desulfobotulus</i> | Víbrio | Gram (-) | Não | Mesofílica | 3 |
| <i>Desulfohalobium</i> | Bacilos curvos | Gram (-) | Não | Mesofílica | 1 |
| <i>Desulfofustis</i> | Bacilos | - | - | - | - |
| <i>Desulfobacula</i> | Células ovais ou esféricas | - | - | - | 1 |
| <i>Desulforhpalatus</i> | Bacilos curvos | Gram (-) | - | Mesofílica | 1 |
| | | | | Psicrófila | 1 |
| <i>Thermodesulfobacterium</i> | Bacilos pequenos | Gram (-) | - | Termofílica | 2 |

Tabela 2- Principais características dos gêneros de BRS que realizam oxidação incompleta de compostos orgânicos até acetato

Tabela 3- Principais características dos gêneros de BRS que realizam oxidação completa de compostos orgânicos até CO₂.

| <i>Gênero</i> | <i>Morfologia</i> | <i>Célula</i> <i>Parede/membrana</i> | <i>Formação</i> <i>de esporos</i> | <i>Temperatura</i> <i>de crescimento</i> | <i>Nº de</i> <i>espécies</i> |
|-----------------------------|---|---|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>Desulfobacter</i> | Vibrios, bacilos, bacilos ovais | Gram (-) | Não | Mesofílica | 4 |
| <i>Desulfobacterium</i> | Células ovais ou em forma de limão Bacilos curvos ou ovais | Gram (-) | Não | Mesofílica | 7 |
| <i>Desulfococcus</i> | Células esféricas ou em forma de limão | Gram (-) | Não | Mesofílica | 2 |
| <i>Desulfomonile</i> | Bacilos | Gram (-) | Não | Mesofílica | 1 |
| <i>Desulfonema</i> | Células filamentosas | Gram variável | Não | Mesofílica | 2 |
| <i>Desulfosarcina</i> | Células agrupadas cúbica | Gram (-) | Não | Mesofílica | 1 |
| <i>Desulfoarculus</i> | Víbios | Gram (-) | Não | Mesofílica | 1 |
| <i>Desulfacinum</i> | Células ovais ou esféricas | Gram (-) | - | Termofílica | 1 |
| <i>Desulforhabdus</i> | Bacilos | Gram (-) | Não | - | - |
| <i>Thermodesulforhabdus</i> | Bacilos | Gram (-) | - | Termofílica | 1 |
| <i>Archaeoglobus</i> * | Células esféricas | - | - | Termofílica | 2 |

* Pertence ao Domínio Archae (Adaptado de ODOM, 1993; FAUQUE, 1995; CASTRO *et al.*, 2000; MADIGAN *et al.*, 2004)

1.6. Metabolismo de BRS

Enzimologicamente, o caminho para redução respiratória de sulfato é distinto do caminho para redução assimilatória de sulfato, que ocorre em outros procariotos, algas e plantas, e eucariotos como fungos e leveduras (PECK, 1993).

A característica peculiar das bactérias redutoras de sulfato desassimilatórias é que elas são únicas por conseguirem utilizar sulfato inorgânico como aceptor final de elétrons. Este processo respiratório, que ocorre em ambientes anaeróbios, é conduzido pelas BRS para gerar substâncias de grande energia para as reações de biossíntese necessárias ao seu crescimento e manutenção (AKAGI, 1997)

A maneira com que as BRS reduzem sulfato é pela oxidação de várias substâncias orgânicas e utilizando os elétrons para a oxidação do sistema de redução do sulfato (AKAGI, 1997). De acordo com Madigan *et al.* (2004), a redução de SO_4^{2-} a H_2S , uma reação de oito elétrons, ocorre por meio de alguns estágios intermediários. O íon sulfato é estável, não podendo ser reduzido antes da sua ativação inicial. A ativação do sulfato ocorre por meio da adenosina trifosfato (ATP). A enzima *ATP sulfurilase* catalisa a ligação de um íon sulfato a um fosfato do ATP, levando a formação de adenosina fosfosulfato (AFS). Na redução desassimilativa, os sulfatos do AFS são diretamente reduzidos a sulfito (SO_3^{2-}), pela enzima *AFS redutase*. Uma vez que o sulfito é formado, a enzima sulfitorredutase catalisa sua conversão a sulfeto.

A partir de uma força próton motiva (estado energizado da membrana), ocorrem as reações de transporte de elétrons que dirigem a síntese de ATP catalisada por uma ATPase (complexo enzimático da membrana). Neste sistema, um citocromo é um dos principais carreadores de elétrons, responsável pelo recebimento dos elétrons de uma enzima hidrogenase e a sua transferência para um complexo protéico associado à membrana, denominado Hcm, que os transporta através da membrana citoplasmática tornando-os disponíveis as enzimas: AFSredutase e sulfitorredutase (enzimas citoplasmáticas).

Na parte externa da membrana citoplasmática, está localizada a enzima hidrogenase, que desempenha um importante papel na conservação de energia durante a redução de sulfato realizada pelas BRS que crescem utilizando H_2 ou

substâncias orgânicas, como lactato e piruvato como doadores de elétrons, como pode ser observado na Figura 2. Como é descrito por Madigan *et al.* (2004), durante a oxidação do lactato a piruvato é observada a formação de H_2 permeável à membrana, difundindo-se através dela. No lado externo da membrana, o H_2 é oxidado a H^+ pelas hidrogenases, permitindo a formação da força próton motiva. Ao passo que os elétrons gerados durante a oxidação são primeiramente transferidos para o citocromo c3 (cyt c3), em seguida, ele os transfere para o complexo de citocromos (Hmc), responsável pelo transporte desses elétrons através da membrana até a flavodoxina e/ou ferredoxina. Essas enzimas irão fornecer os elétrons necessários para a formação do sulfito e para a sua redução até o sulfeto.

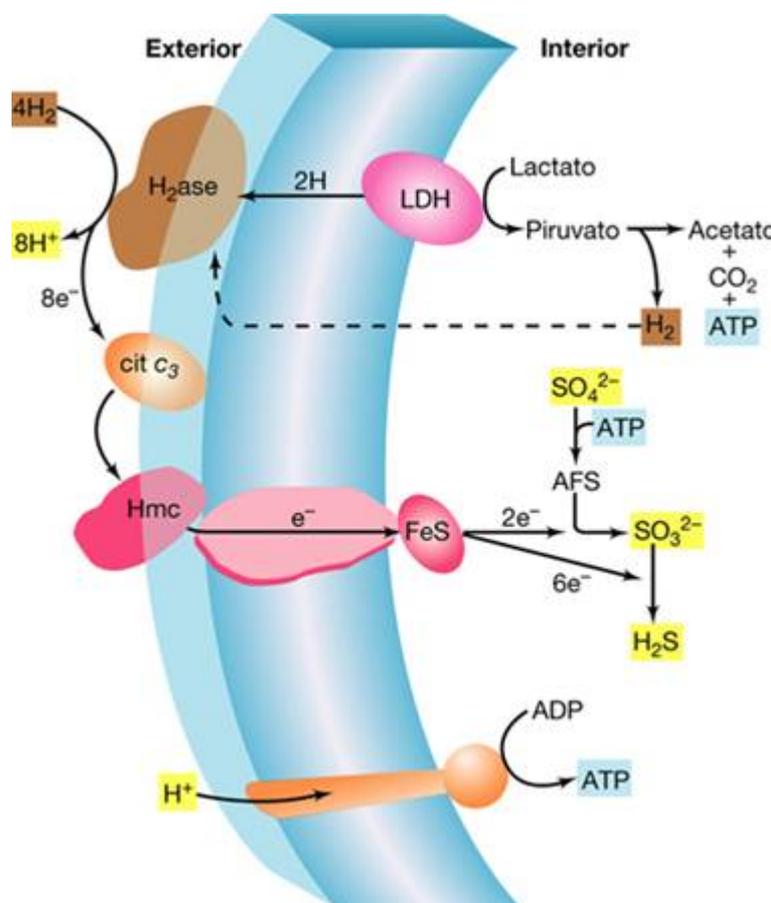


Figura 2 - Transporte de elétrons e conservação de energia nas BRS. (MADIGAN *et al.*, 2004). LDH - desidrogenase; H_2 ase - hidrogenase; cyt c3 - citocromo c3; Hmc - complexo de citocromos; FeS - proteínas de Fe e S (flavodoxina e/ou ferredoxina); APS - adenosina fosfosulfato.

1.7. Bactérias precipitantes de ferro (BPF)

O ciclo global do ferro é dirigido por reações bióticas e abióticas. Na presença de oxigênio e em pH próximo da neutralidade, o íon ferroso é rapidamente oxidado a férrico, precipitando sob a forma de óxidos férricos. Sob as mesmas condições de pH, mas também em pH menores, diversos micro-organismos podem oxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} , para obtenção de energia (BAKER & BANFIELD, 2003).

As bactérias mais comumente observadas em associação com óxidos férricos em ambientes com pH neutro são *Gallionella* sp. e *Leptothrix* sp. (EMERSON & WEISS, 2004 *apud* FORTIN & LANGLEY, 2005; MADIGAN *et al.*, 2004). Estas bactérias são consideradas microaerofílicas, isto é, são bactérias que crescem em baixíssimas concentrações de oxigênio (HALLBERG & FERRIS, 2004 *apud* FORTIN & LANGLEY, 2005).

Trata-se de bactérias aeróbias, quimiorganotróficas, que se caracterizam por apresentar bainhas helicoidais de hidróxido de ferro perpendiculares ao eixo da bactéria, que tem a forma de um grão de café. Ligam-se a materiais particulados, componentes vegetais ou a outros micro-organismos em ambientes aquáticos (VIDELA, 2003).

Os gêneros *Gallionella* e *Siderophacus*, ambos pertencentes à família Caulobacteriaceae, são as bactérias precipitantes de ferro frequentemente vinculadas a processos corrosivos, sendo vinculadas também a produção de flóculos e depósitos de *fouling* (inorgânico e biológico) nos sistemas de águas industriais e entupimentos na indústria de extração do petróleo. Do primeiro grupo, uma espécie importante é a *Gallionella ferrugineae* (VIDELA, 2003). Segundo Subramanian *et al.* (2003), *Gallionella* sp. acelera a corrosão justamente devido à formação do íon férrico (SUBRAMANIAN *et al.*, 2003).

A bactéria quimiolitotrófica *Gallionella ferrugineae* ocorre mais comumente em condições físico-químicas limitadas caracterizadas por um baixo potencial redox (200 a 320 mV), faixas de pH entre 6,0 e 7,6 e temperaturas ideais de crescimento entre 8 e 16°C. Os ambientes típicos de *Gallionella* são ambientes aquáticos anaeróbios contendo íon ferroso que pode entrar em contato com oxigênio. Além de

Fe^{2+} , esses ambientes também contêm compostos reduzidos de enxofre (HALBACH *et al.*, 2001).

Estudos conduzidos por Lütters-Czekalla (1990) mostraram que a *Gallionella ferrugineae* possui a habilidade de utilizar tanto Fe^{2+} como substâncias reduzidas de enxofre, tais como sulfeto e tiosulfato como doadores de elétrons e fonte de energia. *Gallionella ferrugineae* oxida completamente tiosulfato a sulfato em todas as fases de crescimento, e produtos intermediários não são observados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para os procedimentos experimentais foram selecionados sete tanques de um terminal de armazenamento de água/óleo, codificados como tanques Verde, Ciano, Roxo, Cinza, Vermelho, Amarelo e Azul. As amostras para os testes microbiológicos e físico-químicos foram coletadas mensalmente em frascos plásticos descartáveis não-estéreis de 500 mL, completos por inteiro com a amostra, preservados em baixa temperatura, durante o período de um ano através de pontos de coleta (torneiras) situados na parede dos tanques. O ponto de coleta mais baixo foi utilizado preferencialmente para a retirada das amostras o mais próximo possível do fundo dos tanques, a fim de garantir a predominância de água, o que nem sempre era possível em função de elevados teores de óleo. Sempre que isto acontecia, algumas análises ficaram prejudicadas, devido à incapacidade de se determinar alguns resultados com amostras contendo óleo. Isto é observado em alguns gráficos do monitoramento em que há a ausência de resultado. Todas as determinações microbiológicas e físico-químicas foram realizadas num intervalo de tempo, entre a coleta e a determinação, inferior a 48 horas. As amostras foram coletadas em frascos plásticos e preservadas a baixa temperatura até o momento dos testes de quantificação microbiológica ou físico-química. É importante frisar que não se conhecia a origem e nem a composição das amostras, tampouco a dinâmica de transferência de fluido entre os tanques.

2.1 Quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)

As quantificações das populações de bactérias redutoras de sulfato e bactérias anaeróbias heterotróficas totais presentes nas amostras foram realizadas utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP) (SILVA *et al.*, 2001).

O NMP é uma técnica que possibilita estimar a densidade bacteriana de uma amostra através de resultados positivos e negativos em uma série de tubos múltiplos (contendo 9,0 mL do meio de cultura) e diluições sucessivas. Este método assume que as bactérias estão normalmente distribuídas no meio líquido, pressupondo que o número de micro-organismos esperado seja igual em amostras do mesmo tratamento.

Na presente dissertação, as diluições realizadas variaram entre 10^0 e 10^8 para os dois grupos bacterianos citados. Para cada diluição, as inoculações foram realizadas em triplicata e utilizando seringas estéreis (uma para cada diluição). Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e ambiente estéril.

Assim, inicialmente, os três primeiros frascos (diluição 10^0) foram inoculados com 1,0 mL da amostra homogeneizada. Adicionou-se também 1,0 mL da amostra ao frasco correspondente à primeira diluição (10^1). Posteriormente, os próximos frascos contendo meio de cultura e solução diluição (10^2) foram inoculados com 1,0 mL desta primeira diluição e assim sucessivamente, até completar a seqüência da última diluição (10^8). A Figura 3 apresenta o esquema do método NMP adotado.

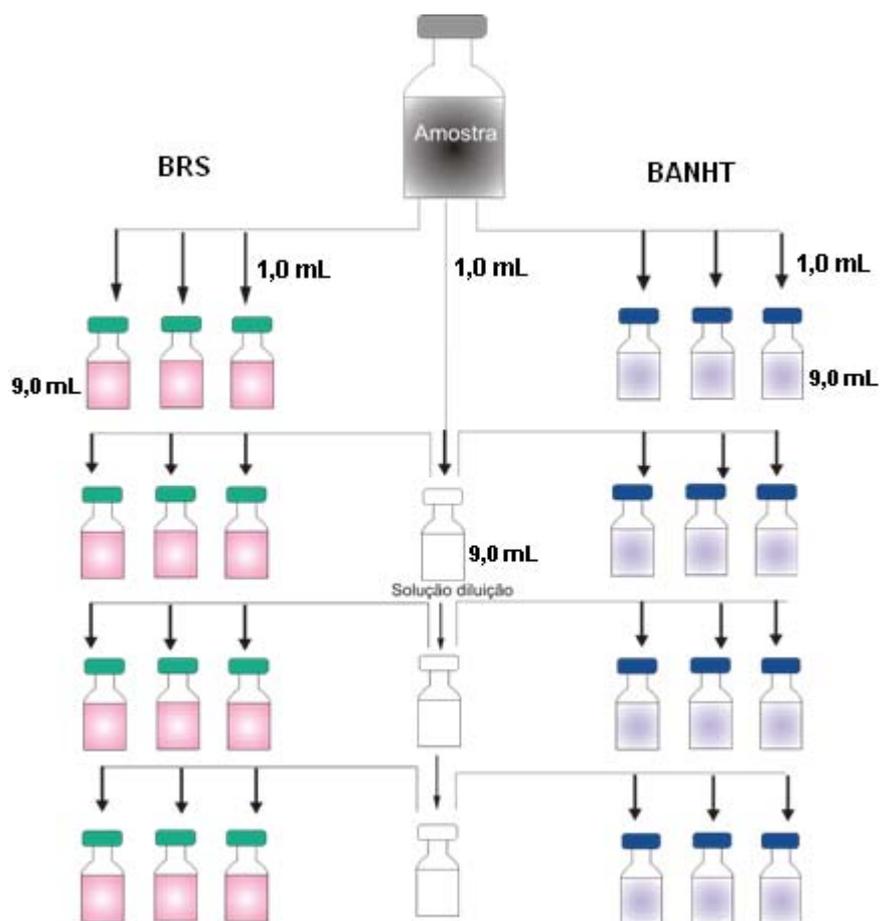


Figura 3 - Representação do Método do NMP em triplicata adotado para a quantificação de BRS e BANHT (Almeida, 2007).

Os frascos inoculados com as amostras foram incubados a 30°C por 28 dias em estufa de incubação e o crescimento bacteriano monitorado a cada sete dias.

No meio para crescimento de BRS a positividade é dada pela presença de um precipitado preto (FeS) decorrente da redução do sulfato a sulfeto. No meio para crescimento de BANHT, a positividade é dada pela mudança de cor e turvação do meio de cultura. A Figura 4 ilustra as mudanças nos dois meios.



Figura 4 - Mudança na cor dos meios de cultura indicando crescimento bacteriano. (a) Meio de cultivo de BRS. (b) Meio de cultivo de BANHT.

Baseados nos valores médios das concentrações de BRS e BANHT foram arbitrados valores de referência a fim de qualificar os tanques, tendo-se adotado:

- 10^3 NMP/mL, concentração aceitável (linha verde);
- 10^4 NMP/mL, concentração de alerta (linha amarela);
- 10^5 NMP/mL, concentração limite para o início de uma ação corretiva (linha vermelha).

2.2 Quantificação de Bactérias Facultativas Heterotróficas Totais (BFHT) e Bactérias Precipitantes de Ferro (BPF)

As quantificações de bactérias facultativas heterotróficas totais e bactérias precipitantes de ferro foram realizadas utilizando a técnica de plaqueamento *pour-plate* (SILVA *et al.*, 2001). As bactérias viáveis podem se desenvolver nas condições estabelecidas (nutrição, temperatura e período de incubação) formando colônias com características macroscópicas diversas e a contagem corresponde à densidade bacteriana no volume inoculado da amostra.

Nesta técnica, 1,0 mL da amostra homogeneizada foi inoculado em duplicata nas placas de Petri estéreis da primeira diluição (10^0) e no frasco contendo 9,0 mL da solução de diluição para a duplicata da diluição seguinte, utilizando seringas estéreis (uma para cada diluição). Após a adição da amostra, um volume aproximado de 20,0 mL de meio foi vertido sobre o mesmo e imediatamente iniciam-se a homogeneização do meio com a amostra através de movimentos rotatórios e as placas foram mantidas em repouso até a solidificação do agar. Todo procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar e em ambiente estéril.

Após a solidificação, as placas foram incubadas em posição invertida (para evitar a condensação da água sobre a superfície do meio) a 30° C por três dias em estufa de incubação. Após este período, selecionam-se as diluições com contagem de colônia entre 30 e 300 colônias. Com o auxílio de um contador de colônias Phoenix (Modelo CP 600), efetuou-se a contagem nas duas placas (duplicatas) selecionadas calculando-se a média obtida.

Baseado nos valores médios das concentrações de BFHT e BPF foram arbitrados valores de referência para qualificação dos tanques, a saber:

- Para BFHT
 - 10^2 UFC/mL, concentração aceitável de BFHT (linha verde),
 - 10^3 UFC/mL, concentração de alerta (linha amarela);
 - 10^4 UFC/mL, concentração limite requerendo ação corretiva (linha vermelha).

➤ Para BPF

- 10^2 UFC/mL, concentração alerta de BPF (linha amarela);
- 10^3 UFC/mL, concentração limite requerendo ação corretiva (linha vermelha). Não foi arbitrada uma concentração aceitável para este grupo de bactérias, uma vez que não há um valor de referência que não correlacione esse grupo de micro-organismos aos processos corrosivos.

2.3 Quantificação de sulfeto total na amostra

A concentração total de sulfeto presente na amostra foi medida através do método espectrofotométrico conhecido como azul de metileno. Antes, cada uma das amostras passa por duas etapas.

1ª etapa: acidificação da amostra:

Foi adicionado 1,0 mL de HCl 6M em 50,0 mL da amostra acondicionado em frasco de vidro lacrado. Em seguida os frascos foram mantidos a 50°C por 30 minutos em um banho térmico.

2ª etapa: arraste do H_2S por gás inerte (N_2) e precipitação sob a forma de sulfeto de cádmio:

Nesta etapa, a amostra foi purgada com nitrogênio a uma vazão de 100 mL/min por 30 minutos utilizando um cateter parenteral. A agulha foi introduzida no seio da amostra e o cateter plástico introduzido de maneira a ser a conexão de saída do H_2S que evoluiu da amostra. O H_2S arrastado é coletado por um sistema de absorção constituído por um frasco *impinger* contendo 50,0 mL de uma solução de $CdSO_4$ em meio alcalino, sob refrigeração e em ausência de luz.

3ª etapa: quantificação do H₂S por espectrofotometria – método do azul de metileno:

O H₂S foi precipitado na solução absorvedora como sulfeto de cádmio, e liberado em meio ácido pela reação com N,N-dimetil-p-difenilamina, sendo cloreto férrico o catalisador, formando o núcleo do azul de metileno. A absorvância foi medida após período de 20 minutos no comprimento de onda de 670 nm, utilizando o branco (total ausência de H₂S) como referência. Para corrigir a coloração no branco devida ao excesso de cloreto férrico recomenda-se a adição de solução de fosfato monoácido de amônio, onde o fosfato reage com o ferro e forma um complexo incolor.

Para a construção da curva padrão, primeiramente uma solução 100 mg/L de H₂S foi padronizada por técnica iodométrica e diluída cem vezes com água bidestilada pré-purgada com N₂. Alíquotas de volumes crescentes (faixa de 0,2 a 8,0 mL) desta solução de Na₂S diluída foram adicionadas a balões volumétricos em presença de sulfato de cádmio em meio alcalino. As absorvâncias das alíquotas foram medidas pelo método do azul de metileno como descrito anteriormente na 3ª etapa para quantificação de sulfeto total na amostra. Por esta técnica, é possível alcançar linearidade entre as absorvâncias medidas (entre 0,010 e 0,615) e massas de H₂S (entre 0,2 µg e 12,0 µg), com caminho ótico de 10 mm (APHA,1998).

Aqui também foi estabelecido um valor de referência, a saber:

- Máxima concentração permissível para um curto período de exposição (10 minutos para um turno de 8 horas) como sendo igual a 20,0 mg/L (NT Petrobras N-2282, 1998) (linha vermelha).

2.4 Avaliação da atividade metabólica ao longo de quinze dias

Os ensaios realizados em regime semicontínuo, objetivando minimizar os efeitos decorrentes da acumulação de produto no meio de crescimento (POSTGATE, 1984) obedeceram à seguinte metodologia:

- 1- Inoculação de 5 mL da amostra em meio Postgate C e incubação ao longo de 28 dias a temperatura de 30°C
- 2- Ao longo dos 15 dias (360 horas) o H₂S produzido foi arrastado de acordo com a 2ª etapa da metodologia descrita para determinação de sulfetos totais em amostra *in natura*, conforme a Tabela 2:

Tabela 2 - Amostragem temporal para a determinação de H₂S produzido

| Tempo de incubação (horas) |
|-----------------------------------|
| 24 (01 dia) |
| 48 (02 dias) |
| 72 (03 dias) |
| 144 (06 dias) |
| 216 (09 dias) |
| 312 (13 dias) |
| 360 (15 dias) |

Isto permitiu avaliar o perfil de concentração de sulfeto acumulado, indicativo do potencial da amostra em produzir sulfetos biogênicos, relacionando-se essa produção à atividade bacteriana.

2.5 Quantificação de sulfato total na amostra

A concentração dos íons sulfato presentes na amostra foi determinada gravimetricamente seguindo a metodologia do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), após filtração das amostras em membrana de éster de celulose com diâmetro de poro de 0,45 µm, para retirar quaisquer impurezas que possam interferir na quantificação. Neste método, o sulfato foi precipitado em meio ácido como sulfato de bário pela adição a quente de uma solução de cloreto de bário na concentração de 100 g/L. Esta precipitação ocorre em temperatura elevada (próxima de 100°C), e após um período de digestão de 4 horas, o precipitado é filtrado, lavado com água quente (para eliminar todo o cloreto presente) e seco em estufa a 105° C por 24 horas. Após este período, foi determinada então a massa do precipitado e a concentração de sulfato obtida pela Equação 1:

$$mgSO_4^{-2} / L = \frac{mgBaSO_4 \times 411,6}{vol.amostra} \quad (1)$$

Os valores de referência utilizados foram:

- 10,0 mg/L (linha amarela), o limite de detecção do método, sendo um valor aceitável de concentração e;
- 100,0 mg/L (linha vermelha) um valor elevado que acarreta uma grande disponibilidade de sulfato para redução por via microbiana.

2.6 Determinação dos valores de condutividade e pH

O pH de todas as amostras foi determinado utilizando medidor de pH Quimis (Modelo Q400M1) previamente calibrado com soluções-tampão de pH=4,0 e 10,0 e a condutividade foi determinada com o emprego de condutímetro (Modelo Analyser 600) previamente calibrado com solução padrão de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$. O valor de referência para o pH foi de $7,6 \pm 0,4$, caracterizando um ambiente favorável para a proliferação de BRS (linha vermelha); o valor de referência para a condutividade foi de 50 mS/cm, caracterizando um meio onde a condução de íons livres estaria facilitada (linha vermelha).

2.7 Meios de cultura

2.7.1 Meio Postgate E - modificado

O meio de cultura utilizado para detecção e quantificação de BRS foi o Meio Postgate E - modificado (POSTGATE,1984). Neste estudo, o ácido tioglicólico foi substituído pelo tioglicolato de sódio. A composição do meio e as quantidades necessárias para o volume total de 1,0L estão listadas na Tabela 3.

Para dar uma característica semi-sólida ao meio de cultura, agar foi solubilizado inicialmente sob agitação e leve aquecimento. Essa característica visa diminuir a concentração de oxigênio no meio, já que a condição básica para o crescimento das BRS é a anaerobiose. A purga com nitrogênio gasoso durante todo o preparo e distribuição do meio também possui este fim.

O pH do meio foi ajustado para 7,6 com uma solução de NaOH 0,1M. Após o preparo, foram distribuídos 9,0 mL do meio em frascos tipo penicilina de 10,0 mL, vedados com tampa de borracha e selados com lacre de alumínio. Após este

procedimento, os frascos contendo o meio foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, à 121°C (1,1 atm).

Devido às características das BRS, a anaerobiose não é a única condição para garantir o seu crescimento e o potencial redox do meio deve também estar em torno de -100 mV, valor alcançado através da adição de 0,1 mL de uma solução 12,4 g/L de tioglicolato de sódio, um agente redutor, em cada frasco da série.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura Postgate E – (1,0L).

| Composição | Quantidade |
|--------------------------------------|-------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| NH ₄ Cl | 1,0 g |
| Na ₂ SO ₄ | 1,0 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,67 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 1,83 g |
| Lactato de sódio (50% p/v) | 7,0 mL |
| Extrato de levedura | 1,0 g |
| Ácido ascórbico | 0,1 g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| Agar-Agar | 1,9 g |
| Resazurina (0,025% m/v) | 4,0 mL |
| NaCl | 35 g |

2.7.2 Meio Postgate C

O meio de cultura utilizado para o crescimento e avaliação da atividade metabólica de BRS foi o Meio Postgate C (POSTGATE, 1984). O preparo deste meio é semelhante ao apresentado no item anterior, com exceção do volume adicionado aos frascos que foi de 45,0 mL. A composição do meio e as quantidades necessárias para o volume total de 1,0L estão listadas na

Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura Postgate C – (1,0L).

| Composição | Quantidade |
|--------------------------------------|-------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| NH ₄ Cl | 1,0 g |
| Na ₂ SO ₄ | 4,5 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,040 g |
| MgSO ₄ .6H ₂ O | 0,06 g |
| Lactato de sódio (50% p/v) | 9,4 mL |
| Extrato de levedura | 1,0 g |
| Citrato de sódio.7H ₂ O | 0,3 g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,04 g |
| Agar-Agar | 1,9 g |
| Resazurina (0,025% m/v) | 4,0 mL |
| NaCl | 35 g |

2.7.3 Meio para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT)

A composição do meio para detecção e quantificação de BANHT está apresentada na Tabela 5. Após o preparo, o pH do meio foi ajustado para 7,6 e a condição de anaerobiose e distribuição foram realizadas como descrito no item III.6.1. Os frascos com o meio foram autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 20 minutos. Após o resfriamento também foi adicionado tioglicolato para baixar o potencial redox do meio.

Tabela 5 - Composição do meio de cultura para BANHT para o volume total de 1,0L.

| Composição | Quantidade |
|-------------------------|-------------------|
| Glicose | 5,0 g |
| Peptona universal | 4,0 g |
| Extrato de levedura | 1,0 g |
| Resazurina (0,025% m/v) | 4,0 mL |
| NaCl | 35,0 g |

2.7.4 Solução de diluição para os meios de cultivo de BRS e BANHT

A composição da solução redutora utilizada nas diluições dos meios para BRS e BANHT para um volume total de 1,0L está representada na Tabela 6. Após o preparo, o pH da solução foi ajustado para 7,6 e a condição de anaerobiose e distribuição foram realizadas como descrito no item 2.7.1. Os frascos com o meio foram autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 20 minutos.

Tabela 6 - Composição da solução redutora para o volume total de 1,0L.

| Composição | Quantidade |
|-------------------------|-------------------|
| Tioglicolato de sódio | 0,124 g |
| Ácido ascórbico | 0,1 g |
| Resazurina (0,025% m/v) | 4,0 mL |
| NaCl | 35 g |

2.7.5 Meio de Cultura para Bactérias Facultativas Heterotróficas Totais (BFHT)

A composição do meio de cultura para detecção e quantificação de BFHT está descrita na Tabela 7.

No preparo, todos os componentes foram dissolvidos conjuntamente, exceto o citrato férrico, que foi solubilizado a quente e adicionado ao meio quando estava a temperatura ambiente. Após o preparo, o pH foi ajustado para 7,6 e o meio distribuído em frascos Erlenmeyer e autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 20 minutos.

Tabela 7 - Composição do meio de cultura para BFHT para o volume total de 1,0L.

| Composição | Quantidade |
|---------------------|-------------------|
| Glicose | 1,0 g |
| Peptona universal | 5,0 g |
| Extrato de levedura | 1,0 g |
| Citrato férrico | 0,1 g |
| Agar-agar | 15,0 g |
| NaCl | 35 g |

2.7.6 Solução de Diluição para o Meio de BFHT

A solução de diluição para o meio de BFHT era uma solução de NaCl 35,0 g/L. A condição de anaerobiose não era necessária para esta solução e a sua distribuição se deu da maneira descrita no item III.6.1. Os frascos com a solução foram autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 20 minutos.

2.7.7 Meio de Cultura para Bactérias Precipitantes de Ferro (BPF)

O meio de cultura para detecção e quantificação de BPF foi o meio conhecido como agar citrato férrico amoniacal (CECA, 2001), cuja composição está descrita na Tabela 8.

No preparo, todos os componentes foram dissolvidos, exceto o citrato férrico amoniacal, que foi adicionado por último ao meio de cultura. Após o preparo, o pH foi ajustado para 6,6 e o meio distribuído em frascos erlenmeyer, autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 20 minutos.

Tabela 8 - Composição do meio de cultura para BPF para o volume total de 1,0L.

| Composição | Quantidade |
|---|-------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,5 g |
| NaNO ₃ | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| CaCl ₂ .6H ₂ O | 0,2 g |
| Citrato férrico amoniacal | 10,0 g |
| Agar-agar | 15,0 g |
| NaCl | 35,0 g |

2.7.8 Solução de Diluição para o Meio de BPF

A solução de diluição para o meio de BPF era composta por uma solução A e uma solução B. A solução A era uma de KH₂PO₄ em água, na concentração de 34,0 g/L. Inicialmente o KH₂PO₄ foi dissolvido em 500 mL de água destilada, o pH ajustado para 7,2 com uma solução de NaOH 1,0M e os 500 mL de água destilada

remanescentes adicionados posteriormente. A solução B era uma solução de MgSO_4 em água, na concentração de 50,0 g/L. Misturou-se então 1,25 mL da Solução A e 5,0 mL da Solução B e esta mistura foi avolumada a 1000 mL. A condição de anaerobiose não era necessária para esta solução e a distribuição se deu da maneira descrita no item 2.7.1. Os frascos com a solução foram autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 20 minutos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados os resultados do monitoramento mensal, para cada tanque, dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos já citados. É importante mencionar que nem todos os tanques estarão presentes em todas as coletas, fato este devido à indisponibilidade do tanque para coleta de amostra no dia. Para cada parâmetro, serão selecionados os dois “melhores” e “piores” tanques, ou seja, os dois tanques com a menor e maior ocorrência de resultados acima dos limites estabelecidos para uma ação corretiva, respectivamente. Após a seleção destes quatro tanques, será feita uma discussão da relação entre os parâmetros para cada tanque, a fim de corroborar a classificação dos mesmos em função da ocorrência de resultados favoráveis ou desfavoráveis. As cores das barras de resultados correspondem às cores dos tanques monitorados.

3.1 Monitoramento da População de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos da quantificação mensal de BRS para cada tanque monitorado. Pode-se observar que a maioria dos resultados apresentou quantificação entre 10^4 e 10^5 NMP/mL, ou seja, na sua maioria as quantificações de populações de BRS estiveram num limite entre alerta (linha amarela) e tomada de decisão (linha vermelha). Estes resultados reforçam o fato de que, na sua grande maioria, os tanques encontram-se contaminados com populações microbianas de bactérias redutoras de sulfato fora dos padrões de normalidade, o que deve estar trazendo conseqüências graves de natureza ambiental e operacional. Dentre essas conseqüências pode-se estimar uma elevada atividade formadora de sulfetos biogênicos, que tem como conseqüência o aumento da biocorrosão.

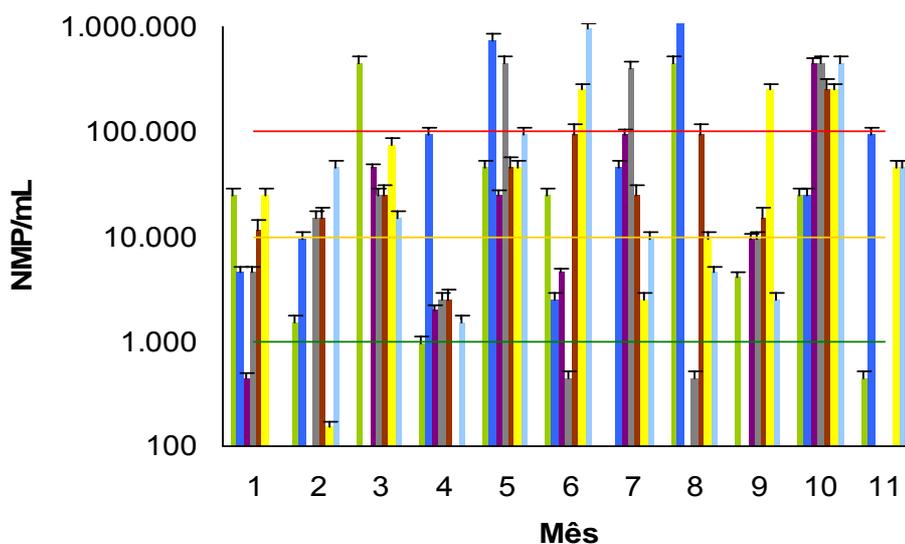


Figura 5 - Monitoramento mensal das populações de BRS nos tanques de armazenamento água/óleo.

Conduzindo-se uma avaliação mais particularizada com relação aos tanques pode-se observar que o tanque verde apresentou, ao longo das amostragens, variações de concentração de BRS que, com exceção da amostragem 11, sempre esteve acima do limite aceitável para este parâmetro (linha verde). O mesmo aconteceu com o tanque roxo, que apenas na amostragem 1 apresentou concentração aceitável de BRS e o tanque cinza, apenas nas amostragens 6 e 8. O tanque azul apresentou em todas as amostragens valores acima da referência estabelecida, assim como o tanque vermelho, ciano e amarelo. Este último, apesar de uma única amostragem dentro do limite aceitável (linha verde, amostragem 2) foi considerado, na sua totalidade fora dos padrões de normalidade, uma vez que os demais valores de quantificação foram tão elevados que a amostragem 2 pode ser desconsiderada.

Se considerarmos agora, o limite superior do gráfico representado na Figura 5 (acima da linha vermelha) pode-se verificar que praticamente todos os tanques, em duas amostragens aleatórias, necessitavam de uma medida corretiva para diminuição da população de BRS presente.

O que pode ser extraído desses resultados é que deve ocorrer alguma dinâmica de transferência de fluidos entre os tanques monitorados (procedimento

este comum nos tanques de armazenamento de água e óleo), o que contribui para a ausência de tendência clara (crescente, decrescente ou constante), nos tanques acompanhados. Isto ressalta o fato de que o acompanhamento dos perfis de BRS deve ser feito de forma contínua, pois, em função dessa dinâmica, as amostragens podem indicar que eventuais medidas devam ser tomadas.

De uma forma geral, considerando-se apenas os valores absolutos reportados na Figura 5 pode-se concluir que os tanques cinza e amarelo foram os tanques que apresentaram o maior número de determinações que requerem tomada de decisão para correção do problema (linha vermelha). Em contrapartida, os tanques vermelho e roxo foram os tanques que podem ser considerados como os mais limpos com relação à contaminação com BRS, por apresentarem o maior número de ocorrências abaixo do limite aceitável (linha verde).

Esses resultados de quantificação de BRS não podem ser analisados de forma isolada, pois são resultados obtidos em função de outros parâmetros que também foram acompanhados no presente estudo. Dessa forma, posteriormente, estes resultados serão correlacionados com os obtidos para bactérias anaeróbias heterotróficas totais, concentração de sulfeto e disponibilidade de sulfato no meio. A correlação desses parâmetros pode trazer importantes conclusões acerca dessa dinâmica.

3.2 Monitoramento da População de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)

A Figura 6 apresenta os resultados do monitoramento mensal das populações de BANHT nos tanques de armazenamento água/óleo. Esta figura mostra que entre as coletas 1 e 4 muitas quantificações ficaram abaixo de 100 NMP/mL, perfil diferente do apresentado pelas populações de BRS na Figura 5. As BANHT são importantes no consórcio microbiano formado no meio, pois as BRS utilizam como fonte de energia substâncias orgânicas de baixa massa molecular que são excretados justamente pelas BANHT, ou seja, o papel das BANHT é fazer a quebra de moléculas orgânicas de maior complexidade em menores, aumentando assim a

disponibilidade de metabólitos para BRS (VAZOLLER, 1993). Portanto, esperava-se que as populações de BANHT e BRS seguissem o mesmo perfil qualitativo.

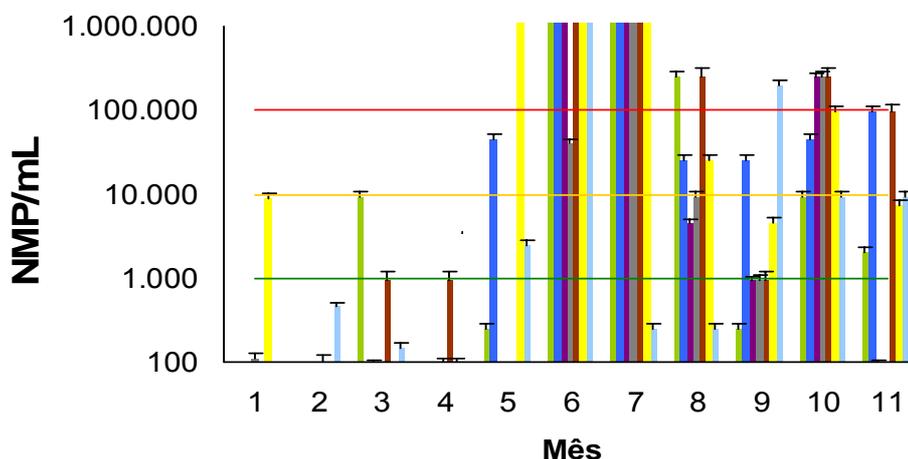


Figura 6 - Monitoramento mensal das populações de BANHT nos tanques de armazenamento água/óleo.

A partir da coleta 6 praticamente todos os tanques apresentaram valores consideráveis de populações de BANHT, visto que em sua grande maioria os resultados estiveram, no mínimo, acima da linha que indica um valor de alerta. Observando especificamente as coletas 6 e 7, com as exceções do tanque cinza na coleta 6 e o tanque ciano na coleta 7, os tanques apresentaram valores em torno de 10^6 NMP/mL, indicando que principalmente nestas duas coletas uma medida visando o controle destas populações em todos os tanques deveria ser tomada.

Uma análise individual do comportamento dos tanques frente a este parâmetro mostra que a partir da coleta 5 o tanque azul sempre apresentou valores de concentração de BANHT acima do limite aceitável, perfil seguido também pelo tanque amarelo. A partir da coleta 6, os tanques vermelho e verde, com exceção da coleta 9, também mostraram que as suas populações de BANHT permaneceriam no mínimo acima do limite aceitável até o término do monitoramento. Os tanques cinza e roxo apresentaram em duas coletas valores de populações de BANHT abaixo do limite aceitável (coletas 9 e 11) e para o tanque ciano estes valores aceitáveis

ocorreram nas coletas sequenciais 7 e 8. Comparando-se com as cinco coletas iniciais, estas informações mostram que especificamente a partir da coleta 6 os valores das populações de BANHT elevaram-se bastante para todos os tanques, e esta situação tornou-se crítica porque, na média, a maioria destes resultados excedeu o limite para uma tomada de decisão (linha vermelha).

Utilizando-se agora como referência o valor para uma tomada de decisão (linha vermelha - 10^5 NMP/mL), pode-se dizer que este limite só foi superado por mais de um tanque na mesma coleta a partir da coleta 6 (já que somente o tanque amarelo ultrapassou este limite na coleta 5). Como já foi dito anteriormente, nas coletas 6 e 7 os tanques apresentaram em sua grande maioria os maiores valores de concentração de BANHT, pois em cada uma destas coletas seis tanques apresentaram populações altíssimas de BANHT. Após a coleta 7, ao menos um tanque excedeu este valor limite, com exceção da coleta 11 em que todos os tanques apresentaram valores abaixo do limite para uma tomada de decisão. Uma correlação que pode corroborar este perfil apresentado pelos tanques a partir da coleta 6 é que na Figura 5 a maior ocorrência de valores acima do limite para uma tomada de decisão ocorre entre as coletas 5 e 10, o que ajuda a exemplificar as interações entre os micro-organismos existentes no consórcio microbiano formado no interior dos tanques.

De uma forma geral, analisando os valores absolutos reportados na Figura 6 pode-se concluir que os tanques vermelho e amarelo foram os tanques que apresentaram o maior número de determinações acima do valor para uma tomada de decisão. Em contrapartida, os tanques cinza e ciano podem ser considerados os tanques mais “limpos” com relação ao perfil das suas populações de BANHT.

3.3 Monitoramento da População de Bactérias Facultativas Heterotróficas Totais (BFHT)

A Figura 7 apresenta os resultados do monitoramento mensal das populações de BFHT nos tanques de armazenamento água/óleo. Esta figura mostra que a grande maioria dos resultados apresentou quantificação entre 10^3 e 10^4 NMP/mL, ou

seja, valores entre o estabelecido para um alerta e o limite para uma tomada de decisão. O papel principal das bactérias facultativas heterotróficas é, assim como as anaeróbias heterotróficas, fazer a quebra dos substratos orgânicos em moléculas menores e também consumir o oxigênio facilitando a manutenção das condições de anaerobiose em parte do conteúdo armazenado, auxiliando o desenvolvimento das bactérias redutoras de sulfato (VAZOLLER, 1993). Portanto, de maneira geral, pode-se dizer que os tanques monitorados estão contaminados com populações de BFHT.

Analisando-se particularmente a Figura 7, excetuando-se a coleta 11 (em que somente três tanques foram coletados) pode-se observar que alguns tanques sempre apresentaram ao longo do monitoramento variações nas concentrações de BFHT acima do limite aceitável para este parâmetro, caso dos tanques verde, roxo, azul e vermelho. Para os tanques ciano, amarelo e cinza, somente nas coletas 1, 4 e 6, respectivamente, as concentrações de BFHT estiveram numa faixa considerada aceitável para este parâmetro. Mas, fazendo uma análise geral, estes resultados podem ser desconsiderados na avaliação global, devido aos altos valores apresentados por estes tanques ao longo das outras coletas. Estes mesmos tanques podem ser considerados, juntamente com os tanques verde, roxo, azul e vermelho, fora da normalidade com relação à concentração de BFHT.

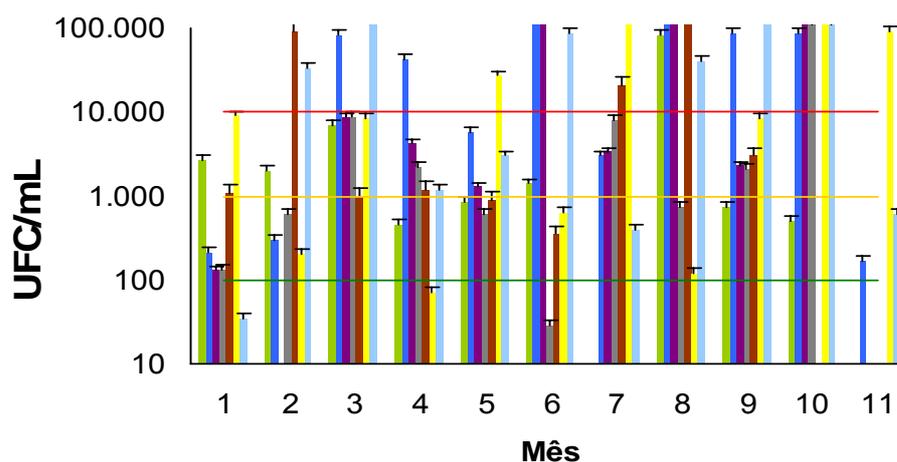


Figura 7 - Monitoramento mensal das populações de BFHT nos tanques de armazenamento água/óleo.

Se considerarmos o limite superior da Figura 7 (linha vermelha – tomada de decisão) pode-se observar que todos os tanques, em pelo menos uma coleta, apresentaram resultado de quantificação acima de 10^5 NMP/mL. Isto reforça a idéia sobre a transferência de conteúdo entre os tanques, onde talvez a transferência de um fluido contaminado de um tanque para outro seja o responsável por estas incidências de contaminação em todos os tanques, em pelo menos uma coleta.

De uma forma geral, analisando somente os valores absolutos reportados na Figura 7, pode-se concluir que os tanques azul e ciano são os que apresentaram o maior número de determinações que requerem uma tomada de decisão (seis num total de 11 coletas), o que os classifica como os dois piores tanques com relação à concentração de BFHT. Em contrapartida, os tanques verde e cinza podem ser considerados os “mais limpos” com relação ao perfil de BFHT, pois apresentaram populações acima do limite para uma tomada de decisão somente nas coletas 8 e 10, respectivamente.

3.4 Monitoramento da População de Bactérias Precipitantes de Ferro (BPF)

A Figura 8 apresenta os resultados do monitoramento mensal das populações de BPF nos tanques de armazenamento água/óleo. Esta figura mostra que muitos tanques não possuíam BPF em suas amostras. Apesar das BPF participarem do processo de corrosão microbiológica oxidando o íon ferroso a íon férrico, consumindo oxigênio para auxiliar na manutenção da anaerobiose e também fazendo a quebra de substratos para facilitar o metabolismo das BRS, este grupo de bactérias é encontrado mais dificilmente em fluidos como água de injeção ou formação, que seriam os principais constituintes dos tanques monitorados. Mas, de maneira geral, pode-se observar que a grande maioria dos resultados encontra-se dividido quase que igualmente entre resultados acima do limite para um alerta e resultados acima do limite para uma tomada de decisão. Este perfil indica que nos tanques onde houve a presença de BPF, em sua maioria, os valores podem ser considerados altos e os tanques possuíam um perfil de contaminação.

Fazendo uma análise particularizada da Figura 8, pode-se observar que nas coletas 1, 5 e 9 os tanques não apresentaram valores acima do limite para uma tomada de decisão, mas em todas ao menos um tanque possuía uma concentração de BPF acima do limite de alerta. Como mencionado no parágrafo anterior, em muitas coletas os tanques não possuíam população de BPF. Nas onze coletas realizadas, o tanque azul foi o que obteve o maior número de quantificações, não apresentando população de BPF somente na coleta 07. Todos os outros tanques apresentaram populações em cinco ou seis coletas, fazendo com que o tanque azul tenha grandes chances de possuir o pior comportamento frente a este parâmetro.

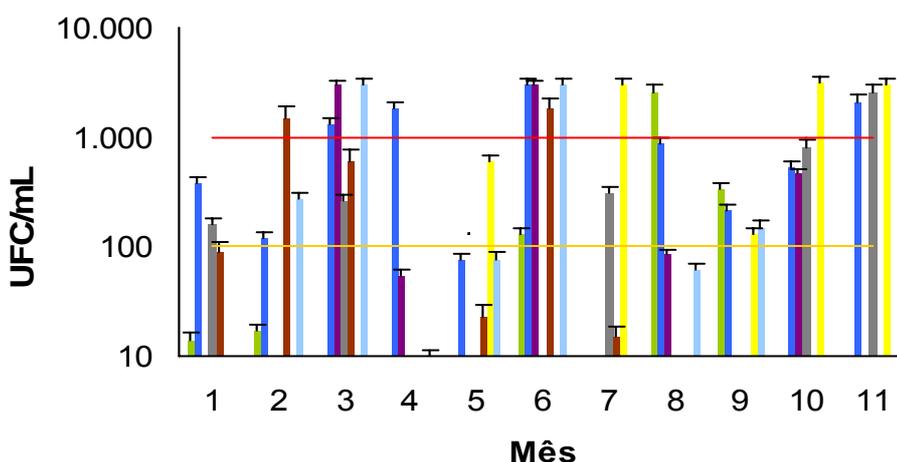


Figura 8 - Monitoramento mensal das populações de BPF nos tanques de armazenamento água/óleo.

O tanque vermelho apresentou quantificações nas sete coletas iniciais (com exceção da coleta 04) e o tanque amarelo nas sete coletas finais (com exceção das coletas 06 e 08), o que pode indicar uma transferência de fluido do tanque vermelho para o tanque amarelo ao longo do monitoramento.

Considerando o limite superior da Figura 8 (linha vermelha – tomada de decisão) pode-se observar que todos os tanques apresentaram em ao menos uma coleta uma concentração de BPF acima deste limite. Somente em três coletas (01,

05 e 09) não seria necessário uma medida corretiva para diminuição dos valores de concentração celular obtidos.

De uma forma geral, analisando somente os valores absolutos reportados na Figura 8, pode-se concluir que os tanques azul e amarelo são os que apresentaram o maior número de determinações que requerem uma tomada de decisão (quatro e três num total de 11 coletas, respectivamente), o que os classifica como os dois piores tanques com relação à concentração de BPF. Em contrapartida, os tanques verde e cinza podem ser considerados os “mais limpos” com relação ao perfil de BPF, pois apresentaram populações acima do limite para uma tomada de decisão somente nas coletas 8 e 11, respectivamente.

3.5 Monitoramento da concentração de sulfeto total

Diferentemente das discussões anteriores, onde as variações nos perfis dos tanques ao longo do monitoramento foram importantes para que se entendessem os resultados observados, na análise do monitoramento do sulfeto esta linha de discussão não será seguida. Existem muito valores que por serem pequenos não estão representados na Figura 9, o que denota uma ausência de tendências ou perfis. Portanto, a discussão dos resultados para sulfeto foi feita com relação às coletas realizadas.

A Figura 9 apresenta os resultados do monitoramento mensal da concentração de sulfeto total nas amostras coletadas dos tanques selecionados. Esta figura mostra que a grande maioria dos resultados esteve abaixo de 1,0 mg/L mas, observando os que estão representados, nota-se uma distribuição distinta entre valores abaixo do limite de alerta e valores acima do limite para uma tomada de decisão. A ocorrência de sulfeto nas amostras implica diretamente no comprometimento da estrutura metálica dos tanques, já que o H_2S , sendo o principal produto metabólico das BRS, é corrosivo para estruturas metálicas (VIDELA, 2003) e compromete também a saúde de operadores que trabalham próximos ou nas imediações dos tanques devido à toxicidade deste gás ao organismo humano.

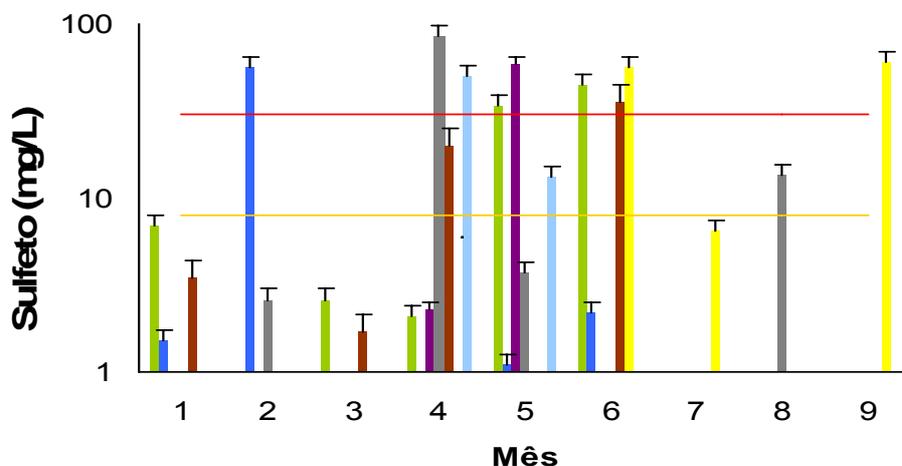


Figura 9 - Monitoramento mensal das concentrações de sulfeto nos tanques de armazenamento água/óleo.

Observando o gráfico representado na Figura 9, nota-se que os maiores valores de concentração obtidos estão entre as coletas 04 e 06, perfil que pode ser considerado compatível com o apresentado pelas BRS na Figura 5, que mostraram os maiores valores de população entre as coletas 05 e 07. Nas três coletas iniciais, as poucas quantificações representadas na figura estão abaixo do limite de alerta, com exceção do tanque azul que não somente suplantou este limite como mostrou um valor acima do limite para uma tomada de decisão. Já nas coletas “centrais” (4 a 6), houve um salto nos valores das concentrações de sulfeto, onde nove resultados num total de catorze representados no gráfico estão acima do limite de alerta. Nas três últimas coletas somente os tanques cinza e amarelo apresentaram quantificação, com o tanque amarelo suplantando o limite para uma tomada de decisão na última coleta.

Se considerarmos agora o limite superior da Figura 9, nota-se que todo tanque necessitou ao menos uma vez de uma medida corretiva para o controle da concentração de sulfeto. Como já foi dito no parágrafo anterior, a maior ocorrência de valores acima do limite para uma tomada de decisão ocorreu nas coletas 5 e 7, portanto, estas coletas foram importantes para classificar os melhores e piores tanques com relação a este parâmetro.

De maneira geral, considerando somente os valores absolutos representados na Figura 9, os tanques amarelo e verde podem ser considerados os dois piores com relação a este parâmetro pois apresentaram o maior número de resultados que demonstraram a necessidade de uma tomada de decisão para solução do problema. Já para a classificação dos dois tanques mais “limpos”, não se pode levar em consideração somente os valores absolutos, por que os tanques azul, cinza, ciano, roxo e vermelho apresentaram o mesmo número de ocorrências acima do limite de decisão. Portanto, estes tanques serão classificados de acordo com o perfil apresentado ao longo do monitoramento. Apesar de terem suplantado este limite superior uma única vez, os tanques roxo e ciano apresentaram em todo o monitoramento somente mais uma quantificação representada na figura, ao contrario dos tanques azul, cinza e vermelho, que apresentaram quantificações representativas em quatro coletas. Sendo assim, os tanques roxo e ciano podem ser considerados os melhores tanques com relação à concentração de sulfeto total nas suas amostras.

3.6 Monitoramento mensal da concentração de sulfato total

A Figura 10 apresenta o perfil do monitoramento mensal da concentração de sulfato total nas amostras coletadas dos tanques selecionados.

Esta figura mostra que de maneira geral a grande maioria dos resultados obtidos esteve próximo ao limite de alerta de 10 mg/L. Na verdade, esta concentração é o limite de quantificação do método, por isso muitos valores podem ser menores que os que foram representados, mas não é possível precisá-los devido à uma limitação do próprio método. A importância do monitoramento da concentração de sulfato foi devido à necessidade deste íon como aceptor final de elétrons no metabolismo das BRS (MADIGAN *et al.*, 2004). Portanto, quanto maior a concentração deste íon, mais favorecido estará o ambiente para o crescimento deste grupo de bactérias.

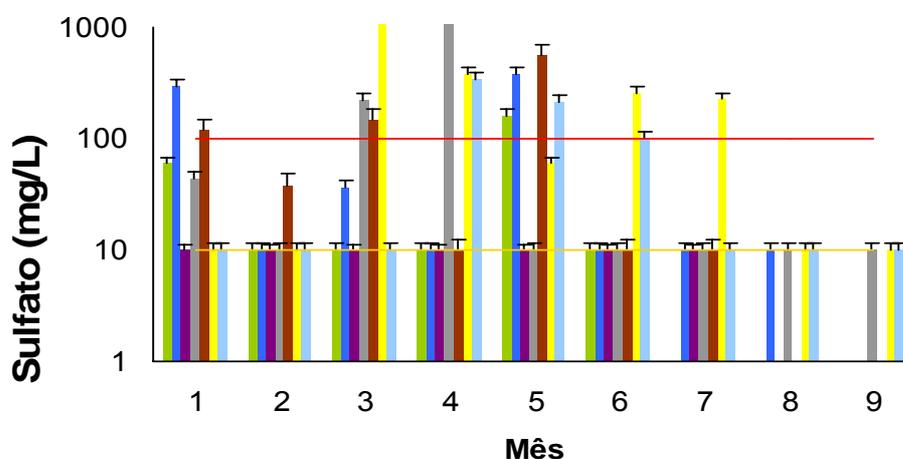


Figura 10 - Monitoramento mensal das concentrações de sulfato nos tanques de armazenamento água/óleo.

Pode-se observar na Figura 10 que as maiores concentrações de sulfato ocorreram principalmente nas coletas 04, 05 e 06, perfil este que pode ser considerado compatível com os apresentados pelas BRS na Figura 5 e a concentração de sulfeto na Figura 9. Nestas coletas “centrais” (4 a 6), a maior concentração de bactérias e a maior disponibilidade de sulfato geraram uma maior liberação de sulfeto no meio decorrente do metabolismo das BRS. O tanque roxo foi o único tanque que não apresentou concentração de sulfato superior ao limite de alerta ao longo do monitoramento. Em contrapartida, todos os outros tanques apresentaram, em pelo menos uma coleta, uma concentração acima deste limite.

Considerando-se agora somente os valores absolutos representados na Figura 10, os tanques amarelo e vermelho podem ser considerados os dois piores tanques com relação a concentração de sulfato, pois apresentaram valores acima do limite para uma tomada de decisão em quatro e três coletas, respectivamente. Em contrapartida, o tanque roxo (com nenhum valor acima do limite para uma tomada de decisão) e o tanque verde, com somente uma suplantação deste valor, podem ser considerados os melhores tanques com relação a este parâmetro.

3.7 Monitoramento mensal dos valores de condutividade e pH

Estes dois parâmetros foram monitorados somente para se determinar se os tanques possuem um ambiente favorável ao crescimento dos grupos microbianos estudados.

A Figura 11 apresenta o perfil do monitoramento mensal da condutividade nas amostras coletadas dos tanques selecionados. Pode-se concluir que, de maneira geral, a maioria dos valores encontra-se próximo ao valor estabelecido como referência. É a mobilidade dos íons que determinam a sua condutividade, ou seja, quanto maior este valor, os micro-organismos terão uma maior disponibilidade dos íons que são necessários para a sua nutrição, como por exemplo, o íon sulfato que é tão importante no processo metabólico das BRS. Portanto, todos os tanques favorecem a mobilidade dos íons e a sua disponibilidade para o consórcio microbiano existente no interior dos tanques. A Figura 12 apresenta o perfil do monitoramento mensal dos valores de pH nas amostras dos tanques selecionados. Pode-se concluir, de maneira geral, que a maioria dos valores oscila num intervalo (entre 6,6 e 8,6) favoráveis ao crescimento das BRS, BANHT, BFHT e BPF. Ou seja, todos os tanques fornecem um pH favorável para o estabelecimento do consórcio microbiano no seu interior.

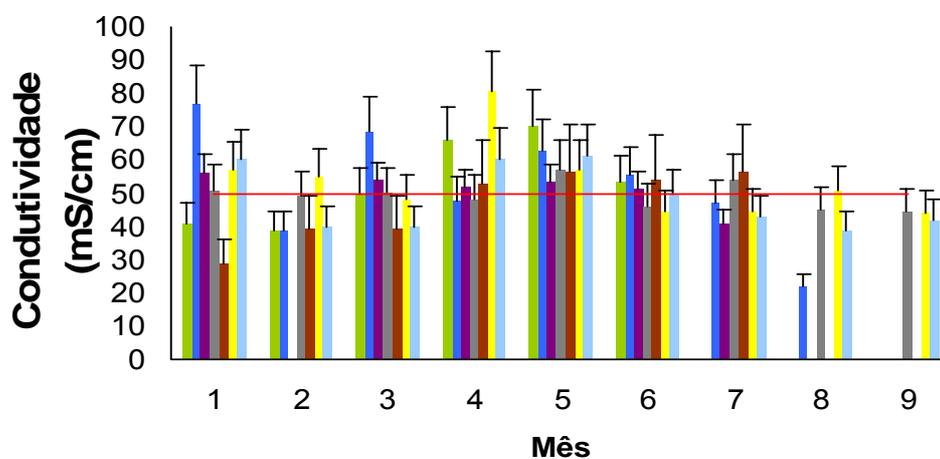


Figura 11 - Monitoramento mensal dos valores de condutividade nos tanques de armazenamento água/óleo.

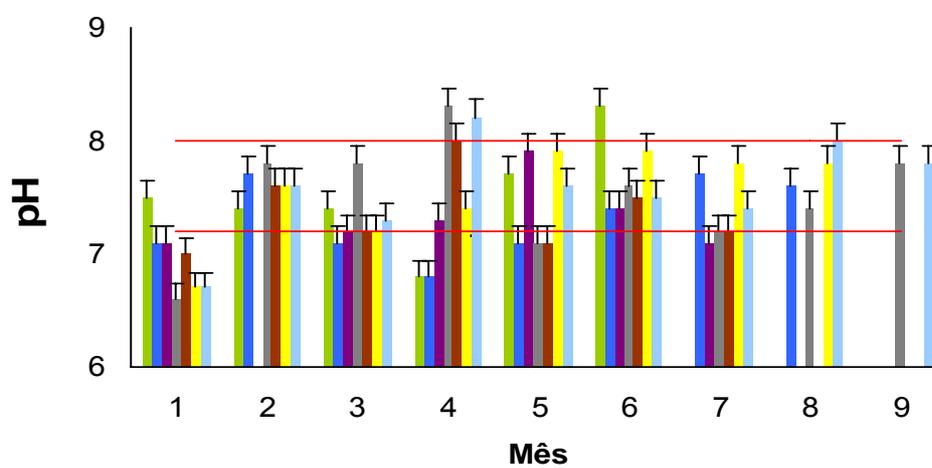


Figura 12 - Monitoramento mensal dos valores de pH nos tanques de armazenamento água/óleo.

3.8 Determinação dos dois melhores e dois piores tanques do terminal

Após a análise de todos os parâmetros monitorados e a identificação dos dois melhores e os dois piores tanques frente a cada um dos parâmetros, uma visualização do desempenho destes tanques é importante para a determinação dos dois melhores e os dois piores tanques do terminal, como um todo. Esses resultados estão sumarizados na Tabela 9, onde os pontos vermelhos indicam os piores tanques e os verdes os melhores.

Todos os parâmetros já tiveram a sua importância mencionada, e ela vem principalmente da necessidade de se observar nos tanques um ambiente favorável para o estabelecimento do consórcio microbiano. Todavia, dentre todos os parâmetros monitorados, a interação entre BANHT e BRS com a conseqüente liberação de sulfeto seria o principal motivo de preocupação com relação ao comprometimento da estrutura dos tanques e a manutenção de condições operacionais adequadas. Após esta discussão, os parâmetros monitorados e as suas interações para o estabelecimento e manutenção do consórcio microbiano formado que é o principal responsável pela biocorrosão no interior dos tanques, a classificação dos mesmos segue prioritariamente os parâmetros representados nas três primeiras colunas da Tabela 9.

Tabela 9 - Classificação dos tanques de acordo com os parâmetros monitorados.

| Tanques | BANHT | BRS | Sulfeto | BFHT | BPF | Sulfato |
|----------|-------|-----|---------|------|-----|---------|
| Amarelo | ● | ● | ● | | ● | ● |
| Azul | | | | ● | ● | |
| Ciano | ● | | ● | ● | | |
| Cinza | ● | ● | | ● | ● | |
| Roxo | | ● | ● | | | ● |
| Vermelho | ● | ● | | | | ● |
| Verde | | | ● | ● | ● | ● |

Considerando então as três primeiras colunas para a classificação dos tanques, os dois piores tanques do monitoramento foram o tanque amarelo e o tanque cinza. O primeiro por apresentar o pior desempenho em cinco dos seis parâmetros utilizados para classificação, incluindo os três parâmetros considerados mais importantes. Já o tanque cinza foi incluído como pior tanque por ter apresentado o pior desempenho quanto ao perfil de BRS.

Em contrapartida, os dois melhores tanques do monitoramento são os tanques roxo e ciano. O tanque roxo foi considerado o melhor por ter apresentado o melhor perfil em dois dos parâmetros considerados mais importantes na classificação (BRS e sulfeto), e por não ser apontado como pior tanque em nenhum dos outros parâmetros. Já o tanque ciano foi incluído também como melhor tanque por ter apresentado o melhor comportamento no monitoramento das populações de BANHT e sulfeto (dois dos três parâmetros mais importantes para a classificação) e por não apresentar uma concentração crítica de BRS.

3.9 Inter-relação entre os parâmetros monitorados nos tanques classificados

Até este item, foram discutidos os perfis de todos os tanques ao longo do monitoramento frente aos parâmetros avaliados, e esta discussão foi importante para que uma conclusão geral sobre os tanques mais contaminados e os mais limpos do ponto de vista microbiológico fosse alcançada. Após a classificação dos mesmos, serão apresentados os perfis de cada um destes quatro tanques com relação às concentrações de BRS, BANHT, sulfato e sulfeto. Estes perfis serão visualizados para que se observe se esses quatro parâmetros corroboram as relações existentes entre eles apresentada na revisão bibliográfica: a redução de **sulfato** por **BRS** em um ambiente anaeróbio (facilitado pela presença de BFHT e BPF) com a conseqüente liberação de **sulfeto** somente ocorre com a disponibilidade de metabólitos excretados pelas **BANHT**. O acompanhamento dos tanques com relação aos parâmetros pH, condutividade, BPF e BFHT não serão apresentados, pois estes podem ser considerados secundários com relação à discussão da inter-relação dos parâmetros selecionados nos tanques monitorados. Já é de conhecimento que os tanques possuem condições para o estabelecimento do consórcio microbiano, portanto a discussão será feita somente com os parâmetros considerados mais relevantes. Este procedimento será feito levando-se em conta os dois tanques mais contaminados e finalizando com os dois, até então considerados os tanques mais limpos. Nos gráficos de concentrações de sulfato e sulfeto, os valores foram representados pelas barras escuras e claras, respectivamente.

3.9.1 Tanque Amarelo

A Figura 13 apresenta o perfil do monitoramento das populações de BRS e BANHT para o tanque amarelo. Pode-se observar que em sete de onze amostragens o tanque amarelo apresentou concentrações de BRS iguais ou acima de 10^4 NMP/mL, indicando a contaminação deste tanque com este grupo de bactérias. É interessante lembrar que este tanque suplantou o limite para uma tomada de decisão corretiva tanto para BRS como para BANHT em três coletas e por este motivo foi considerado o pior tanque de todo o monitoramento.

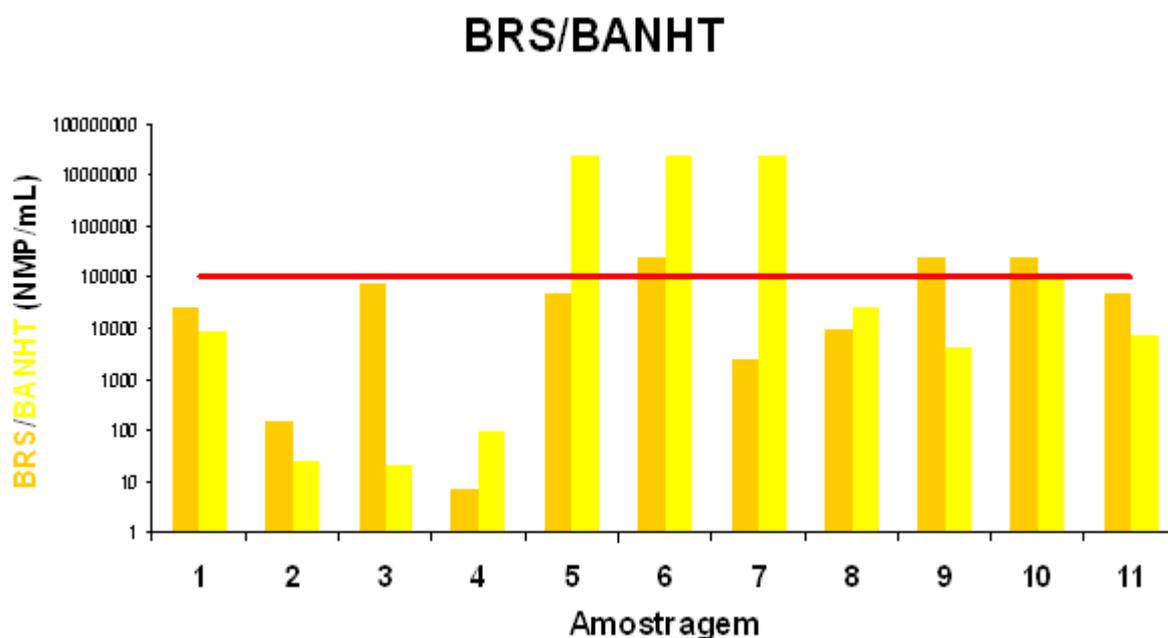


Figura 13 - Monitoramento mensal das concentrações de BRS e BANHT no tanque amarelo.

Como era de se esperar, as BANHT estiveram presentes em todas as amostragens, em cinco delas com valores de concentração maiores que os de BRS e nas outras seis com valores menores. Esse comportamento tornou difícil estabelecer que tipo de relação existe entre as concentrações destes dois grupos bacterianos para o tanque amarelo. Na coleta 3, por exemplo, foi observada uma concentração de BRS próxima de 10^5 NMP/mL, enquanto a concentração de BANHT foi de 10^2 NMP/mL, praticamente mil vezes menor. Ou seja, teve-se a impressão que nesta coleta ou as BRS estavam muito adaptadas ao ambiente a ponto de se

desenvolverem com uma baixa concentração de fonte de carbono, visto que as BANHT - que fornecem estes metabolitos - estavam presentes em baixas concentrações, ou as BANHT foram muito eficientes no seu metabolismo fornecendo às BRS uma quantidade adequada de metabólitos mesmo estando em baixa concentração, mas na coleta 7 este perfil se inverte, e as BRS cresceram numa concentração mil vezes inferior (10^4 NMP/mL) às BANHT (10^7 NMP/mL), não confirmando as suposições anteriores. Assim, não foi possível afirmar se o crescimento das BRS é favorecido pela maior ou menor concentração de BANHT.

Analisando-se então a Figura 14, que apresenta os perfis das concentrações de sulfato e sulfeto instantâneo para o tanque amarelo, observou-se que em pouco mais da metade das coletas (3 a 7) a concentração de sulfato sempre esteve acima de 100 mg/L, e nas coletas restantes observou-se o valor do limite de detecção do método (10 mg/L).

Estes valores indicam que no tanque amarelo há a disponibilidade de sulfato para ser reduzido pelas BRS, que como foi mostrado no parágrafo anterior, estavam presentes no tanque em menor ou maior concentração em todas as coletas. Esta maior disponibilidade de sulfato nestas cinco coletas não necessariamente implica numa maior produção de sulfeto pelas BRS, mesmo estando estas bactérias em uma concentração elevada. Nas coletas 3 e 5, por exemplo, as concentrações de BRS foram altas, próximas de 10^5 NMP/mL e havia uma boa disponibilidade de sulfato no meio, entretanto, o sulfeto quantificado nestas amostras não passou de 0,1 mg/L. Em contrapartida, as duas maiores concentrações de sulfeto (nas coletas 6 e 9) foram obtidas com as duas maiores concentrações de BRS, um pouco acima de 10^5 NMP/mL, mas não muito maiores que as concentrações de BRS nas coletas 3 e 5. Isto indica que as BRS encontradas nas coletas 6 e 9 possuem uma atividade metabólica geradora de sulfetos maior que aquelas encontradas nas coletas 3 e 5, suposição esta corroborada pelas concentrações de sulfeto obtidas. Mas como explicar que na coleta 4, com apenas 10 NMP/mL de BRS, o sulfeto quantificado na amostra seja tão baixo quanto aquele encontrado nas coletas 3 e 5, por exemplo, com uma concentração de BRS praticamente dez mil vezes maior.

Concentrações de sulfato e sulfeto

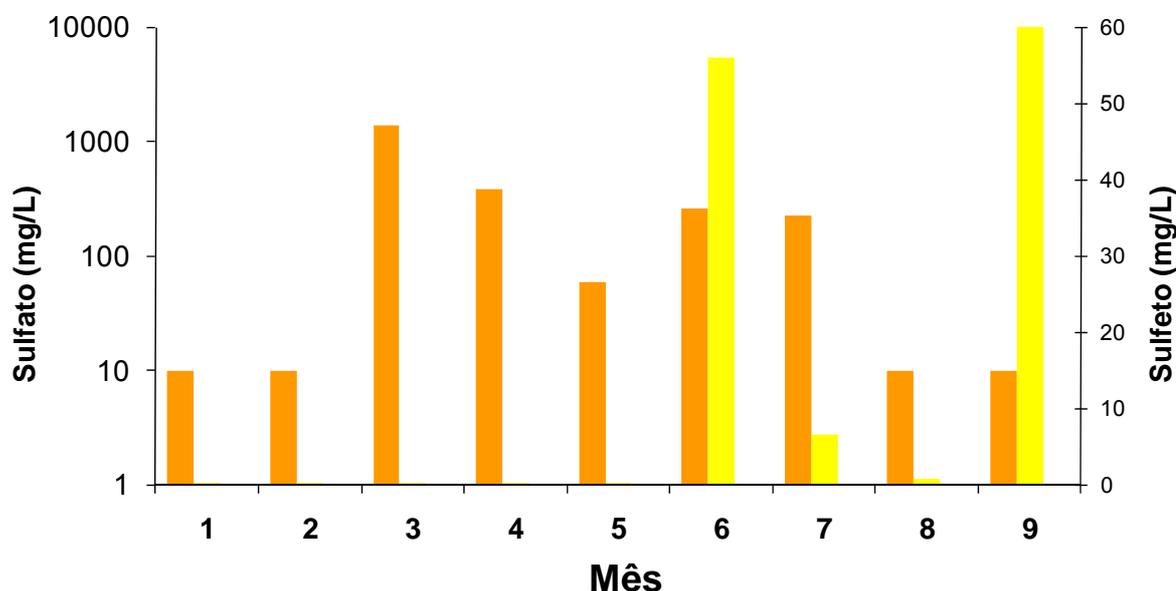


Figura 14 - Monitoramento mensal das concentrações de sulfato e sulfeto no tanque amarelo.

O sulfeto instantâneo confirmou não ser tão eficiente para validar a relação entre o perfil de BRS, BANHT, a quantidade de sulfato disponível para redução e conseqüente liberação de sulfeto. Seria mais interessante se esta liberação de sulfeto pudesse ser acompanhada de maneira contínua, avaliando-se assim o potencial metabólico das BRS em cada uma das coletas. Dessa forma, durante um determinado período, se teria medidas cumulativas de sulfeto que permitiriam avaliar o potencial gerador de sulfetos biogênicos, indicando a real atividade do consórcio microbiano. Sabe-se que uma maior concentração de BRS não é condição fundamental para uma grande geração de sulfeto, pois é necessário avaliar a taxa de formação de sulfeto destas bactérias, que, apesar de presentes numa concentração elevada, podem estar metabolicamente comprometidas para a geração de sulfetos. É possível encontrar grandes concentrações de BRS com baixo potencial de geração de sulfeto e concentrações menores com uma elevada atividade metabólica. As condições ambientais do meio em que as espécies microbianas se encontram é que ditarão as condições de geração de sulfeto. Portanto, uma avaliação metabólica contínua poderia elucidar o verdadeiro perfil do

potencial gerador de sulfeto das BRS encontradas em cada uma destas coletas e provavelmente melhor explicar as relações entre BRS, BANHT, sulfeto e sulfato.

3.9.2 Tanque Cinza

A Figura 15 apresenta o perfil ao longo do monitoramento das concentrações de BRS e BANHT para o tanque cinza. Este tanque suplantou o valor para uma tomada de decisão três vezes para BRS e duas vezes para BANHT, o que o classificou como o segundo pior do monitoramento, sendo, portanto, um dos menos adequados para o armazenamento de água. Assim como no tanque amarelo, as BRS e BANHT foram quantificadas em todas as amostras, mas diferentemente do primeiro tanque, as BRS cresceram em maior quantidade que as BANHT em praticamente 80% das coletas. Isto mostra que para o tanque cinza, provavelmente, as populações de BRS não necessitaram de populações elevadas de BANHT para o seu estabelecimento. Neste caso, as suposições utilizadas no item anterior para esta relação entre as concentrações de BRS/BANHT são cabíveis novamente.

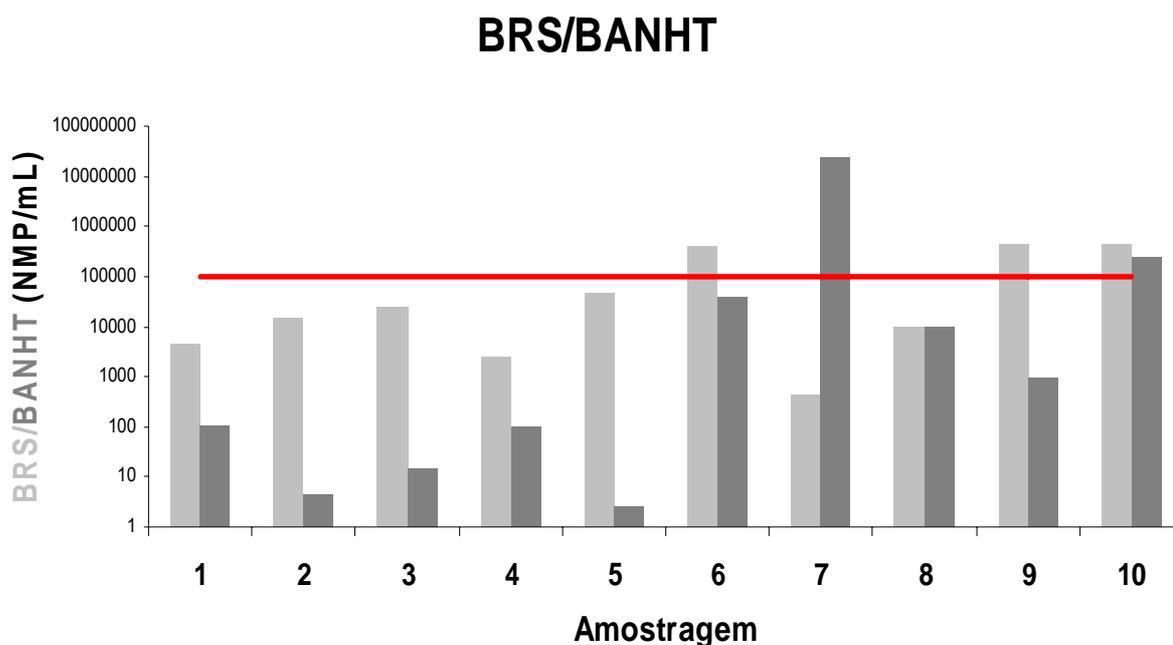


Figura 15 - Monitoramento mensal das concentrações de BRS e BANHT no tanque cinza.

O perfil das concentrações de sulfato e sulfeto ao longo do monitoramento é mostrado na Figura 16. Pode-se observar que em três coletas a concentração de sulfato foi maior que 10 mg/L, sendo o seu maior valor obtido na coleta 4. Entretanto, de maneira geral, é correto afirmar que o tanque cinza possui, mesmo que em baixas concentrações em algumas amostragens, sulfato disponível para redução pelas BRS. Talvez esta baixa disponibilidade reflita-se na baixa geração de sulfeto em seis das oito quantificações realizadas, mas como era de se esperar da relação entre os parâmetros, a maior concentração de sulfeto instantâneo ocorreu justamente quando houve a maior concentração de sulfato de todo o monitoramento. Em contrapartida, para concentrações de sulfato menores que esta, mas acima do limite de quantificação (coletas 1 e 3), o sulfeto gerado pelas BRS está em baixa concentração. Estas afirmações indicam que de maneira geral as populações de BRS existentes no tanque cinza possuem uma baixa atividade metabólica, pois as concentrações de BRS estiveram em média maior que 10^4 NMP/mL, mas a geração de sulfeto só pôde ser considerável na coleta 4.

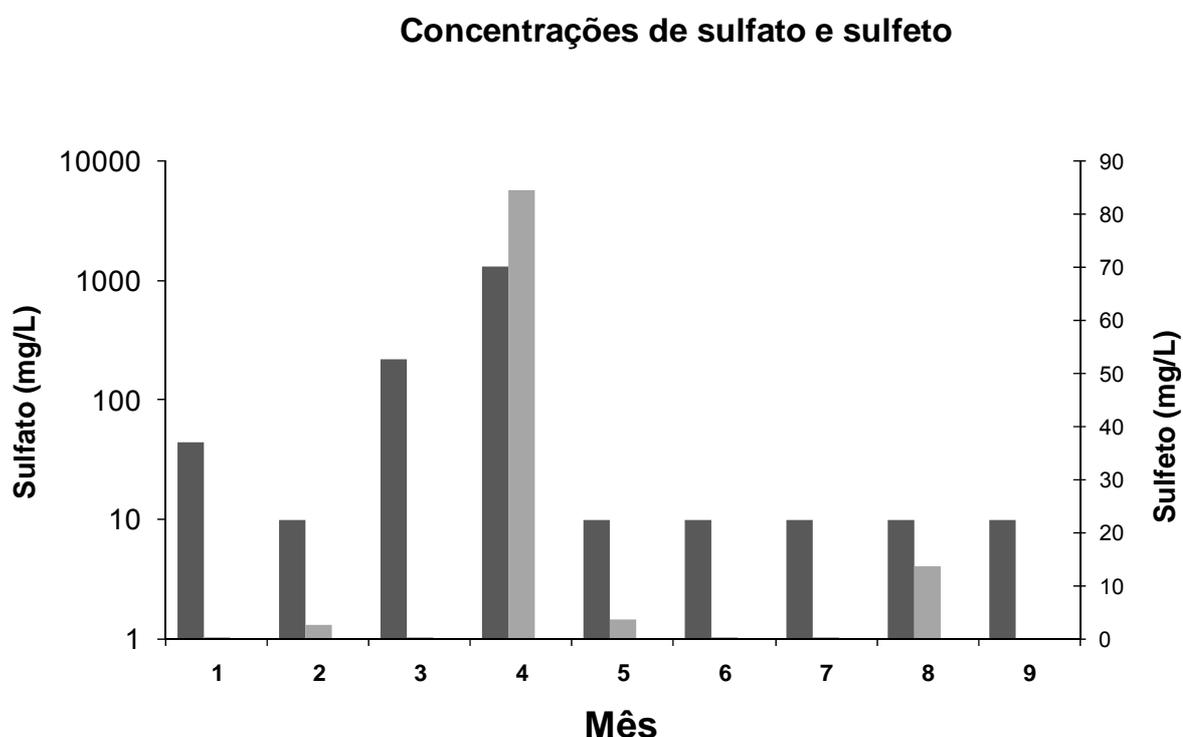


Figura 16 - Monitoramento mensal das concentrações de sulfato e sulfeto no tanque cinza.

3.9.3 Tanque Roxo

Continuando a discussão sobre a inter-relação entre os parâmetros monitorados, agora será observado se as relações entre eles foram respeitadas para os dois tanques considerados os “mais limpos” do monitoramento. O perfil das concentrações de BRS e BANHT para o tanque roxo pode ser visualizado na Figura 17. Pode-se observar que o tanque roxo foi acompanhado, em um número inferior de coletas em comparação com os outros dois tanques apresentados, e que excepcionalmente na coleta 2 não foram encontradas populações de BRS e BANHT, quantificáveis. Mas, numa análise global da figura, as populações de BRS estiveram na maioria das coletas entre 10^3 e 10^4 NMP/mL, indicando que o tanque roxo possuía ambiente favorável para o estabelecimento deste grupo bacteriano. Para corroborar esta afirmação, as BANHT também foram quantificadas em todas as coletas onde houve presença de BRS, e assim como no tanque cinza, para as quatro coletas iniciais em concentrações menores que as de BRS.

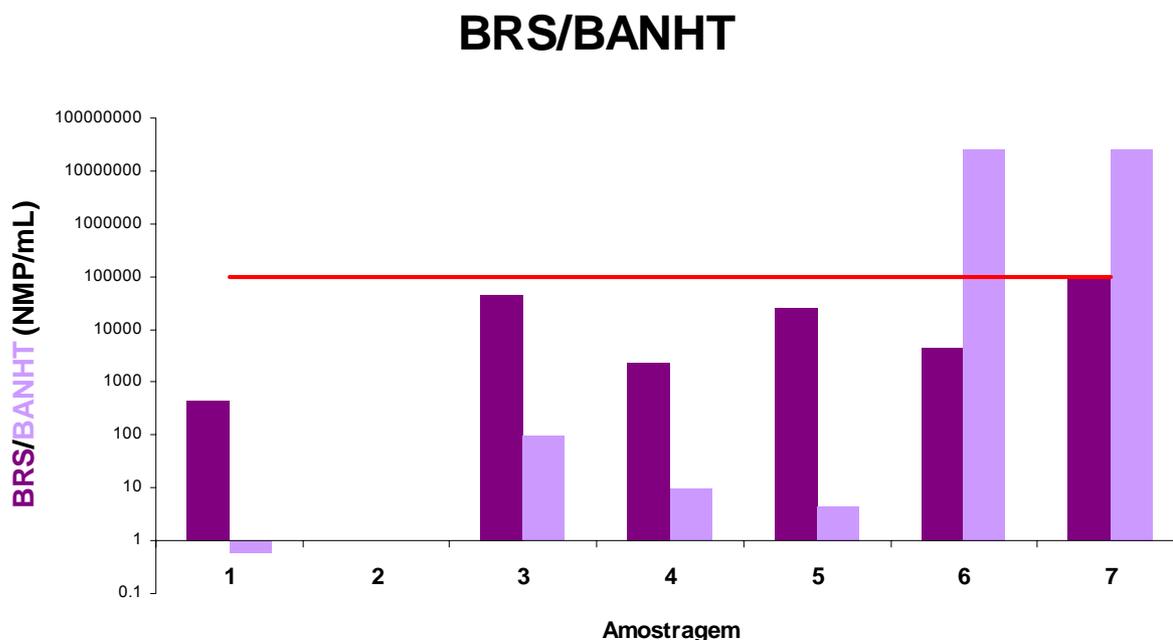


Figura 17 - Monitoramento mensal das concentrações de BRS e BANHT no tanque roxo.

Nas duas ultimas coletas, as BANHT cresceram aproximadamente mil vezes mais que as BRS, mostrando que para o tanque roxo não foi possível estabelecer que tipo de relação existe entre as concentrações de BRS e BANHT.

O perfil das concentrações de sulfato e sulfeto para o tanque roxo está representado na Figura 18. A visualização deste comportamento é interessante para observar porque o tanque roxo foi considerado o melhor tanque do monitoramento. A disponibilidade de sulfato neste tanque não pode ser considerada alta, mas é correto afirmar que, mesmo em baixa concentração, há sulfato disponível para redução pelas BRS, mas a geração de sulfeto instantâneo, no geral, foi baixa. Este fato torna correto afirmar que este grupo de BRS presentes no tanque roxo possui uma baixa atividade metabólica. Somente na coleta 5 houve uma geração de sulfeto considerável, coleta esta onde a concentração de BRS foi de 10^4 NMP/mL e a concentração de BANHT foi uma das menores obtidas.

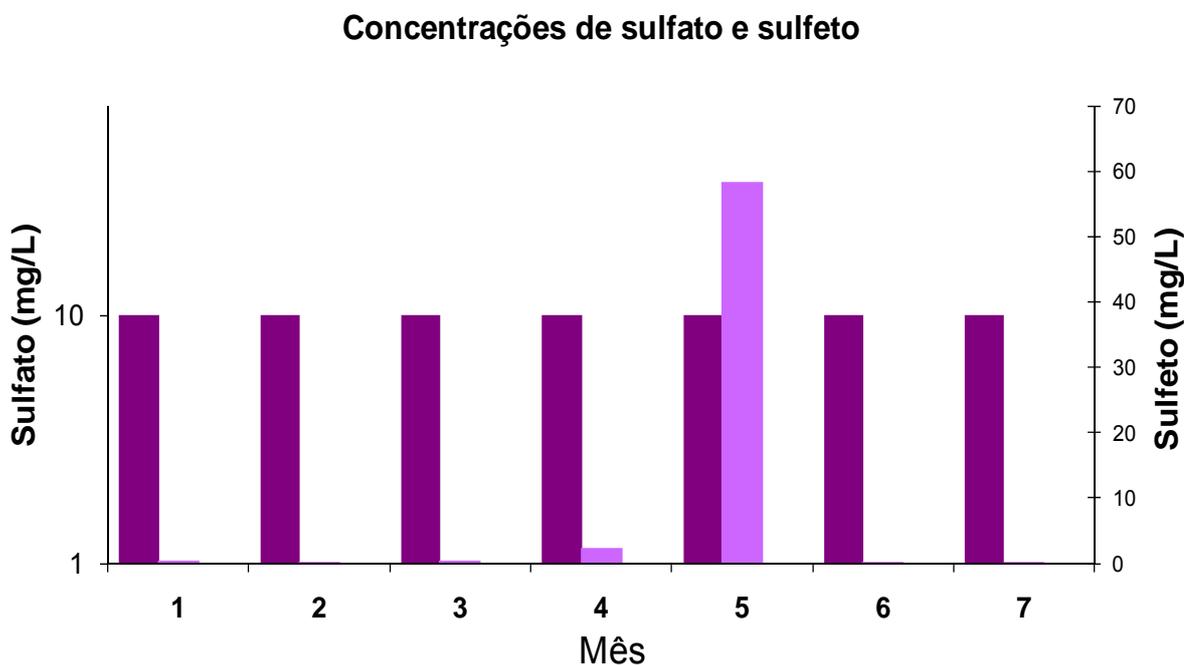


Figura 18 - Monitoramento mensal das concentrações de sulfato e sulfeto no tanque roxo.

3.9.4 Tanque Ciano

O tanque ciano foi classificado como o segundo melhor tanque do monitoramento justamente por apresentar bons resultados com relação às concentrações de BANHT e sulfeto. Observa-se na Figura 19 que o tanque ciano apresentou concentrações de BRS e BANHT acima do limite de 10^5 NMP/mL somente em uma coleta, corroborando a afirmação de ser um dos melhores tanques do monitoramento. Na grande maioria das coletas a concentração de BRS foi menor que as de BANHT e somente na coleta 6 esta relação não foi confirmada. Isto indica que assim como no tanque cinza, provavelmente as BRS não necessitam de quantidades muito elevadas de BANHT para o se estabelecer, o que torna apropriado mais uma vez as suposições para o metabolismo de BRS e BANHT utilizadas pro tanque amarelo. De maneira geral, o tanque ciano encontra-se contaminado com BRS que, teoricamente, não apresentam um grande potencial metabólico gerador de sulfeto.

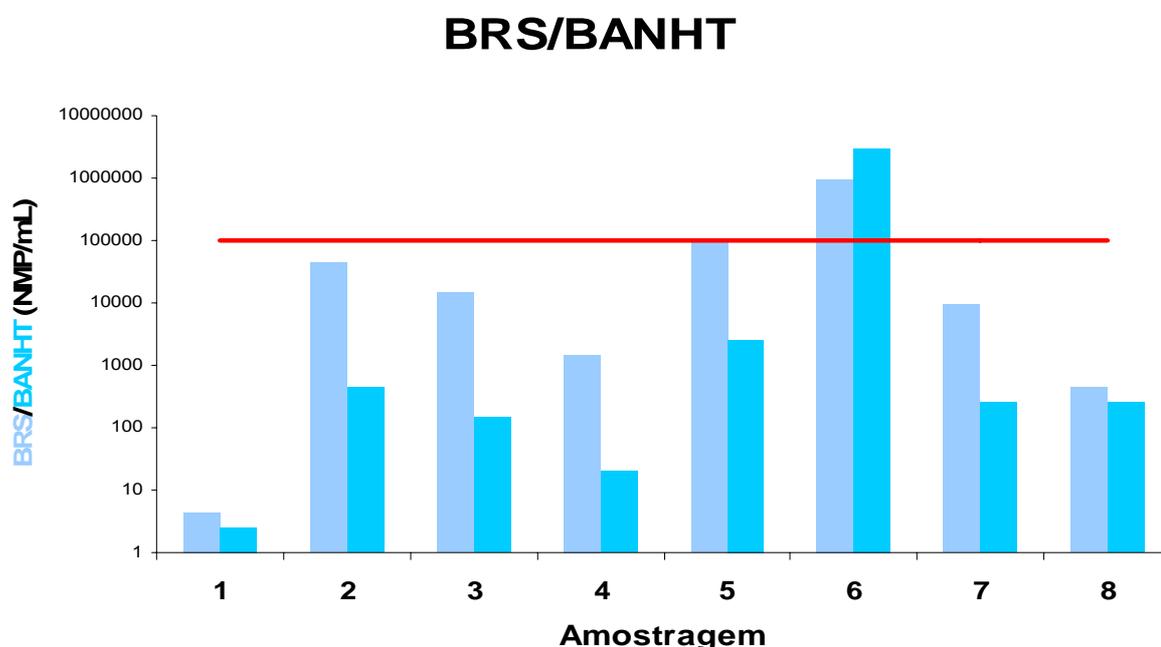


Figura 19 - Monitoramento mensal das concentrações de BRS e BANHT no tanque ciano.

A Figura 20 apresenta o perfil das concentrações de sulfato e sulfeto para o tanque ciano ao longo do monitoramento. Pode-se observar que nas coletas 4, 5 e 6 obtiveram-se as maiores concentrações de sulfato neste tanque. Nas coletas 4 e 5, especificamente, ocorreram as duas maiores concentrações de sulfeto nas amostras coletadas. Na coleta 5, a concentração de BRS esteve próxima de 10^5 NMP/mL, uma das mais altas para este tanque, mas na coleta 4, as BRS presentes em concentração de aproximadamente 10^3 NMP/mL geraram a maior concentração de sulfeto obtida.

De uma forma geral, o que se observou é que a correlação dos parâmetros microbiológicos com as concentrações de sulfato e sulfeto instantâneo, não se mostrou uniforme para todos os tanques. Dessa forma, surgiu a necessidade de se estabelecer um novo parâmetro de comparação que corroborasse as relações. Esse parâmetro selecionado foi a medida da atividade geradora de sulfetos ao longo do tempo.

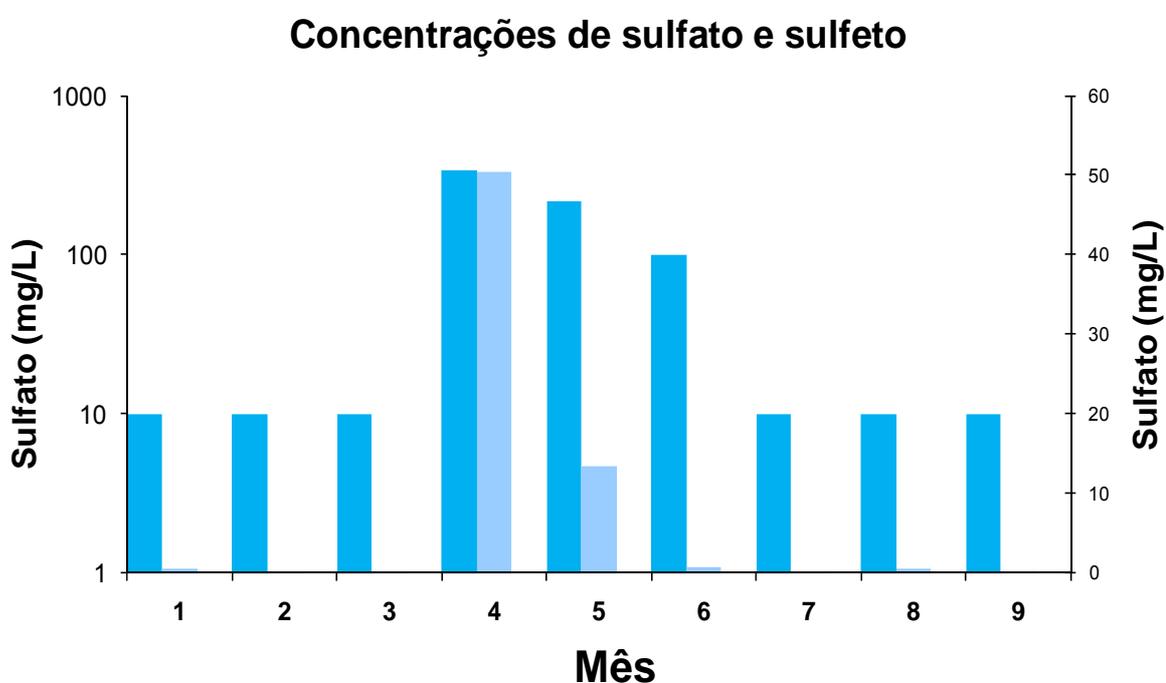


Figura 20 - Monitoramento mensal das concentrações de sulfato e sulfeto no tanque ciano.

3.10 Avaliação da Atividade Metabólica Contínua (AMC) de amostras dos tanques classificados

Nas discussões anteriores, mostrou-se que a correlação entre os quatro principais parâmetros não foi tão bem elucidada em função de um dos parâmetros não ser o mais apropriado para tal: **o sulfeto instantâneo**. O sulfeto instantâneo está solúvel na amostra e pode ser de origem microbiana ou não, visto que estes tanques de armazenamento em determinados momentos recebem carga que não são compostas somente por água de formação, injeção ou óleo. Além do mais, o sulfeto formado por via microbiana pode também ser enviado para o ambiente sob a forma de H_2S , o que ajuda a mascarar a verdadeira concentração de sulfeto formada pelas BRS presentes no interior dos tanques. Portanto, chegou-se à conclusão de que talvez uma avaliação da atividade metabólica contínua (AMC) fosse ideal para compreender qual o verdadeiro potencial destas bactérias em formar o seu metabólito (sulfeto). Como seria muito complicado realizar este posterior estudo para todas as amostras coletadas, optou-se por realizar somente para as amostras estocadas em geladeira dos tanques previamente classificados como “melhores” e “piores” do monitoramento. Assim, se poderia verificar se a produção acumulada de sulfeto pelas BRS presentes nas amostras indicaria o verdadeiro potencial metabólico destas bactérias, sendo útil também para justificar a classificação dos tanques.

Para cada um dos quatro tanques foram selecionadas as amostras com a menor e maior concentração de BRS obtidas, para que se verificasse a atividade metabólica de populações altas e baixas de um mesmo tanque e se estas atividades confirmariam as classificações realizadas. As atividades foram compostas pelas medidas do sulfeto biogênico acumulado num período de incubação de quinze dias.

3.10.1 AMC para o tanque amarelo

A Figura 21 apresenta o perfil de produção de sulfeto para a amostra 4 do tanque amarelo, a amostra que apresentou a menor concentração de BRS para este tanque em todo o monitoramento.

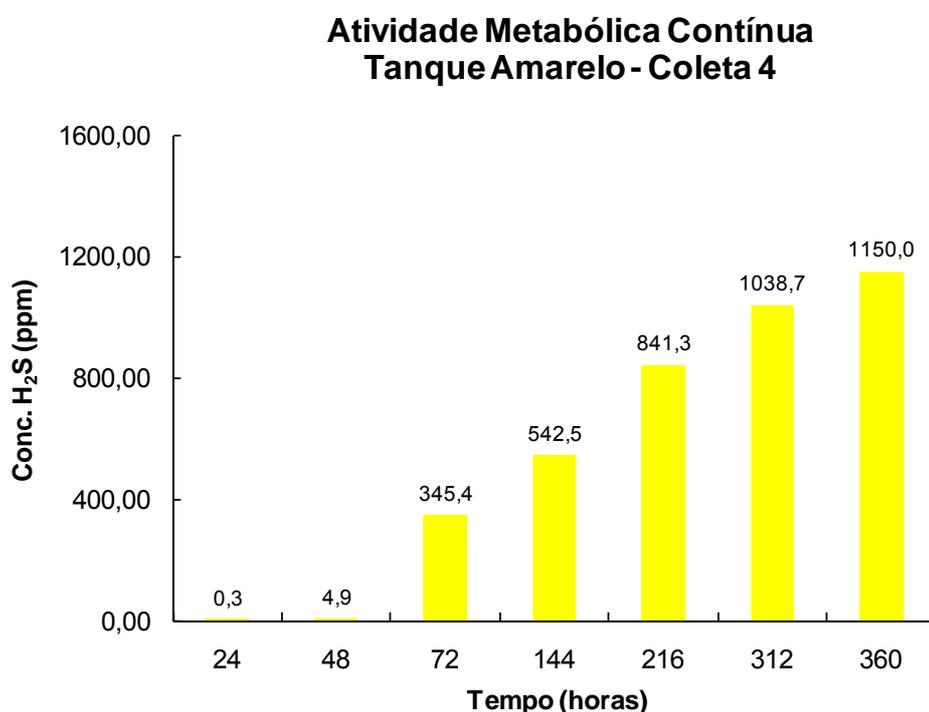


Figura 21 – Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a menor concentração de BRS obtida (amostra 4 - 7,5 NMP/mL) do tanque amarelo.

Pode-se observar que o sulfeto só começa a ser considerável a partir de 72 horas de incubação, e, pode-se dizer que este período corresponde à fase *lag*, que é um período de adaptação do micro-organismo com pouca geração de metabólitos. Quando uma população microbiana é inoculada em um novo meio de cultura o seu crescimento normalmente não ocorre de imediato (MADIGAN *et al.*, 2004). A visualização da fase *lag* é interessante para que se entenda porque o sulfeto instantâneo não é um parâmetro adequado a ser correlacionado com as concentrações de BRS, BANHT e sulfato.

Após a fase *lag*, pode-se observar a crescente formação de sulfeto pelo metabolismo das BRS inoculadas no meio de cultura. Como este sulfeto é retirado do meio para ser quantificado com intervalos de tempo regulares, o efeito tóxico deste metabólito foi minimizado e a redução do sulfato do meio pelas BRS facilitada. A primeira quantificação de sulfeto realizada atingiu uma concentração de 345 mg/L, indicando um bom potencial gerador de sulfeto pelas BRS da amostra 4 nos dias iniciais do teste. Esse primeiro “salto” na formação de sulfeto é característico de uma elevada taxa de formação, podendo-se observar que as leituras de 144 e 216 horas apresentaram um caráter linear crescente. Após 216 horas observou-se novamente um “salto” na formação de sulfeto, mostrando que as BRS ainda poderiam elevar as suas taxas de formação novamente e depois atingiram a sua concentração máxima próxima de 1150 mg/L de sulfeto. É difícil encontrar na literatura publicações em que se avaliam AMC de grupos de BRS, e mais difícil ainda quando este tipo de metodologia está associada a um monitoramento. Penna *et al.* (2003) avaliaram à 35°C durante 28 dias a AMC de quatro diferentes inóculos de culturas mistas em meios de cultura preparados com diferentes percentuais de água de formação do campo de Marlim sintética e água do mar sintética. O maior valor de concentração de H₂S obtida com o melhor percentual da mistura no preparo do meio foi de 220 mg/L para uma das culturas mistas de m-BRS em 28 dias. Apesar de não ser informada a concentração de BRS nos meios testados, este valor é útil para mostrar que as BRS presentes na coleta 4 do tanque amarelo foram mais ativas metabolicamente, pois geraram mais que o dobro desta concentração em 144 horas, sendo sua concentração máxima de sulfeto seis vezes maior que a obtida neste trabalho e alcançada em menor tempo. Esta comparação é interessante porque começa a mostrar que as BRS do tanque amarelo possuem alto potencial metabólico gerador de sulfetos.

Com base na premissa anteriormente apresentada, na Figura 22 está representada a AMC para a amostra 6 do tanque amarelo, amostra esta constituída por uma concentração de BRS em torno de 10⁵ NMP/mL e que forneceu a maior concentração de sulfeto instantâneo para este tanque. Já foi comentado que este sulfeto pode ser originário de outra fonte que não seja microbiana, então a visualização desta AMC é importante para que se verifique se o alto potencial metabólico das BRS presentes no tanque amarelo, e inicialmente já observada para

a amostra com menor concentração de BRS, também é verificada para a maior concentração de BRS obtida.

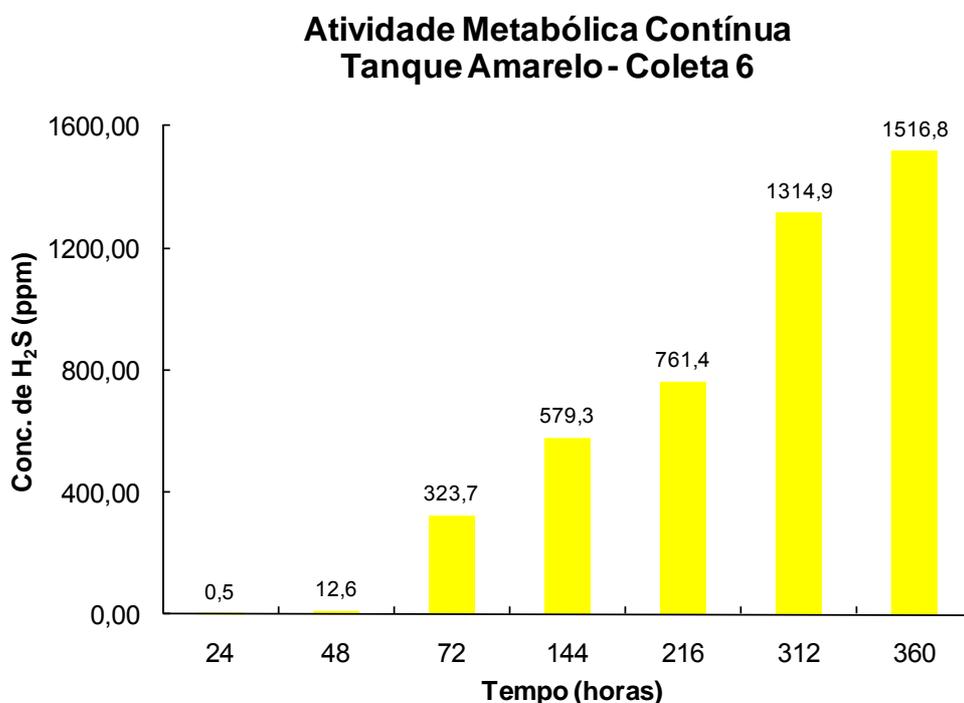


Figura 22 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a maior concentração de BRS obtida (amostra 6 – $2,5 \times 10^5$ NMP/mL) do tanque amarelo.

A fase *lag* pôde ser visualizada novamente para a amostra 6, já que o sulfeto só começa ser considerável com 72 horas de incubação. De maneira geral, o perfil da AMC para a amostra 6 foi semelhante ao da amostra 4. Houve com 72 horas o mesmo “salto” apresentado na AMC da amostra 4, e novamente uma concentração de sulfeto gerada próxima de 350 mg/L nos três primeiros dias de incubação. A geração de sulfeto foi crescente em toda a avaliação e este comportamento é compatível com uma amostra onde BRS com alto potencial metabólico estão presentes. Como era de se esperar, esta elevada concentração de BRS no tanque considerado mais sujo do monitoramento gerou uma concentração final de sulfeto acima de 1500 mg/L, a maior alcançada para todas as AMC testadas.

Através das amostras 4 e 6 foi possível observar o perfil gerador de sulfeto do grupo de BRS presente nestas duas amostras e assim efetivamente afirmar que o tanque amarelo não possui somente parâmetros com valores acima dos limites

estabelecidos no monitoramento, mas possui também BRS com alta atividade metabólica. Isto implica num grande potencial gerador de sulfeto no interior dos tanques, onde já foi verificado que há sulfato disponível e BRS em elevadas concentrações. Estas afirmações são úteis porque auxiliam na confirmação da classificação dos tanques, que em virtude de um parâmetro não muito adequado, tornou-se comprometida.

3.10.2 AMC para o tanque cinza

O tanque cinza foi classificado como o segundo pior tanque do monitoramento, e a visualização das AMC de duas de suas amostras pode ser importante para corroborar esta classificação. É de se esperar que este tanque apresente também BRS com um alto potencial metabólico, mas em escala menor que o tanque amarelo, visto que este tanque foi considerado o pior dentre todos os monitorados.

Na Figura 23 pode-se observar a AMC da amostra com a menor concentração de BRS obtida para o tanque cinza, concentração esta em torno de 10^2 NMP/mL (amostra 7). Mais uma vez, o sulfeto somente pôde ser quantificado após 72 horas de incubação, mas diferentemente dos AMC para o tanque amarelo, não houve um “salto” na concentração de sulfeto de 48 para 72 horas.

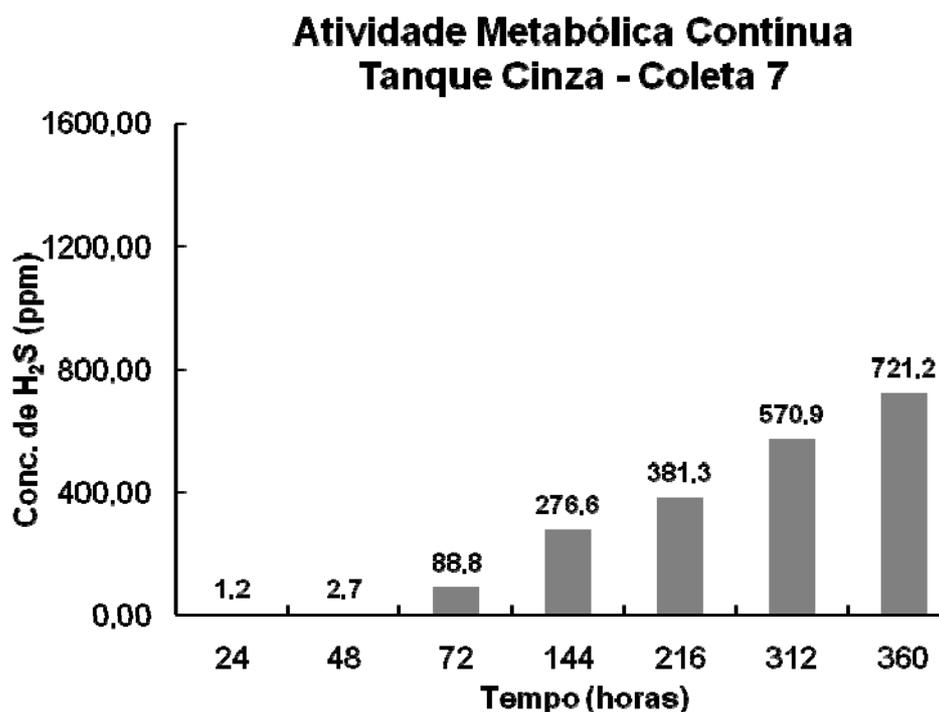


Figura 23 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a menor concentração de BRS obtida (amostra 7 – $4,5 \times 10^2$ NMP/mL) do tanque cinza.

Isto pode ser explicado pelo fato do inóculo ser constituído por bactérias que possuem uma atividade metabólica menor que aquelas presentes no tanque amarelo e mesmo estando em uma concentração numa ordem dez vezes maior, a produção de sulfeto acumulada manteve-se menor que para a amostra análoga do tanque amarelo. Esta diferença na atividade pode ser visualizada numa comparação entre os perfis destas curvas.

Na amostra com a menor concentração de BRS para o tanque amarelo, com 72 horas a concentração de sulfeto quantificada foi próxima de 400 mg/L, enquanto que as bactérias presentes na amostra 7 do tanque cinza atingem esta proximidade com 216 horas de incubação. Apesar desta diferença, a produção de sulfeto observada foi crescente e atingiu uma concentração final próxima de 800 mg/L de sulfeto, indicando um bom potencial formador deste metabolito por estas BRS.

A Figura 24 apresenta a AMC para a amostra que apresentou a maior concentração de BRS para o tanque cinza (amostra 6).

Atividade Metabólica Contínua Tanque Cinza - Coleta 6

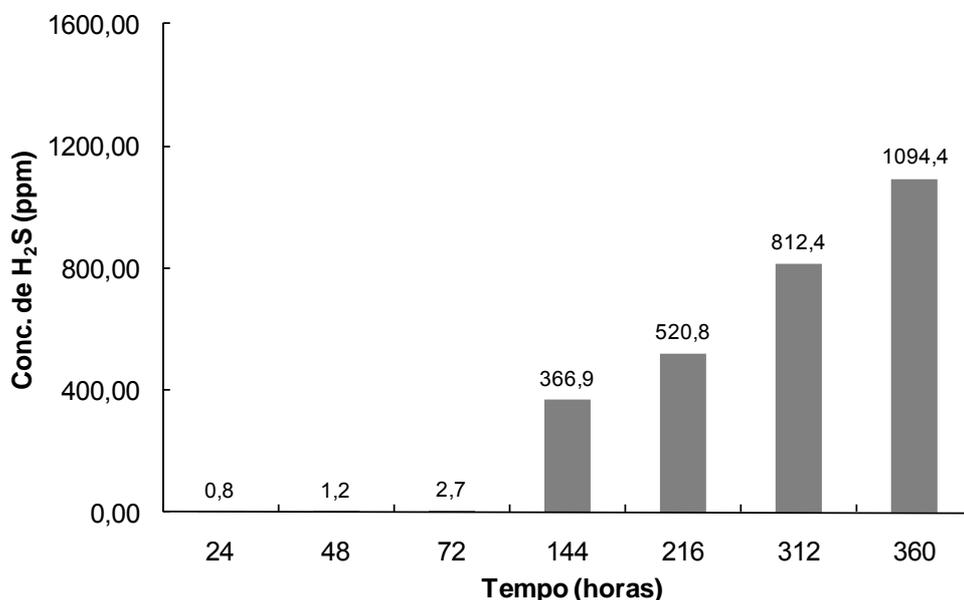


Figura 24 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a maior concentração de BRS obtida (amostra 6 – $4,0 \times 10^5$ NMP/mL) do tanque cinza.

A concentração de BRS nesta amostra foi ligeiramente acima de 10^5 NMP/mL, a mesma concentração obtida na amostra análoga do tanque amarelo. Entretanto, sabe-se que as bactérias do tanque cinza são metabolicamente menos ativas que as do tanque amarelo. Portanto, como era de se esperar, apesar de possuírem praticamente a mesma concentração, o perfil de formação de sulfeto foi distinto. Analisando-se a Figura 24, observa-se que dentre as AMC apresentadas até agora, a da amostra 6 do tanque cinza diferencia-se das outras pelo fato do sulfeto em concentração considerável somente ocorrer a partir de 144 horas, ou seja, 72 horas a mais que nas outras AMC apresentadas. Todavia, apesar desta “demora” na produção de sulfeto pelas BRS, assim que ele tornou-se quantificável a produção torna-se crescente. Obviamente, em menor escala que para o tanque amarelo, mas significativamente maior que a amostra com menor concentração do mesmo tanque.

O perfil da curva de AMC apresentada na Figura 24 mostrou-se bastante similar ao da amostra com menor concentração de BRS para o tanque cinza, apesar da diferença no tempo de geração de sulfeto quantificável já comentado. Mas,

apesar da semelhança, foi confirmada a hipótese de que avaliando-se amostras, provavelmente com a mesma população de BRS, aquela em que a concentração estiver maior apresentará uma maior formação de sulfeto. Portanto, a amostra 6 obteve uma concentração máxima final de sulfeto próxima de 1100 mg/L, concentração final esta maior que a amostra 7 (que possuía menos BRS) e semelhante a amostra com menor concentração de BRS do tanque amarelo, mas que possuía uma atividade metabólica comprovadamente maior.

Os perfis da AMC para o tanque cinza e as comparações com o tanque amarelo, que junto com este tanque fazem parte do grupo dos mais contaminados, foram importantes porque ao se fazer estas comparações, pode-se observar que o sulfeto instantâneo realmente não foi o parâmetro mais adequado para se elucidar o mecanismo de formação do sulfeto presente nas amostras. Mas estes AMC foram úteis para corroborar estas classificações, pois foi mostrado que realmente a população de BRS presentes nestes tanques são metabolicamente bastante ativas e deram para esses tanques motivos para se preocupar com o comprometimento das suas estruturas e de suas cargas. Nos dois próximos itens será verificada se estas afirmações também foram válidas para os tanques considerados mais limpos.

3.10.3 AMC para o tanque ciano

Após a análise dos perfis de AMC para os tanques classificados como mais “sujos” do monitoramento e a visualização da importância destes AMC para corroborar a classificação, serão avaliados a seguir os perfis de AMC para os tanques mais classificados como mais “limpos”. Os resultados que aqui serão apresentados serviram para confirmar as hipóteses de que estes tanques devem possuir atividades metabólicas mais baixas que as dos tanques mais contaminados.

A Figura 25 apresenta o perfil da AMC para a menor concentração de BRS (10 NMP/L) do tanque ciano, tanque este classificado como o segundo tanque “mais limpo” do monitoramento. Pode-se observar mais uma vez a importância de se avaliar a produção acumulada de sulfeto ao longo do tempo frente ao sulfeto instantâneo, porque novamente o sulfeto só foi produzido a uma concentração

considerável após 144 horas de incubação. Esta constatação foi muito útil para entender porque o sulfeto instantâneo não releva o verdadeiro perfil de uma população de BRS presente em uma amostra de um tanque de armazenamento água/óleo. Após 144 horas, o sulfeto biogênico foi quantificado em todas as outras leituras, mas não foi produzido em concentrações elevadas. Em comparação com os tanque mais contaminados, por exemplo, o perfil da AMC para a concentração de BRS do tanque amarelo análoga a do tanque ciano, essa população produziu aproximadamente 350 mg/L de sulfeto em 72 horas. Esta mesma concentração de BRS no tanque ciano produziu em torno de 380 mg/L somente na última leitura realizada, com 360 horas de incubação, como pôde ser visto na Figura 25.

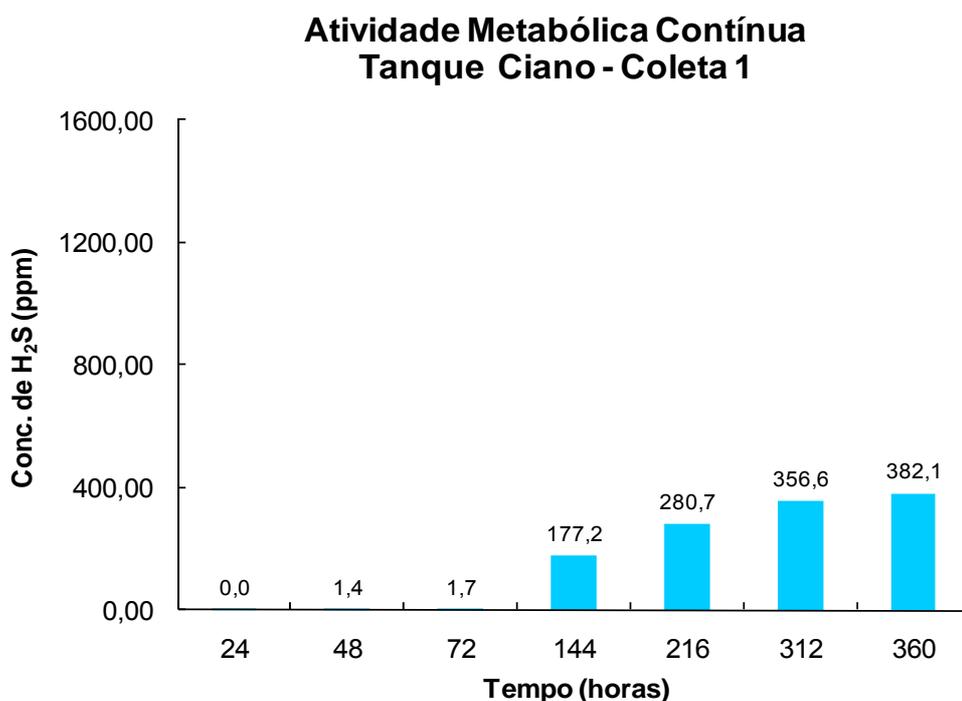


Figura 25 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a menor concentração de BRS obtida (amostra 1 - 4,5 NMP/mL) do tanque ciano.

Na Figura 26 pode-se visualizar o perfil de AMC para a maior concentração de BRS (10⁵ NMP/mL) obtida para o tanque ciano. Assim como foi comentado para a figura 1, o sulfeto também só começou a ser gerado com 144 horas de incubação, o que pode indicar uma característica do grupo de BRS presentes nas amostras do tanque ciano. Como esta população estava presente em maior concentração, não foi

uma novidade o fato de esta curva apresentar uma atividade maior que a anterior para este tanque. De acordo com a Figura 26, a produção de sulfeto foi crescente após as 144 horas, mas parecia que se estabilizaria quando foi realizada a seqüente medição de 216 horas. Esta suposição não ocorreu e as duas últimas medidas realizadas indicaram um aumento nas concentrações de sulfeto gerados e a concentração máxima obtida foi em torno de 600 mg/L.

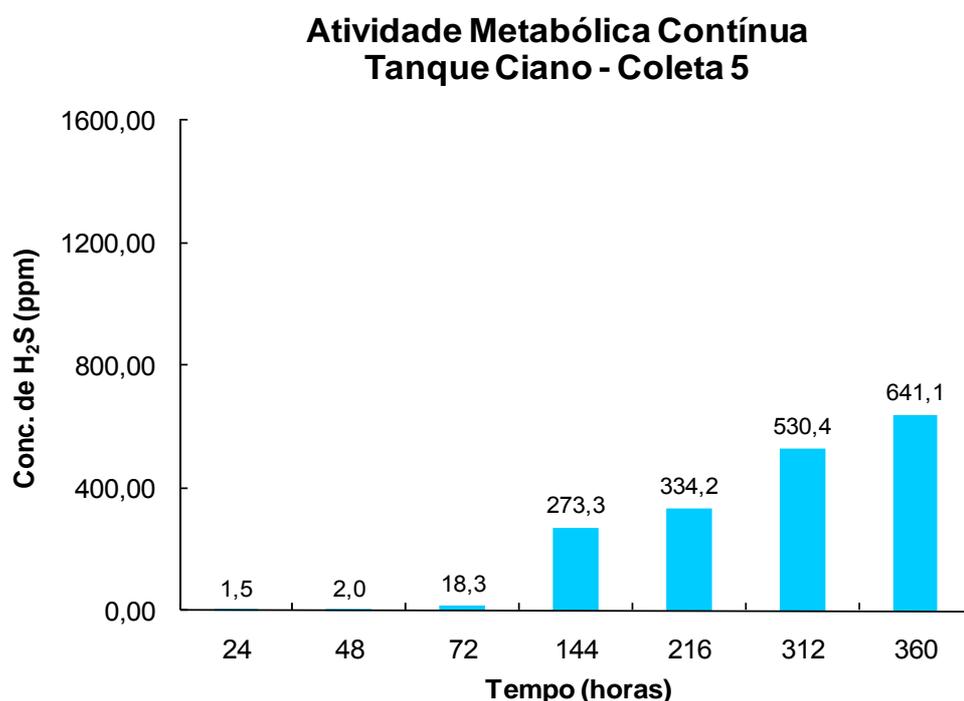


Figura 26 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a maior concentração de BRS obtida (amostra 5 – $9,5 \times 10^4$ NMP/mL) do tanque ciano.

Fazendo-se uma comparação entre as concentrações equivalentes de BRS como a que foi obtida este perfil de AMC apresentado na Figura 26 (10^5 NMP/mL), os tanques amarelo e cinza produziram concentrações de sulfeto próximas de 600 mg/L (a concentração máxima obtida para o tanque ciano com 360 horas de incubação) em 144 e 216 horas, respectivamente.

3.10.4 AMC para o tanque roxo

O tanque roxo foi o tanque que apresentou a maior qualidade frente a todos os parâmetros monitorados, apresentando os melhores resultados tanto para concentração de BRS como para concentração de sulfeto em suas amostras. A Figura 27 apresenta então a curva da AMC para a amostra com a menor concentração de BRS para este tanque, com uma concentração próxima de 1000 NMP/mL. Para um tanque que possui o melhor histórico, é de se esperar que as BRS presentes em suas amostras possuam um perfil metabólico com características não muito elevadas.

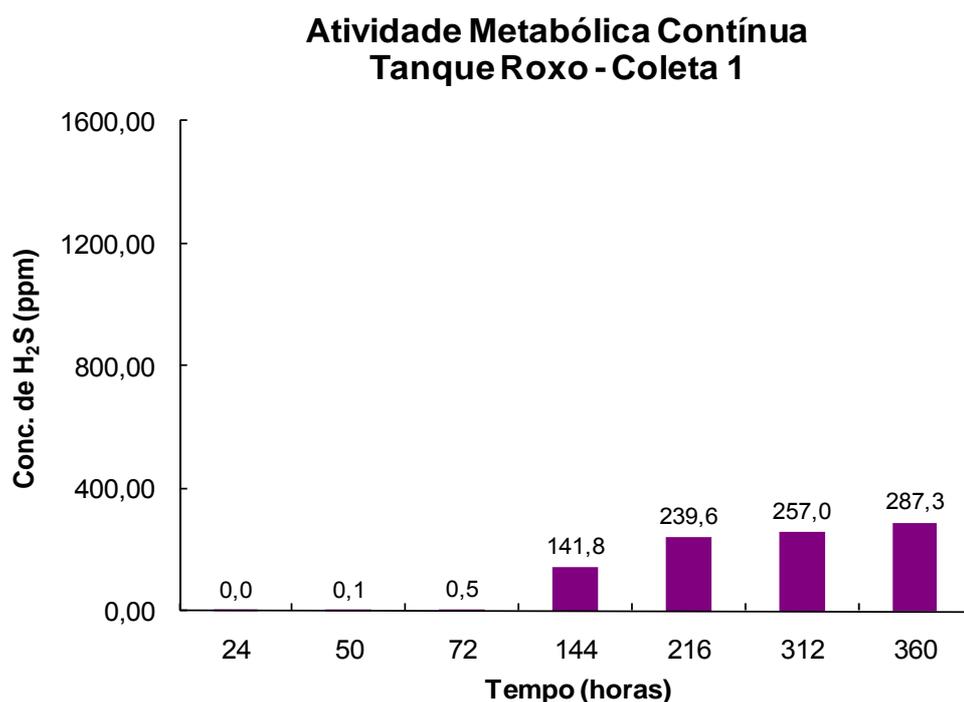


Figura 28 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a menor concentração de BRS obtida (amostra 1 – $4,5 \times 10^2$ NMP/mL) do tanque ciano.

Assim como foi observado principalmente no tanque ciano, o sulfeto biogênico só foi quantificável a partir das 144 horas. Pelo perfil da curva nota-se uma produção de sulfeto que se eleva com 216 horas, mas aparenta tornar-se constante nas duas

ultimas medições realizadas. Este comportamento está de acordo com um grupo de BRS metabolicamente não muito ativas. Apesar do perfil crescente de produção de sulfeto, a concentração máxima de sulfeto produzido observada na Figura 28 foi obtida com 360 horas de incubação. Esta concentração máxima ficou em torno de 300 mg/L de sulfeto, ligeiramente menor que a concentração máxima observada para a amostra com a menor concentração de BRS do tanque ciano. Mas esta amostra do tanque ciano possuía uma concentração cem vezes menor em relação a esta do tanque roxo. E, comparando com a amostra equivalente dos tanques ciano e amarelo, esta concentração máxima de 300 mg/L de sulfeto foram alcançadas com 72 e 216 horas, respectivamente. O que demonstra claramente que estes tanques realmente possuem BRS com atividades metabólicas bastante elevadas, e que este sim é o parâmetro mais adequado a ser avaliado.

Assim como foi feito pra todos os outros três tanques, a AMC para a amostra com a maior concentração de BRS do tanque roxo está representada na Figura 29.

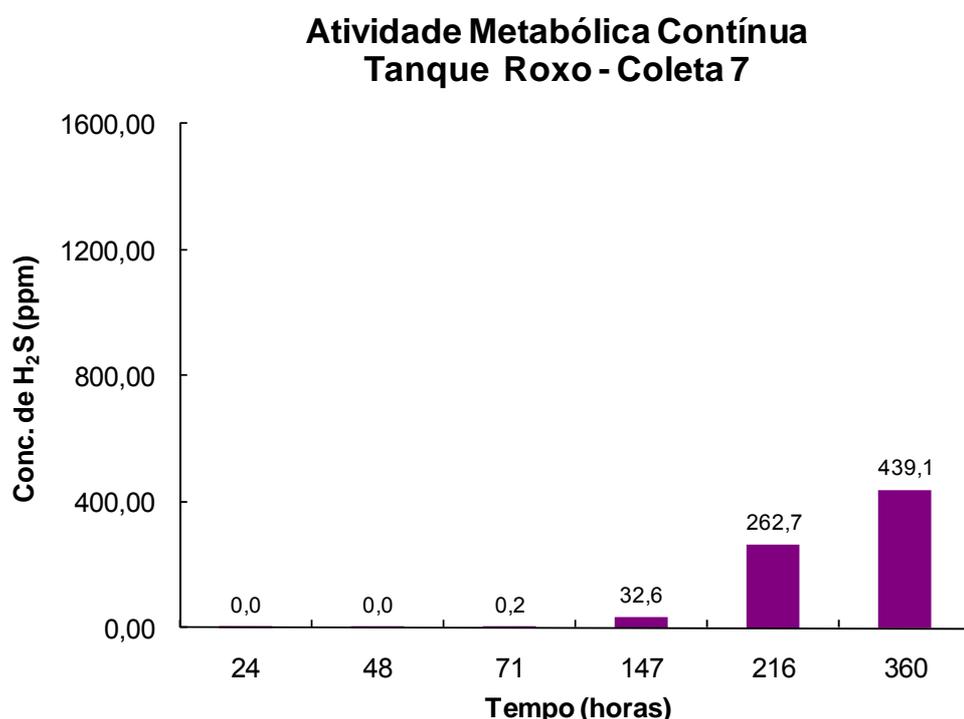


Figura 29 - Produção de H₂S acumulada ao longo de 15 dias para a maior concentração de BRS obtida (amostra 7 – $9,5 \times 10^4$ NMP/mL) do tanque ciano.

A amostra 7 possuía uma concentração de BRS de 10^5 NMP/mL, e o fato de possuir mais bactérias que a amostra da Figura 28 indica que o seu perfil metabólico será ligeiramente maior que este primeiro, mas menor que os dos tanques mais contaminados. Pode-se observar que a produção de sulfeto quantificável iniciou-se discretamente com 144 horas, desempenho considerado normal para um grupo de bactérias com atividade metabólica. Houve uma quantificação maior com 216 horas, indicando o perfil de produção crescente que foi observado para todos os tanques. Na última leitura, com 360 horas, as BRS da amostra 7 do tanque roxo produziram a maior concentração de sulfeto, ligeiramente acima de 400 mg/L. quando comparado aos outros tanques que tiveram amostras avaliadas com a mesma concentração de BRS, pode-se concluir finalmente que a AMC é melhor parâmetro que o sulfeto instantâneo.

4 CONCLUSÕES

Os parâmetros monitorados foram úteis para classificar os sete tanques em tanques mais “limpos” e tanques mais “sujos”, o que permite distinguir qual(ais) tanque(s) devem ter sua operação paralisada para uma eventual limpeza.

Os dois tanques classificados como mais “limpos” do monitoramento foram os tanques roxo e ciano.

Os dois tanques classificados como mais “sujos” de todo monitoramento foram os tanques amarelo e cinza.

Não foi possível verificar com clareza a correlação entre os quatro principais parâmetros que dão suporte ao metabolismo das BRS (concentrações de BRS, BANHT, sulfeto e sulfato) para as amostras dos tanques classificados. Principalmente devido uma fraca relação com a quantidade de sulfeto presente na amostra.

Como foi observado que o sulfeto instantâneo não foi o parâmetro mais adequado para se avaliar o poder corrosivo das amostras, foram selecionadas as amostras com maior e menor concentração de BRS, para cada um dos quatro tanques previamente classificados, com a finalidade de se verificar o potencial metabólico das BRS presentes. A opção por este parâmetro se deu porque esperava-se que os tanques com sua estrutura mais comprometida apresentassem as maiores gerações de sulfeto pelas BRS presentes em suas amostras. O contrário desta premissa também se esperaria para os tanques menos comprometidos.

Como estas relações foram observadas utilizando-se este novo parâmetro (avaliação metabólica contínua), ele foi capaz de corroborar, com clareza, a classificação dos tanques previamente realizada.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN K.; LAL B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil–water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. *Anaerobe*, n.30, p. 1-7, 2009.

AHMADUNA F.; PENDASHTEHA A.; ABDULLAHA L. C.; BIAKA D. R. A.; MADAENIC S. S.; ABIDIN Z. Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. Separata de: *Journal of Hazardous Materials*, v.170, p.530–551, 2009.

AKAGI, J. R. Respiratory Sulfate Reduction. In: BARTON, L.L. *Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria*. New York: Plenum Press, 1995.

ALMEIDA, K. Y. M. *Efeito de Surfactantes na Estimativa da Densidade Bacteriana em Amostras de Petróleo*. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

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

APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20 ed, Washington, 1998.

BADER, M.S.H. Sulfate removal technologies for oil fields seawater injection operations. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 55, p. 93–110, 2007a.

BADER, M.S.H. Seawater versus produced water in oil-fields water injection operations. *Desalination*, v. 208, p. 159–168, 2007b.

BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 44, p. 139-152, 2003.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 181–186, 2004.

BIRKELAND, N. The microbial diversity of deep subsurface oil reservoirs. In: *Petroleum Biotechnology*. Netherlands: Elsevier, 2004. Chap. 14, p.385-404.

ÇAKMAKCEA, M.; KAYAALPB N.; KOYUNCU I. Desalination of produced water from oil production fields by membrane processes. *Desalination*, v.222, p.176–186, 2008.

CASTRO, H.F.; WILLIAMS, N.H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. MiniReview. *Ecology*,v.31, p.1-9, 2000.

CECA, DELIBERAÇÃO CECA/CN Nº 3.966 DE 16 DE JANEIRO DE 2001. Método de determinação de colônias de bactérias que precipitam o ferro (ferrobactérias), pela técnica "pour plate".

COSTELLO, J. A. Cathodic despolarization by sulfate-reducing bacteria. *Science*, v. 70, p. 202-204, 1974.

DOLLA, A.; FOURNIER, M.; DERMOUN, Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*, v.126, p. 87–100, 2006.

DUPONT-MORRAL, I. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, v.19, 2004.

EMERSON, D.; WEISS, J. V. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: findings from the field and the laboratory. *Geomicrobiology Journal*, v.21, p.405-414, 2004.

FARQUHAR, G.B. Review and Update of Technology Related to Formation Sourcing. *Corrosion*, v. 210, 1997.

FAUQUE, G. D. Ecology of sulfate-reducing bacteria. In: BARTON, L.L. *Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria*. New York: Plenum Press, 1995.

FORTIN, D.; LANGLEY, S. Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth-Science Reviews*, v.72, p. 1 –19, 2005.

GABARDO, I. T. *Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar*. 2007. 250 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

GENTIL, V. *Corrosão*. 4 ed. Rio de Janeiro: livros técnicos e Científicos Editora, 2003.

GONÇALVES, M. M. M. *Remoção de metais pesados de efluentes em biorreator anaeróbio empregando fontes de carbono alternativas*. 163f. 2001. Tese (Doutorado) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

HALBACH, M.; KOSCHINSKY, A.; HALBACH, P. Report on the Discovery of *Gallionella ferruginea* from an active Hydrothermal Field in the Deep Sea. *InterRidge News*, v.10, 2001.

HALLBERG, R.; FERRIS, F.G. Biomineralization by *Gallionella*. *Geomicrobiology Journal*, v. 21, p.325-330, 2004.

HAMILTON, W.A.; LEE, W.; Biocorrosion. In: BARTON, L.L. *Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria*. New York: Plenum Press, 1995 - p 132

KAUR , G.; MANDAL , A.K.; NIHLAN, M. C.; LAL B. Control of sulfidogenic bacteria in produced water from the Kathloni oilfield in northeast India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, p. 151–155, 2009.

KREKELER, D.; SIGALEVICH, P.; TESKE, A.; CYPIONKA, H.; COHEN, Y. Sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar lake (Sinai), *Desulfovibrio* sp. nov. *Archives of Microbiology* , v.167, p.369-375,1997.

LIMA, A. C. F. *Produção de sulfeto em reator tipo UASB e sua potencial aplicação na remoção de metais pesados e efluentes*. 1996. 108f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos de Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

LÜTTERS-CZEKALLA, S. Lithoautotrophic growth of the iron bacterium *Gallionella ferruginea* with thiosulfate or sulfide as energy source. *Archives of Microbiology*, v.154, p.417 – 421, 1990.

MADIGAN, M. T.; MARTINGO, J. M.; Parker, J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARSCHALL, C.; FRENZEL, C.; CYPIONKA, H. Influence of oxygenon sulphate reduction and growth of sulphate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, v.159, p.168–173, 1993.

MARUTHAMUTHU, S.; MUTHUKUMAR, N.; MOHANAN, S.; SUBRAMANIAN, P.; PALANISWAMY, N.; RAGHAVAN, M. Role of *Brucella* sp. and *Gallionella* sp. in oildegradation and corrosion. *Electrochemistry Communications*, v. 5, p. 421–425, 2003.

MEHANNA, M.; BASSEGUYA, R.; DELIA, M.; GIRBAL, L.; DEMUEZ, M.; BERGEL, A. New hypotheses for hydrogenase implication in the corrosion of mild steel. *Electrochimica Acta*, v.54, p. 140–147, 2008.

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.

NECULITA, C.; ZAGURY, G. J. Passive Treatment of Acid Mine Drainage in Bioreactors: Short Review, Applications, and Research Needs. In: CANADIAN GEOTECHNICAL CONFERENCE, 60., 2007, Ottawa, p. 1439-1446.

ODOM, J.M. Industrial and Environmental Activities of Sulfate-Reducing Bacteria In: ODOM, J.M. & JR, R.S. *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. New York: Springer – Verlag , 1993.

OGP, 2009. INTERNATIONAL ASSOCIATION OF OIL & GAS PRODUCERS. Environmental performance in the E&P industry – 2008 data. Report No. 429 November 2009.

PARENTE, P. F.; NETO, F. F. L.; LANDAU, L. Análises físico-químicas da água de formação e a biodegradação do petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 3., 2005, Salvador.

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

PECK, H. D. Bioenergetic Strategies of the Sulfate-Reducing Bacteria In: ODOM, J.M. & JR, R.S. *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. New York: Springer – Verlag , 1993.

PENNA, M. O. *Avaliação de bases ativas biocidas para controle de microrganismos em sistemas de recuperação secundária de petróleo*. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2004.

PENNA, M. O.; OLIVEIRA, H.B.; SILVA, E.D. *Avaliação da Atividade Metabólica (Produção de H₂S) de culturas mistas de bactérias Redutoras de sulfato (BRS)*. 46. 2003. 11 p. *Boletim Técnico Petrobras*.

POSTGATE, J.R. *The Sulphate reducing Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.

RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M.; LARTER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, v. 154, p. 321–328, 2003.

SANT'ANNA, G. S. *Corrosão microbiológica: uma ferramenta inter-disciplinar*. 2007. Monografia – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SASS, H.; BERCHTOLD, M.; BRANKE, J.; KONIG, H.; CYPIONKA, H.; BABENZIEN, H. Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 21, p. 212-219, 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 2 ed. Livraria Varela, 2001.

SMITH, D. W. Ecological Actions of Sulfate-Reducing Bacteria In: ODOM, J.M. & JR, R.S. *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. New York: Springer – Verlag , 1993.

SUBRAMANIAN, P.; MUTHUKUMAR, N.; MOHANAN, S.; MARUTHAMUTHU, S.; PALANISWAMY, N.; RAGHAVAN, M. Role of *Brucella* sp. and *Gallionella* sp. in oil degradation and corrosion. *Electrochemistry Communications*, v.5, p. 421–425, 2003.

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

TSUKAMOTO, T. K.; KILLION, H. A.; MILLER, G. C. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research*, v.38, p.1405-1418, 2004.

VAZOLLER, R. F. *Características e interações microbianas nos processos de tratamento biológico aeróbio e anaeróbio*. In: Curso de Processos Biológicos de Tratamento de Resíduos, 2, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. 1993, 18p.

VIDELA, H. A.; Herrera, L. K. Biocorrosion. In: *Petroleum Biotechnology*. Netherlands: Elsevier, 2004. Chap. 7, p.193-218.

VIDELA, H.A. *Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais*. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

VOORDOUW, G.; ARMSTRONG, S. M.; REIMER M. F.; FOUTS B.; TELANG A. J.; SHEN Y.; GEVERTZ D. Characterization of 16S rRNA Genes from Oil Field Microbial Communities Indicates the Presence of a Variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1623–1629, May, 1996.

WEIJMA, J.; STAMS, A. J. M.; POL, L. W. H.; LETTINGA, G. Thermophilic Sulfate Reduction and Methanogenesis with Methanol in a High Rate Anaerobic Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.67, feb., 2000.

WILLOW, M. A.; COHEN R. R. H. pH, Dissolved Oxygen, and Adsorption Effects on Metal Removal in Anaerobic Bioreactors. *Journal of Environmental Quality*, v. 32, p.1212–1221, 2003.