



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Gustavo Fabbri Montez

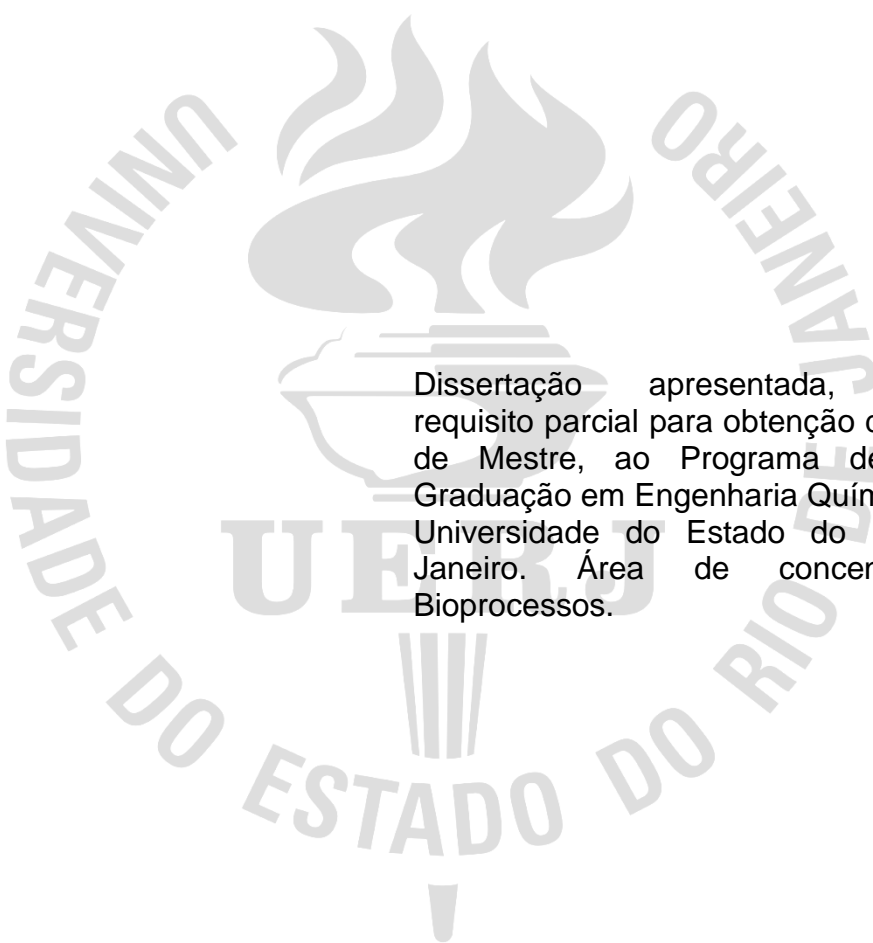
**Produção biogênica de sulfetos por micro-organismos
redutores de sulfato em amostras salinas da indústria do
petróleo**

Rio de Janeiro

2015

Gustavo Fabbri Montez

Produção biogênica de sulfetos por micro-organismos redutores de sulfato em amostras salinas da indústria do petróleo.



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: Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

M292 Montez, Gustavo Fabbri
Produção biogênica de sulfetos por micro-organismos
redutores de sulfato em amostras salinas da indústria do
petróleo. / Gustavo Fabbri Montez. – 2015.
92f.

Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Química.

1. Bactérias redutoras de sulfato - Teses. 2. Águas residuais -
Microbiologia - Teses.. 3. Sulfetos - Teses. I. Costa, Antonio Carlos
Augusto da II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de
Química. III. Título.

CDU 579.66

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

Assinatura

Data

Gustavo Fabbri Montez

Produção biogênica de sulfetos por micro-organismos redutores de sulfato em amostras salinas da indústria do petróleo

Dissertação apresentada, como requisito 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: Bioprocessos.

Aprovada em 30 de março de 2015.

Banca Examinadora:

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

Dra. Ana Cristina de Melo Ferreira
Comissão Nacional de Energia Nuclear

Prof^a. Dra. Gisele Birman Tonietto
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof^a. Dra. Marta Pereira Langone
Instituto de Química - UERJ

Rio de Janeiro
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas amadas avós, Nair e Zeny, mulheres guerreiras, que quando em vida, sempre me estimularam a seguir em frente e ir atrás dos meus sonhos.

Essa vitória dedico a vocês onde quer que estejam.

AGRADECIMENTOS

Ao Antonio Carlos Augusto da Costa, orientador atencioso e compreensivo, cuja presença constante e segura me estimulou e favoreceu meu crescimento pessoal e intelectual no decorrer deste trabalho.

A amiga Marcia de V. Carreira, sempre paciente e dedicada na orientação e auxílio das atividades laboratoriais, sem você teria sido muito mais difícil.

Aos meus pais, Paulo e Cristina, e irmãos, Felipe e Bernardo, pelo apoio e amor incondicional que sempre me dedicaram.

A minha atual noiva e futura esposa, Rafaela de Andrade Ramos, de quem roubei tempo precioso e que soube compreender minhas ausências e angustias no decorrer deste mestrado. Você é meu amparo e minha alegria.

RESUMO

MONTEZ, Gustavo Fabbri. *Produção biogênica de sulfetos por micro-organismos redutores de sulfato em amostras salinas da indústria do petróleo*. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) é um dos principais problemas na indústria do petróleo, sendo esta uma das causas da corrosão de tanques de estocagem e tubulações. Essa produção é possibilitada devido à injeção de água do mar durante o processo de recuperação secundária do petróleo, onde alguns micro-organismos presentes nessa água, tais como as bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT) e as bactérias redutoras de sulfato (BRS), que promovem a redução do sulfato a sulfeto. Atualmente, o método de quantificação destes micro-organismos é a técnica do Número Mais Provável (NMP) que estima o resultado em aproximadamente 28 dias. No presente trabalho foi utilizada a metodologia da produção semi-contínua de sulfeto biogênico pelo período de 15 dias, com o intuito de correlacionar com os resultados das quantificações de BANHT e BRS através da técnica convencional do NMP. Foram analisadas amostras de diferentes procedências da indústria do petróleo, apresentando variação na salinidade de 0 a 16 g.L⁻¹. O objetivo deste procedimento foi avaliar as velocidades específicas e instantâneas de produção de H₂S, sugerindo, desta forma, quais amostras apresentam maior potencial para a produção biogênica de sulfeto e em quais condições essa produção se dá. Observou-se que em todas as amostras a geração do H₂S se dá de forma crescente até a estabilização desta produção, sendo esta obtida quase sempre em seis dias (144h) do crescimento microbiano. A produção do sulfeto biogênico se deu de forma mais intensa nas amostras do fundo de tanque de estocagem de óleo e da água de formação. A quantificação das BANHT e das BRS foram avaliadas pelo método do NMP de acordo com a tabela de Harrigan, a qual subestima a população microbiana, desconsiderando erros provenientes da técnica.

Palavras-chave: Água de Produção. Bactérias Redutoras de Sulfato.

Sulfeto.BRS. Biocorrosão. Atividade Biogênica Semi-contínua.

ABSTRACT

MONTEZ, Gustavo Fabbri. *Biogenic sulfide production by reducing sulfate microorganisms in saline samples of the oil industry*. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The production of H₂S (hydrogen sulfide) is a major problem in the oil industry, which is a cause of corrosion of pipes and storage tanks. This production is made possible due to seawater injection during the secondary oil recovery process where some microorganisms present in this water, such as total heterotrophic anaerobic bacteria (THAB) and sulphate-reducing bacteria (SRB) that promote reduction of sulfate to sulfide. Currently, the method of quantification of these microorganisms is the technique of the Most Probable Number (MPN) which estimates the results in about 28 days. The present study used the methodology of semi-continuous production of biogenic sulfide by 15 days period, in order to correlate with the measurements results of BANHT and BRS through the conventional technique of MPN. There were several samples analyzed from different origins in the oil industry, with variations in salinity from 0 to 16 g.L⁻¹. The purpose of this procedure was to evaluate the specific speeds and instantaneous H₂S production, suggesting thereby that samples had increased biogenic sulfide production and this production conditions which occurs. It was observed that all samples in the generation of H₂S occurs incrementally until stabilization of this production, these being almost always obtained in six days (144h) of microbial growth. The production of biogenic sulfide occurred more intensely in the samples of oil storage tank bottom and formation water. The quantification of SRB and THAB were evaluated by the MPN method according to Harrigan table, which underestimates the microbial population, disregarding errors arising in the art.

Keywords: Production Water. Sulphate Reducing Bacteria. Sulphide. SRB.
Corrosion.Semi-continuousBiogenicActivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reservatório de óleo.....	15
Figura 2 -	Injeção de água em poços de petróleo.....	17
Figura 3 -	Micrografia de força atômica (adquirida no ar) de um velho biofilme de 14 dias formado pela BRS marinha <i>Dessulfovibrio Alaskensis</i> sobre a superfície do aço inoxidável AISI 316.....	22
Figura 4 -	Formação de um biofilme.....	23
Figura 5 -	Formação de Pite.....	24
Figura 6 -	Interação entre bactérias produtoras de ácido e as BRS no mecanismo de biocorrosão.....	27
Figura 7 -	Ciclo biológico do enxofre.....	29
Figura 8 -	Fases do crescimento microbiano.....	31
Figura 9 -	Representação do método do NMP em triplicata adotado para quantificação de BRS e BANHT.....	39
Figura 10 -	Frasco com meio Postgate E – modificado.....	40
Figura 11 -	Frasco contendo o meio para BANHT.....	41
Figura 12 -	Esquema do arraste do sulfeto biogênico das amostras.....	42
Figura 13 -	Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Fundo de Tanque de Óleo (R5)	59
Figura 14 -	Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Formação (R6)	60
Figura 15 -	Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Mineradora (R7)	61
Figura 16 -	Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Fundo de Tanque de Diesel (R8)	63
Figura 17 -	Avaliação e quantificação da ABS de formação de sulfeto nas amostras da indústria do petróleo.....	64
Figura 18 -	Atividade Metabólica Contínua da amostra de Consórcio Misto de BRS (CM3)	67
Figura 19 -	Atividade Metabólica Contínua da amostra de Cultura Pura de BRS nº1 (CM4)	68

Figura 20 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Cultura Pura de BRS nº2 (CM5)	69
Figura 21 - Avaliação e quantificação da ABS de formação de sulfeto nas amostras de culturas microbianas oriundas da indústria do petróleo.....	70
Figura 22 - Velocidades instantâneas de formação de H ₂ S para as amostras da indústria do petróleo.....	72
Figura 23 - Velocidades específicas de formação de H ₂ S para as amostras da indústria do petróleo.....	74
Figura 24 - Velocidades instantâneas de formação de H ₂ S para as culturas microbianas.....	76
Figura 25 - Velocidades específicas de formação de H ₂ S para as culturas microbianas.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio de cultura Postgate E (1,0 L)	36
Tabela 2 -	Composição do meio de cultura para BANHT (1,0 L)	37
Tabela 3 -	Composição da solução redutora (1,0 L)	38
Tabela 4 -	Tempo de amostragem para o H ₂ S produzido.....	44
Tabela 5 -	Procedência x Salinidade das amostras da indústria do petróleo.....	46
Tabela 6 -	Culturas x Salinidade das culturas microbianas.....	47
Tabela 7 -	Classificação das culturas microbianas.....	48
Tabela 8 -	Classificação das amostras da indústria do petróleo.....	49
Tabela 9 -	Quantificação de BANHT para as amostras da indústria do petróleo.....	50
Tabela 10 -	Quantificação de BANHT para as amostras de culturas microbianas.....	52
Tabela 11 -	Quantificação de BRS para as amostras da indústria do petróleo.....	54
Tabela 12 -	Quantificação de BRS para as amostras de culturas microbianas.....	56

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1	Água de Produção	15
1.2	Acidificação biogênica (Souring)	18
1.3	Microbiologia do petróleo	20
1.3.1	<u>Biocorrosão</u>	20
1.3.2	<u>Formação de biofilmes</u>	23
1.3.3	<u>Micro-organismos associados a biocorrosão</u>	25
1.4	Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	27
1.4.1	<u>Crescimento microbiano</u>	31
1.5	Quantificação Celular – Número Mais Provável (NMP)	33
1.6	Microbiologia Preditiva	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1	Meios de Cultura	33
2.1.1	<u>Meio Postgate E – modificado</u>	33
2.1.2	<u>Meio para bactérias anaeróbicas heterotróficas totais (BANHT)</u>	37
2.1.3	<u>Solução de diluição para os meios de cultivo de BRS e BANHT</u>	38
2.2	Quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Anaeróbicas Heterotróficas Totais (BANHT)	38
2.3	Quantificação de Sulfeto Total nas Amostras	41
2.4	Avaliação da Atividade Biogênica Semi-contínua (ABS)	43
2.5	Cálculo das Velocidades Específica e Instantânea	44
2.6	Determinação do pH dos Meios de Cultura	45
2.7	Amostras	45
2.7.1	<u>Amostras da indústria do petróleo</u>	45
2.7.2	<u>Culturas microbianas</u>	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48

3.1	Populações Microbianas Encontradas apartir da Quantificação das BRS e BANHT com Base na Tabela Estatística de Harrigan (1998)	48
3.1.1	<u>Quantificação das BANHT estimada com o NMP com base na tabela estatística de Harrigan (1998)</u>	50
3.1.2	<u>Quantificação das BRS estimada com o NMP com base na tabela estatística de Harrigan (1998)</u>	54
3.2	Quantificação da Produção Biogênica de Sulfeto de Hidrogênio por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em Amostras da Indústria do Petróleo e Culturas Microbianas	57
3.2.1	<u>Atividade biogênica semi-contínua de BRS oriundas de amostras da indústria do petróleo</u>	58
3.2.2	<u>Atividade biogênica semi-contínua de BRS de amostras de culturas microbianas oriundas da indústria do petróleo</u>	66
3.2.3	<u>Velocidades instantâneas das amostras da indústria do petróleo</u>	72
3.2.4	<u>Velocidades específicas das amostras da indústria do petróleo</u>	74
3.2.5	<u>Velocidades instantâneas das amostras de culturas microbianas</u>	76
3.2.6	<u>Velocidades específicas das amostras de culturas microbianas</u>	78
	CONCLUSÕES	80
	BIBLIOGRAFIA	82
	ANEXO A- Tabela NMP.....	90
	ANEXO B- Curva de calibração do sulfeto.....	92

INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera possui diversas barreiras e problemas no que diz respeito à exploração dos reservatórios de petróleo. Devido à baixa eficiência dos mecanismos de recuperação do óleo dos poços, muitos hidrocarbonetos ficam retidos após o esgotamento da energia natural do reservatório, devendo assim, fazer o uso de diferentes métodos para a recuperação deste óleo retido.

THOMAS et al. (2004) apresentou dados mostrando que nos últimos anos a injeção da água do mar, no processo de recuperação secundária do óleo, tornou-se mais comum, devido ao fato deste método elevar a produtividade dos poços mantendo a pressão destes reservatórios e deslocando o óleo na direção dos poços produtores.

Em um poço recém descoberto, onde a quantidade de óleo ainda é elevada, a produção desta água é em média de 5 a 15% do volume de óleo extraído, porém em poços que já possuem um esgotamento dos seus reservatórios de óleo essa produção pode chegar a 1000% do volume de óleo produzido (ROCHA, 2006).

As águas oriundas deste processo de recuperação secundária, assim como as águas já existentes nos seios das rochas sedimentares, são armazenadas em tanques de água/óleo e tratadas como rejeito, devido a estas constituírem um ambiente suscetível ao crescimento de micro-organismos como o das bactérias redutoras de sulfato (BRS) (SANT'ANNA, 2009; MAGOT *et al.*, 2000).

A proliferação incontrolada das BRS acarreta na produção do sulfeto de hidrogênio (H₂S), gás este que é altamente tóxico ao ser humano, mesmo em baixas concentrações, além de frequentemente ocasionar extensos danos materiais devido à corrosão dos constituintes metálicos das unidades exploradoras da indústria petrolífera, tais como tanques e tubulações (PENNA, *et al.*, 2003).

O estudo das bactérias redutoras de sulfato vem sendo cada vez mais realizado devido ao grande interesse da indústria petrolífera em poder prevenir a contaminação por estes micro-organismos, evitando assim a degradação de seus constituintes assim como a segurança dos seus operadores.

Atualmente diversas técnicas vem sendo utilizadas pela indústria para realizar a quantificação das BRS presentes nas águas de produção, assim como as concentrações de H₂S produzidas por estes micro-organismos e as condições mais propícias que estimulam essa produção biogênica de sulfeto. Uma das formas mais difundidas é através da inoculação de amostras dessa água em meios de cultura específicos para o crescimento das BRS, gerando assim uma quantificação estimada das populações microbianas através do método do número mais provável (NMP). Porém, este método possui uma incerteza muito grande devido ao erro associado à técnica, além de demorar 28 dias para expressar os resultados almejados.

A produção de sulfeto gerada pelas BRS pode ser quantificada segundo o método do azul de metileno descrito por Jacob (1957), comparando o produto encontrado na amostra com padrões previamente quantificados.

Esse trabalho se propõe a estudar a produção biogênica de sulfeto pelas bactérias redutoras de sulfato em amostras de diferentes procedências da indústria do petróleo, assim como em amostras de culturas microbianas puras e mistas oriundas do mesmo setor.

Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram a avaliação de parâmetros do crescimento bacteriano e da produção biogênica de sulfeto pelas BRS de diferentes amostras salinas oriundas da indústria do petróleo, assim como a avaliação das suas atividades metabólicas comparadas com as quantificações microbianas realizadas pelo método do NMP.

Objetivos específicos

Entre os objetivos específicos, destacam-se:

- Quantificar a população de bactérias das culturas estudadas através do método do número mais provável (NMP) em todas as etapas do cultivo;
- Quantificar a produção biogênica de sulfeto das amostras através de método espectrofotométrico;

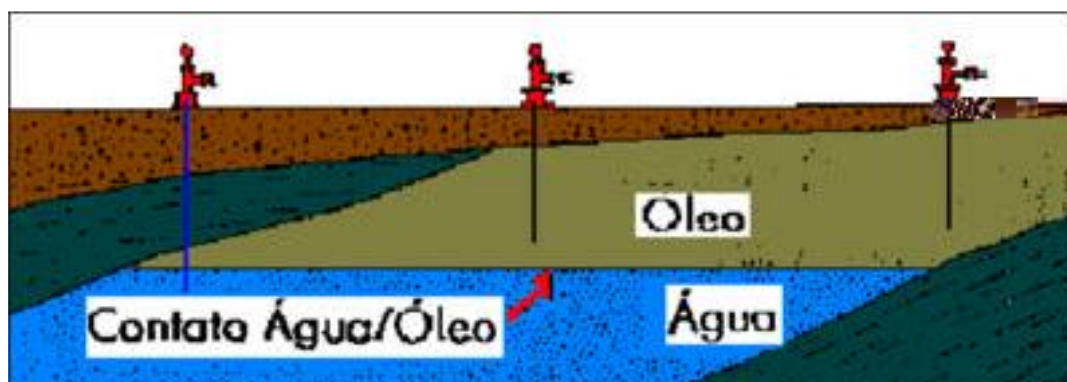
- Avaliar a atividade biogênica semi-contínua (ABS) nas amostras utilizadas;
- Estudar a cinética de produção do H_2S , utilizando-se os valores obtidos no método espectrofotométrico e no NMP;
- Quantificar, através do método do NMP, a população de bactérias redutoras de sulfato (BRS) presentes em cada uma das amostras utilizadas;
- Comparar as técnicas a fim de se relacionar as populações microbianas com a produção biogênica de sulfeto e com a cinética da produção de sulfeto.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Água de Produção

O petróleo é um óleo, com cheiro característico e uma cor que oscila entre o negro e o castanho claro, composto de uma grande variação de hidrocarbonetos oleosos, variando de acordo com o lugar de onde é explorado (FIORESE, 2004), eventualmente sendo encontrado em rochas sedimentares que formam reservatórios que podem por sua vez ser constituídos de calcarenito, ou então, de arenitos comuns (THOMAS *et al.*, 2004). Possuindo densidade característica, podendo variar de 0,75 a 0,95 kg/m³, este tão cobiçado óleo pode ser encontrado desde em reservatórios superficiais até em outros muito profundos que podem exceder até mesmo 3 mil metros de profundidade (FIORESE, 2004). Podemos observar na Figura 1 o posicionamento que o petróleo e o lençol de água são encontrados entre as rochas devido as suas respectivas densidades.

Figura 1 – Reservatório de óleo



Fonte: FIORENSE, 2004.

Segundo WORDEN *et al.* (2006), a água que se encontra junto ao óleo nos reservatórios é denominada água de formação, sendo essa extraída juntamente ao petróleo no processo de recuperação primária e recuperação

secundária. Normalmente essa água é hipersalina, apresentando concentrações de até 250 g.L^{-1} devido aos sólidos dissolvidos (TELES *et. al.*, 2010).

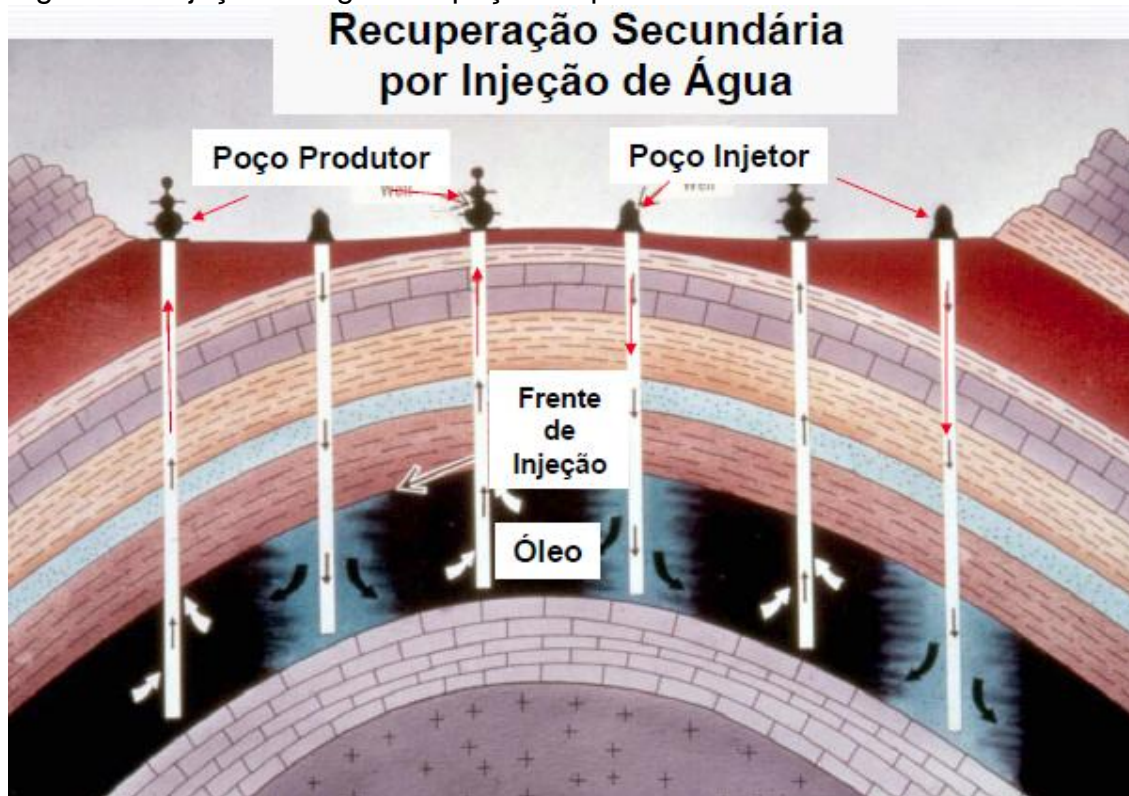
De acordo com THOMAS *et al.* (2004), todos os reservatórios, que devido aos mecanismos pouco eficientes de exploração, ainda retêm uma grande quantidade de óleo em suas paredes e interior, necessitam de meios que possam remover esse resíduo até então “perdido”, e é nesse momento que mecanismos como o processo de recuperação secundária entram em cena (ALMEIDA, 2007).

No processo de recuperação primária (o primeiro mecanismo utilizado na exploração de um novo poço), é realizado um furo na parede da rocha do reservatório de forma que a própria pressão interior do poço possa fazer com que o petróleo flua tranquilamente para a superfície e para seus poços produtores. O grande problema é que ao longo dessa exploração o poço vai perdendo pressão, o que diminui o fluxo do óleo e conseqüentemente a produção, só sendo possível recuperar entre 10% a 30% do volume de óleo encontrado em cada poço (FIORESE, 2004).

Para combater esse problema foi desenvolvido o processo de recuperação secundária, que consiste mais comumente na injeção de água nos reservatórios para que se mantenha a pressão elevada e o fluxo do óleo intenso. CORREA (2003) nos traz dados que comprovam que o processo de recuperação secundária é amplamente utilizado principalmente em campos de petróleo marítimo, já que dessa forma obtém-se a quantidade necessária de água (água do mar) para injetar no reservatório.

Essa injeção é realizada através de novos poços perfurados exclusivamente com a finalidade de seu fluido injetado deslocar o óleo residual na direção dos poços produtores em um sistema de varredura que confere a esta água o nome de “água produzida”, como podemos ver na Figura 2:

Figura 2 – Injeção de água em poços de petróleo



Fonte: CORRÊA, 2003.

Apesar desta escolha aparentar ser a mais sensata, devido à sua disponibilidade e compatibilidade química com a água de formação, a água produzida pode afetar a qualidade e integridade do petróleo produzido (HUBERT e VOORDOUW, 2007). Isso ocorre pois a composição da água produzida pode variar muito em função das características do reservatório e da localização em que este se encontra, idade do poço e tipo de óleo extraído (GOMES, 2009), além da elevada concentração de sulfato na água do mar, que pode atingir 3000 mg.L^{-1} , o que irá estimular a atividade e o crescimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS), que poderão promover danos às estruturas da plataforma, assim como, danos à saúde dos operadores e por

isso, a água produzida deve ser tratada como subproduto da produção do petróleo, devendo ser previamente tratada antes do seu descarte.

Atualmente as empresas exploradoras de petróleo geram altíssimas quantidades de água produzida, principalmente em poços mais antigos onde a produção de água corresponde a 95% do total da mistura água/óleo extraída (SANT'ANA, 2009). Essa água, tratada como rejeito, é estocada em diversos tanques de armazenamento de água/óleo, o que vem a proporcionar um ambiente precioso para a proliferação bacteriana das BRS, conseqüentemente, promovendo a produção do sulfeto de hidrogênio, que é produzido através do metabolismo dessas bactérias e é responsável pela deterioração de diversas estruturas, até mesmo dos seus tanques de armazenagem.

O sulfeto biogênico produzido pela atividade microbiana das BRS caracteriza um importante problema para a indústria de exploração de petróleo, uma vez que essa produção de H_2S em concentrações mais elevadas desenvolve a acidificação biogênica, também conhecida como *souring*. O *souring* será responsável por diversos problemas, tais como a diminuição da qualidade das cadeias de hidrocarbonetos produzidos, reduzindo assim a qualidade do óleo e a produtividade dos poços pela produção de incrustantes de FeS (*biofouling*), além de aumentar a biocorrosão e os riscos ambientais e ocupacionais devido à toxicidade singular do sulfeto de hidrogênio (FAUQHAR, 1997).

1.2 Acidificação Biogênica (*Souring*)

O processo de recuperação secundária em reservatórios de óleo é frequentemente acompanhado da acidificação biogênica (devido ao acréscimo das concentrações de sulfeto), causando diversos problemas, tais como a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) e a deterioração do óleo cru, sendo atribuído às BRS a principal parcela pelo mecanismo ao qual o *souring* se dá (TANJI *et al.*, 2014).

Segundo Farquhar (1997), a acidificação biogênica pode ser definida como o processo pelo qual a produção biogênica de gás sulfídrico (H_2S) aumenta durante o período produtivo de um campo em um reservatório de água/óleo, reagindo com suas paredes metálicas e formando produtos corrosivos como o

sulfeto de ferro insolúvel. Esse processo de acidificação é um dos responsáveis pela biocorrosão que degradará as cadeias de hidrocarbonetos do petróleo, diminuindo a sua qualidade, assim como a produtividade dos poços explorados, o que promove a necessidade do uso de aditivos químicos para o controle do *souring* (NASCIMENTO, 2006).

A água do mar ao ser injetada nos reservatórios de óleo durante o processo de recuperação secundária, carrega consigo muitos íons sulfato, que servirão como aceptores finais de elétrons para o metabolismo das BRS, que por estarem em condições favoráveis para o seu crescimento produzem uma grande quantidade de H₂S, caracterizando um dos principais mecanismos para o aumento do *souring* (DAVIDOVA *et al.*, 2001; HUBERT *et al.*, 2003).

De acordo com Zarasvand (2014), a corrosão ocorre devido a reações químicas ou eletroquímicas entre o metal e o ambiente em que se encontra. Essa corrosão pode causar danos expansivos e até mesmo perigosos para um amplo grupo de indústrias. Se torna muito difícil a avaliação do impacto econômico da corrosão, particularmente quando existe o envolvimento de micro-organismos no mecanismo da corrosão.

Corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é o tipo de corrosão onde a deterioração metálica, assim como a não metálica, ocorre devido à presença de micro-organismos. Micro-organismos tais como as bactérias, fungos (GEWEELY, 2011) e algas (JAVAHERDASHTI *et al.*, 2009) podem influenciar a corrosão. As bactérias com o maior envolvimento no processo de corrosão são observadas nos grupos das bactérias redutoras de sulfato (BRS) (ENNING *et al.*, 2012), bactérias oxidantes de manganês/ferro (RAJASEKAR *et al.*, 2005), bactérias redutoras de ferro (HERRERA e VIDELA, 2009) e bactérias produtoras de ácido (LI *et al.*, 2008). Esses micro-organismos, principalmente as BRS, modificam as reações eletroquímicas na interface metal/biofilme e com isso aceleram o processo de corrosão do metal (ZARASVAND, 2014).

Além dos problemas de corrosão e degradação das estruturas metálicas da indústria petrolífera, existe um grande risco ocupacional aos trabalhadores que tiverem contato com o H₂S. O sulfeto de hidrogênio é encontrado na forma gasosa e quando inalado atua diretamente no sistema nervoso, vias respiratórias e olhos, podendo levar a morte até mesmo em baixas concentrações. Isso se dá devido a fadiga olfatória, que faz com que após 2 a

15 minutos de exposição ao gás em concentrações de 100 mg.L^{-1} não seja possível perceber o odor (MARIANO, 2005).

1.3 **Microbiologia do Petróleo**

Na indústria petrolífera muitos micro-organismos são identificados nas diversas fases da exploração do petróleo, porém, os que são mais estudados são aqueles que de alguma forma podem trazer danos às estruturas ou aos operadores, geralmente identificados por afetarem o sistema de recuperação secundária, assim como os micro-organismos causadores de corrosão.

Os micro-organismos podem formar colônias em diferentes ambientes, desde que encontrem condições propícias, assim como os nutrientes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (ROCHA, 2006), vivendo em sua maioria na interface óleo/água, onde encontram tal ambiente.

As bactérias, em sua maioria, podem crescer e se desenvolver em ambientes distintos, tais como na presença de oxigênio (aeróbios) ou em sua ausência (anaeróbios), onde sua nutrição é basicamente de hidrocarbonetos do óleo, sais minerais existentes no ambiente e outras impurezas contidas nos reservatórios e tanques de armazenamento (MADIGAN, 2010).

1.3.1 Biocorrosão

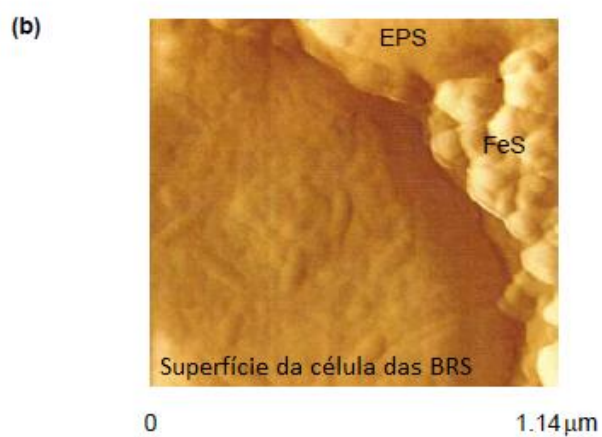
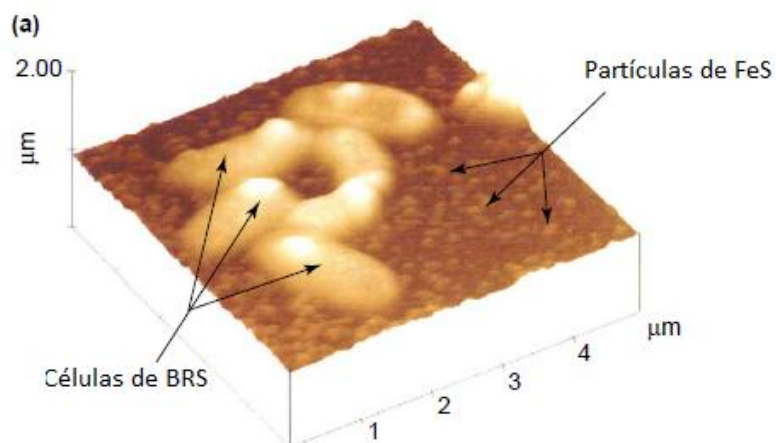
Interações físico-químicas entre materiais metálicos e o ambiente podem direcionar para a corrosão. A corrosão eletroquímica é uma reação química que envolve a transferência de elétrons do metal para um receptor de elétrons externo causando a liberação dos íons metálicos no meio circundante e deterioração do metal. Esse processo ocorre através de uma série de reações de oxidação (anódica), assim como de redução (catódica) de espécies químicas em contato ou nas proximidades da superfície metálica (BEECH & SUNNER, 2004). A atividade microbiana dentro do biofilme formado nas superfícies de materiais metálicos pode afetar a cinética das reações catódicas e/ou anódicas (JONES & AMY, 2002) e também pode alterar consideravelmente a química de quaisquer camadas de proteção, levando

assim a uma aceleração ou inibição da corrosão (ORNECK *et al.*, 2002; LITTLE & RAY, 2002).

A deterioração de metais devido à ação microbiana é denominada biocorrosão ou então de corrosão microbiologicamente induzida (CMI). Devido a sua importância econômica e ambiental, CMI vem sendo objeto de extensivos estudos nas últimas cinco décadas, onde vários modelos vêm sendo propostos para explicar os mecanismos pelo qual ocorrem a biocorrosão (BEECH, 2004).

Segundo BEECH *et al.* (2004), a biocorrosão é o resultado da interação, normalmente sinérgica, entre a superfície metálica, produtos da corrosão abiótica, e das células microbianas com seus metabólitos (Figura 3).

Figura 3 – Micrografia de força atômica (adquirida no ar) de um biofilme de 14 dias formado pela BRS marinha *Dessulfovibrio Alaskensis* sobre a superfície do aço inoxidável AISI 316



Legenda: (a) Partículas de sulfeto de ferro (FeS) distribuídas sobre a superfície do metal e (b) estão intimamente associadas com as células bacterianas e com substâncias poliméricas Extracelulares (EPS) segregadas pelas células.

Fonte: BEECH et al., 2004.

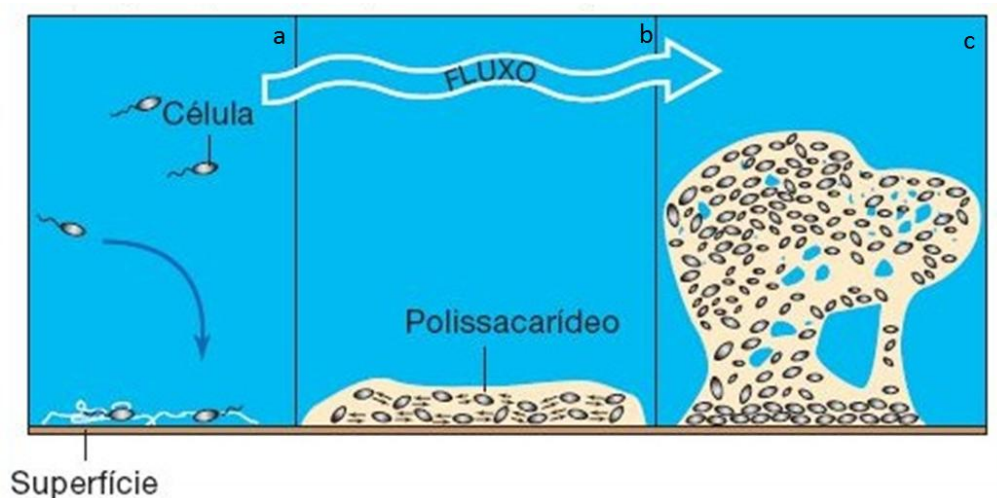
1.3.2 Formação de biofilmes

A medida que as células microbianas vão se multiplicando elas vão se aderindo a uma superfície formando assim uma colonização, que estando em um ambiente favorável, permanecerão crescendo e formando colônias, denominadas então de biofilme (HERMANSSON, 1999), como demonstrado na Figura 4.

Segundo VIDELA & HERRERA (2005), podemos dividir o biofilme em compostos inorgânicos e uma estrutura complexa, formada por uma matriz em média de 95% de água, células bacterianas e material polimérico extracelular (EPS), produtos do metabolismo destes micro-organismos.

MADIGAN *et al.* (2010) define a formação do biofilme dividindo-a em três etapas de maneira geral, como apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Formação de um biofilme



Legenda: Representação esquemática das etapas de: (a) Fixação, (b) Colonização, (c) Crescimento; durante a formação de biofilme sobre uma superfície sólida

Fonte: MADIGAN *et al.*, 2010.

Inicialmente um pequeno número de células bacterianas se adere a uma superfície sólida através da formação de um filme de material orgânico e inorgânico que modifica a distribuição das cargas na superfície. Em um segundo momento, mais células presentes no líquido ao terem contato com este filme vão se aderindo, sendo esse processo facilitado pelos micro-

organismos já existentes no local. Após esse momento ocorre a multiplicação celular com a síntese de polissacarídeos extracelular, o que promoverá volume, aumento e o crescimento da população microbiana, dando origem assim a um biofilme maduro, resistente a ruptura e quase impenetrável.

Após o biofilme ser formado pelas populações microbianas, ocorre o aparecimento de um gradiente de oxigênio nas camadas deste biofilme, de forma que mesmo quando formados em uma condição aeróbia, ainda assim existirá uma região anaeróbia (quanto mais para o interior do biofilme menor a concentração de oxigênio presente), que será um ambiente propício para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos como as BRS. Essas bactérias redutoras de sulfato geram metabólitos, tais como o sulfeto de hidrogênio que além de ser extremamente tóxico e altamente corrosivo, se torna agressivo para todos os elementos metálicos constituintes dos reservatórios, tubulações e outros equipamentos do sistema de produção de petróleo, gerando assim a corrosão localizada abaixo do biofilme, usualmente denominada pite como podemos ver na Figura 5 (CASTANEDA e BENETTON, 2008).

Figura 5 – Formação de pite



Fonte: CASTANEDA e BENETTON, 2008.

A formação do pite é caracterizada por uma perfuração, devido à corrosão localizada, que se faz em um ponto, sendo uma estrutura escalonada, concêntrica e com profundidade maior que seu diâmetro (GENTIL, 2007).

1.3.3 Micro-organismos associados à biocorrosão

Segundo GALVÃO (2008) alguns micro-organismos podem atuar como despolarizadores catódicos, crescendo em certas regiões dos metais e produzindo zonas de concentração de oxigênio. Dessa forma, eles contribuem para inúmeros mecanismos de corrosão. Dentre estes micro-organismos, alguns grupos se destacam quando se trata de bactérias associadas à corrosão, sendo esses as bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias oxidantes de enxofre, bactérias oxidantes de ferro, bactérias produtoras de ácido e por fim bactérias produtoras de exopolímeros. Esses grupos apresentam características semelhantes apesar de serem de diferentes espécies. São encontrados em sistemas de água da indústria do petróleo, em sistemas singulares como na água de refrigeração, indústria de papel, sistemas de transporte e armazenamento de óleo e gás natural, assim como em fábricas químicas dos processos petrolíferos. A participação destes micro-organismos nos processos de biocorrosão geralmente ocorre por mecanismos complexos que muitas vezes dependem de um único ou até mesmo mais de uma espécie de micro-organismo (VIDELA & SALVAREZZA, 1994).

A muitos anos vem crescendo o interesse por parte da indústria em estudar as BRS, assim como seus mecanismos de produção de metabólitos, principalmente pela indústria petrolífera e de navegação, por serem essas as mais afetadas pela corrosão gerada por esses micro-organismos. Isso pelo fato destas bactérias possuírem uma concentração elevada em ambientes marinhos, devido à alta concentração de sulfato na água dos oceanos (JAVAHERDASHTI, 1999).

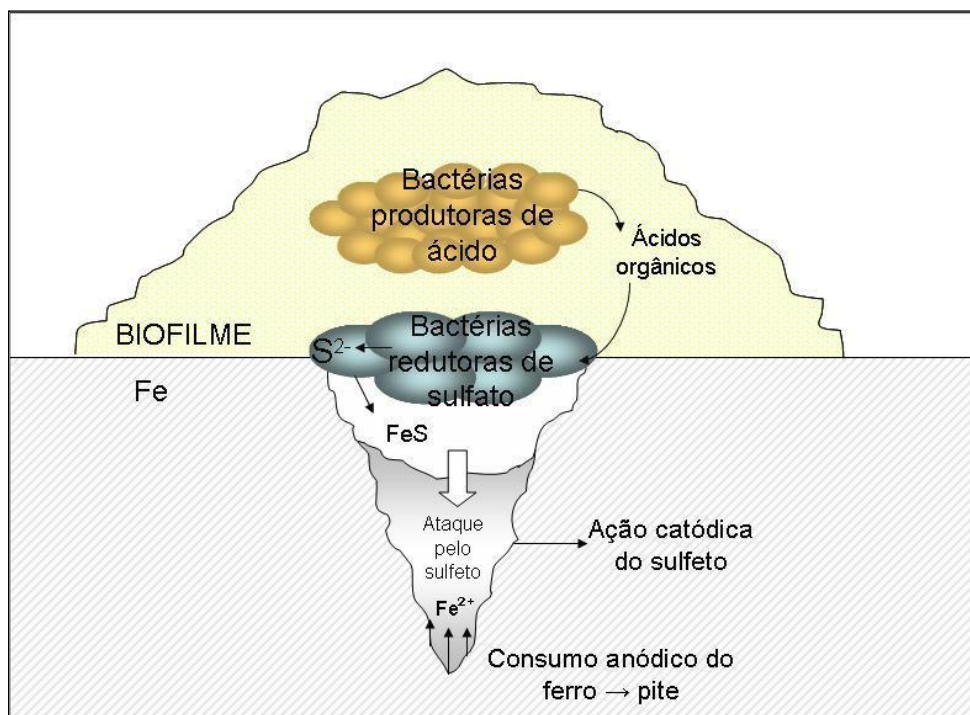
As bactérias oxidantes do enxofre possuem um importante papel no ciclo do enxofre da natureza e estão intimamente envolvidas com a corrosão microbiologicamente induzida (CMI). O principal gênero deste micro-organismo é o *Acidithiobacillus*, bactérias Gram-negativas com formato de bastão, e por serem quimioautotróficos aeróbios se utilizam do dióxido de carbono como única e exclusiva fonte de carbono (VIDELA e HERRERA, 2005). Essas bactérias através de seu metabolismo geram o ácido sulfúrico (H_2SO_4), que reduzindo o pH do meio em que é liberado, atua como agente corrosivo em

estruturas metálicas, de pedra e até mesmo de concreto (SAND & GEHRKE, 2003).

Como fonte para a energia necessária para reduzir o íon sulfato a sulfeto, as bactérias redutoras de sulfato utilizam das mais variadas fontes de carbono orgânico, tais como o lactato e o piruvato, etanol, maleato além de alguns ácidos graxos. Como resultado obtido desta redução obtém-se a produção de compostos como os bissulfetos, sulfetos e hidrogênio sulfetado, assim como seus agentes intermediários, tais como os tiosulfatos, politionatos e tetracionatos, intermediários esses que possuem um importante papel no processo de corrosão anaeróbia do ferro. Sendo um dos responsáveis pelo mecanismo de biocorrosão na ruptura dos filmes protetores sobre o metal, torna-se de suma importância o estudo e o entendimento de metabólitos como o sulfeto biogênico (HEGGENDORN *et al.*, 2009).

Os carbonos orgânicos utilizados como fonte de energia são convertidos por mecanismos fermentativos, onde um grupo específico de micro-organismos quebra as moléculas de maior complexidade em moléculas menores, produzindo assim diversos ácidos como o fórmico, acético, láctico, propiônico, butírico e úrico, servindo assim como substratos para que outros micro-organismos, tal como as BRS (FIGURA 6), possam obter as condições necessárias para sua nutrição e crescimento, assim atingindo a completa oxidação da matéria orgânica (ALMEIDA, 2007; BOGAN, 2004). Dessa forma, temos que esses grupos de bactérias estão diretamente relacionados à biocorrosão, uma vez que são produtores de ácidos corrosivos (GALVÃO, 2008).

Figura 6 - Interação entre bactérias produtoras de ácido e as BRS no mecanismo de biocorrosão



Fonte: PINEAU et. al., 2003.

Além dos grupos microbianos citados, ainda podemos citar as *Pseudomonas* como um grupo relacionado ao processo de corrosão, uma vez que este micro-organismo produz polímeros extracelulares (EPS), que protegerão as células dos íons metálicos, criando desta forma um ambiente anaeróbico, favorecendo então o crescimento e desenvolvimento das BRS presentes no interior deste biofilme, assim como a produção de seus metabólitos (BEECH e GAYLARDE, 1989).

Os metabólitos das BRS possuem um papel fundamental quando se trata de biocorrosão, estas moléculas excretadas por estes micro-organismos, atuam diretamente na ruptura dos filmes que envolvem e protegem as superfícies metálicas.

1.4 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são micro-organismos anaeróbicos, heterotróficos e procariontes (ODON & SINGLETON, 1992), possuem espécies presentes em domínios como Archaea e Bactéria. Após as tecnologias de

sequenciamento gênico que possibilitaram a descoberta do mapeamento filogenético, as BRS passaram, então, a serem classificadas como pertencentes a 4 grupos, levando em consideração suas principais características, sendo elas o formato da célula, sua forma ou ausência de movimentação, a presença de citocromos e a temperatura em que obtém as condições ótimas para oxidação do acetato, sendo esta completa ou não (CANFIELD, 1991). Podem ser encontradas em uma grande variedade de ambientes com zonas aeróbias que favoreçam seu crescimento, tais como água salgada ou doce, solos e sedimentos, biofilmes aderidos a superfícies e até mesmo no intestino e cavidade oral de muitos animais, podendo estar presente também na microbiota humana (HEGGENDORF *et al.*, 2009).

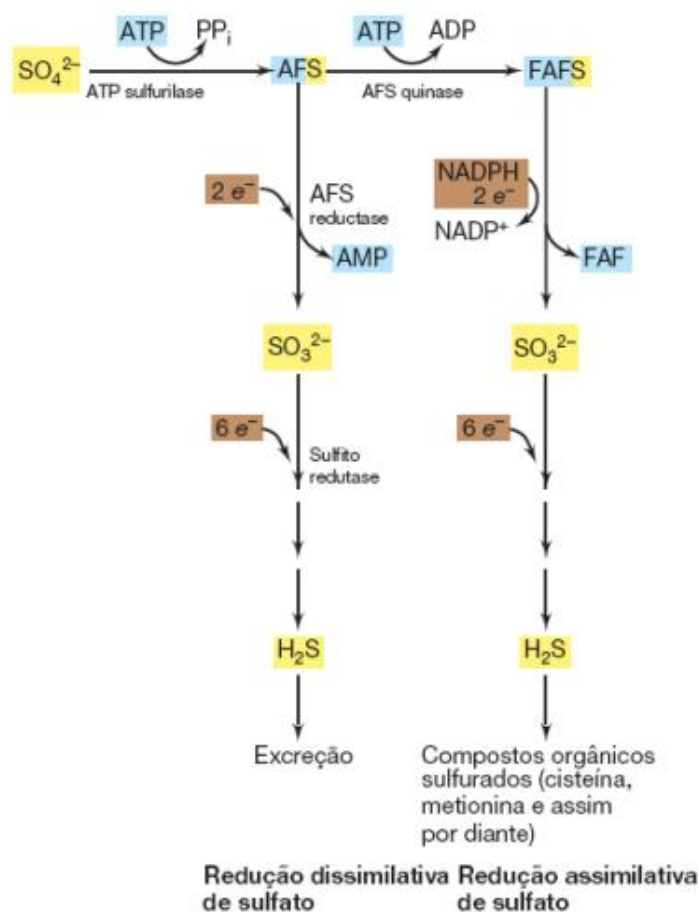
Constituindo uma classe de micro-organismos existentes em diversos filões e gêneros, estudos filogenéticos efetuados em tanques de água/óleo indicaram que entre todas as BRS, as mais encontradas pertencem ao filo Proteobacteria, contendo bactérias Gram-negativas dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e *Desulfomicrobium* (AGRAWAL *et al.*, 2010; NERIA-GONZÁLEZ *et al.*, 2006), todos com grande capacidade de reduzir o sulfato.

Existem duas formas pela qual o sulfato pode ser reduzido, a assimilativa, cujo os compostos sulfurados são utilizados para constituintes da célula e a dissimilativa, onde os compostos sulfurados serão excretados como metabólitos de seu crescimento. A primeira via, assimilativa, é a mais comum e vem sendo adotada por fungos, plantas e pela grande maioria das bactérias já estudadas. Esta via evita o acúmulo de sulfeto de hidrogênio devido ao fato destes micro-organismos utilizarem os compostos sulfurados produzidos em sua constituição orgânica. Já a segunda via, dissimilativa, utiliza íons sulfato como aceptor final de elétrons, provenientes da oxidação de material orgânico, sendo assim, gerando acúmulo de H₂S (POSTGATE, 1984). Atualmente, o único grupo de micro-organismos que utiliza esta via para a redução do sulfato são as bactérias redutoras de sulfato, também utilizando sulfato na série de reações que caracterizam sua cadeia respiratória (BARTON, 1995).

Tendo a compreensão dos prejuízos ambientais e ocupacionais que as BRS podem gerar e do seu importantíssimo papel no ciclo do enxofre (Figura 7), assim como no equilíbrio de diversos processos existentes na natureza

(CASTRO *et al.*, 2000) torna-se cada vez mais importante o estudo destes micro-organismos.

Figura 7 - Ciclo biológico do Enxofre



Fonte: MADIGAN *et al.*, 2010.

Além das funções mencionadas acima para as BRS, estes micro-organismos também são importantes com um papel chave na biodegradação de poluentes clorados assim como na metilação do mercúrio (CASTRO & OGRAM, 2000), porém, para que ocorra a atuação efetiva das BRS em cada um dos processos supracitados, depende-se principalmente das condições de anaerobiose com alguma variação decorrente do estado de oxidação do enxofre.

A redução do sulfato a sulfeto caracteriza um processo complexo que ocorre através da via anóxica, onde as BRS atuam. Para que este processo ocorra, é necessário que ocorra a partir de muitos intermediários que resultam

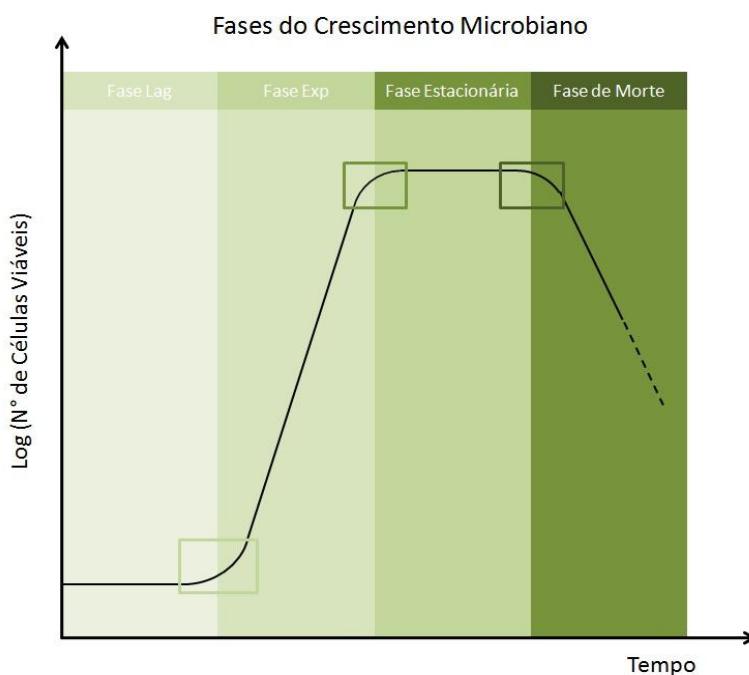
na transferência de oito elétrons. Em uma primeira fase, para ambos os processos, assimilativo e dissimilativo, por meio da ATPsulfurilase ocorre a ativação dos íons sulfato. A enzima ATP sulfurilase é responsável por catalisar a ligação do íon sulfato ao fosfato da molécula de ATP, formando então a molécula de adenosina fosfosulfato (AFS) com a liberação de pirofosfato (PPi). Em um segundo momento, na redução dissimilativa, a AFS é reduzida a sulfito (SO_3^{2-}) através da ação da enzima AFS redutase, pela liberação de AMP (adenosina monofosfato). Já na redução assimilativa, outro fosfato é incorporado à molécula de AFS, formando fosfoadenosinafosfosulfato (FAFS) e, a partir de então, os sulfatos podem ser reduzidos. Para ambos os processos, o sulfito é o primeiro produto gerado pela redução, e assim que é formado já é transformado em sulfeto por intermédio da enzima sulfito redutase (MADIGAN *et al.*, 2010).

Com relação ao tamanho e morfologia deste grupo de micro-organismos, sabe-se que possuem o formato de bacilos curvos e espiralados, com diâmetro de 0,5 a 1 μm e comprimento de 3 a 5 μm (POSTGATE, 1984). Já em relação à temperatura e ao pH, tem-se que as BRS em sua maioria são micro-organismos mesófilos, com um crescimento favorecido em temperaturas entre 25 e 40°C e com o pH próximo a neutralidade, porém, podemos observar a existência de alguns gêneros que suportam pH ácido ou muito alcalino. Além destas características, as BRS possuem grande capacidade de suportarem altas pressões com valores que podem exceder 10^5 kPa, sendo essas as barofílicas. Com isso podemos notar a grande capacidade adaptativa das bactérias redutoras de sulfato tanto em condições amenas como também em condições extremas existentes em vários dos ambientes naturais (POSTGATE, 1984; BARTON e TOMEI, 1995).

1.4.1 Crescimento microbiano

O crescimento bacteriano pode ser descrito como o aumento da população e número de células, resultante de um crescimento e multiplicação de todos os constituintes celulares, sendo assim, aumentos de tamanho celulares decorrentes somente de fenômenos como absorção de água ou outros não podem ser considerados crescimento (BORZANI *et al.*, 2001). A maior parte dos micro-organismos se multiplica através da fissão binária ou então por gemulação. Assim, uma célula dita mãe dará origem a duas células filhas, respeitando para isso certo tempo, que geralmente é chamado de tempo de geração, replicação ou de duplicação. Quando tem-seas condições ideais para a cultura, onde existe a disponibilidade de todos os nutrientes de forma superior à necessidade destes micro-organismos durante certo período de tempo e quando ainda não existe um acúmulo de metabólitos que causem toxicidade, pode-se observar um comportamento de forma exponencial no crescimento microbiano. Assim, pode-se descrever o crescimento microbiano através do comportamento de uma curva que pode ser dividida em várias fases como podemos observar na Figura 8 (ENZIMOLOGIA, 2014).

Figura 8 - Fases do crescimento microbiano



Fonte: ENZIMOLOGIA, 2014.

A primeira fase, fase *Lag*, se caracteriza por ser uma fase de adaptação, onde os micro-organismos presentes na cultura microbiana ainda estão se adaptando a oferta de nutrientes e com as condições de crescimento. Nesta fase não existe um crescimento expressivo do número de células, fazendo com que as contagens padrões de células sejam ineficazes.

Na segunda fase, tida como a fase Log e/ou exponencial, se caracteriza pelo crescimento expressivo e acelerado, uma vez que os micro-organismos possuem a sua disposição diversos nutrientes até mesmo em quantidades superiores às necessárias. Essa fase é uma das mais importantes para a avaliação do crescimento microbiano, pois fornece os principais dados para estudos fisiológicos e cinéticos.

A terceira fase, fase estacionária é caracterizada devido à estagnação do crescimento microbiano, mantendo durante um tempo específico números similares para a contagem de células e populações de BRS podendo ser observada pela região do gráfico onde este se torna constante em um único ponto por algum período de tempo. Nesta fase, o número de células que morrem é proporcional ao número de células que se renovam, diminuindo para um valor constante a velocidade do crescimento. De acordo com a influência do quantitativo de metabólitos tóxicos presentes na cultura, escassez de nutrientes e quando cabível o esgotamento do oxigênio, essa fase pode variar consideravelmente.

A quarta e última fase, fase de morte/declínio, é caracterizada pelo fato de que o número de células que morrem torna-se excessivamente maior que o quantitativo de células que se criam, assim levando à esterilização da cultura microbiana.

1.5 Quantificação Celular – Número Mais Provável (NMP)

A técnica de quantificação através do número mais provável (NMP) foi idealizada por MCRADY (1915) e desde então vem sendo amplamente utilizada tanto na indústria petrolífera quanto nas instituições de pesquisa. Essa técnica se baseia nas teorias da probabilidade, onde tubos com diluições seriadas são dispostos consecutivamente para estimar os valores da concentração bacteriana assim como suas populações presentes em uma amostra.

Essa metodologia, tão empregada em estudos com micro-organismos, permite estimar densidades de populações microbianas em diferentes meios de cultura, analisando desta forma, o crescimento bacteriano através da turvação do meio de cultivo presente nas amostras ou então através da quantificação de produtos metabólitos no meio de cultura, o que torna este meio tóxico (VAZZOLLER, 1995).

Sendo considerada uma técnica de contagem indireta, o método do NMP consiste em realizar diversas séries de diluições sucessivas de uma mesma amostra em meio de cultura apropriado. Após um período pré-determinado para o crescimento microbiano, os tubos que apresentarem a turvação serão considerados os positivos (GONZALEZ, 1996). Para realizar a interpretação dos tubos positivos e negativos, para então se chegar a quantificação estimada do NMP, utiliza-se uma tabela estatística estruturada de acordo com as teorias probabilísticas definidas por HARRIGAN (1998).

Por existir uma literatura extensa com diversos outros métodos de interpretação de padrões de resultado positivos e negativos, muito utilizados na quantificação e detecção microbiana, é difícil saber as razões pelo qual um único método foi eleito pelos organismos reguladores (GARTHIRGHT e BLODGETT, 2003). O NMP é um método simplificado de quantificação microbiana quando em anaerobiose, porém é uma técnica que demanda muito esforço e tempo para se alcançar a precisão necessária.

1.6 Microbiologia Preditiva

A microbiologia preditiva é a área do conhecimento que vem unindo diversas áreas como a microbiologia, estatística e engenharia, com o intuito de prever o comportamento do crescimento de micro-organismos, assim como da produção de seus metabólitos, usando para tal ferramentas da engenharia e da estatística, como equações matemáticas. São avaliadas informações quanto à velocidade do crescimento, velocidade de produção frente a condições ambientais entre outras variáveis que podem ser estudadas (DANNENHAUER, 2010).

Estes estudos são obtidos a partir da comparação do crescimento microbiano, assim como de seus produtos do metabolismo em função do tempo de processamento, onde então poderemos obter valores estimados para a velocidade específica e velocidade instantânea para a formação dos produtos almejados (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Dentre os muitos produtos e metabólitos possíveis de serem estudados, quando se trata de BRS, tem-se que o mais importante é o sulfeto biogênico, devido aos impactos ambientais e econômicos que este produto pode gerar, sendo este o produto visado na presente dissertação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos procedimentos experimentais deste trabalho foram selecionadas amostras de diferentes procedências da indústria do petróleo, apresentando variações na salinidade de 0 a 160g.L⁻¹, ou seja, de água doce com salinidade típica dos oceanos e hipersalinas. As amostras são oriundas de tanques de estocagem, água de formação, tanque de estocagem de óleo diesel, consórcio microbiano, água de mineradora, culturas puras e hipersalinas. Todas as amostras foram cedidas pelo Instituto Nacional de Tecnologia, garantido, dessa forma, a fidedignidade da procedência das mesmas.

Primeiramente os testes foram direcionados para avaliar as populações microbianas de todas as amostras, estabelecendo condições pré-determinadas para o crescimento microbiano a fim de verificar a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e de bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT) que posteriormente serão descritas. Os ensaios foram conduzidos a temperatura de 30°C, com o meio de cultura específico e com as devidas salinidades variando de 0 g.L⁻¹ a 160g.L⁻¹, alcançando assim um amplo espectro das salinidades mais utilizadas para a quantificação de espécies microbianas nesses tipos de amostras.

Após essa análise foi realizada a quantificação do sulfeto biogênico, com o intuito de avaliar a capacidade produtiva de cada amostra, através do método do arraste de sulfeto com quantificação pelo método do núcleo azul de metileno, técnicas essas que serão descritas mais detalhadamente a seguir.

2.1. Meios de Cultura

2.1.1. Meio Postgate E – modificado

O meio de cultura utilizado para a detecção e quantificação, assim como para a avaliação metabólica, de BRS foi o Meio Postgate E – modificado (POSTGATE, 1984). Nesse trabalho, o ácido tioglicólico foi substituído pelo tioglicolato de sódio. A composição do meio e as quantidades necessárias para o volume total de 1,0 L estão listadas na Tabela 1.

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

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

Fonte: O autor, 2015.

Utilizou-se agar para deixar o meio de cultura com uma característica semissólida. Este foi solubilizado em água destilada 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. E com a mesma finalidade, fez-se purga com nitrogênio gasoso durante todo o preparo e distribuição do meio.

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, a temperatura de 121°C (1,1 atm).

Devido às características das BRS, a anaerobiose não é a única condição para garantir o seu crescimento, 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 de 12,4 g.L⁻¹ de tioglicolato de sódio, um agente redutor, em cada frasco da série.

2.1.2. Meio para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (BANHT)

A composição do meio para detecção e quantificação de BANHT está apresentada na Tabela 2. 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. Em seguida, os frascos contendo o meio foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, à temperatura de 121°C (1,1 atm).

Tabela 2 - Composição do meio de cultura para BANHT (1,0 L)

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 g

Fonte: O autor, 2015.

2.1.3. 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 o volume total de 1,0 L está representada na Tabela 3. Após preparo, o pH da solução foi ajustado para 7,6 e a condição de anaerobiose e distribuição foram realizadas como descrito no item 1.1.1. Os frascos com o meio foram auto clavados à 121°C (1,1 atm) por 20 minutos.

Tabela 3 - Composição da solução redutora (1,0 L)

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

Fonte: O autor, 2015.

2.2. **Quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT)**

Para realizarmos a quantificação de BRS e de BANHT presentes em cada amostra, assim como utilizado por PAUL *et al.* (2011), foi utilizado o método do Número Mais Provável (NMP) (MCCRADY, 1915).

O NMP é uma técnica que possibilita estimar a população microbiana de uma amostra pela observação de resultados positivos e negativos em triplicatas de tubos sucessivos, contendo 9,0 mL de meio de cultura, em diluições sucessivas.

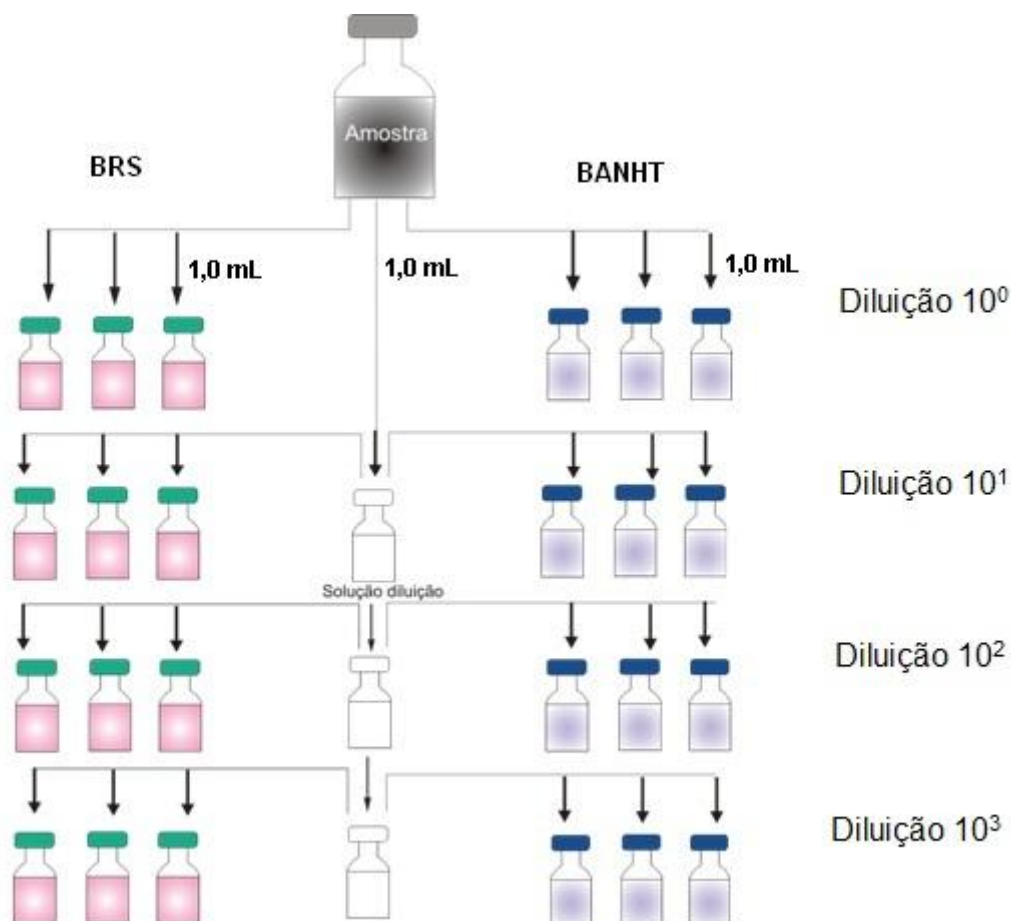
Assumindo que os micro-organismos se distribuem de forma normal no meio líquido, esse método pressupõe que o número de bactérias quantificadas seja igual em amostras de mesmo tamanho.

Utilizou-se neste trabalho diluições que variaram de 10^0 a 10^8 para ambos os grupos microbianos citados. Para a inoculação de cada triplicata de cada diluição foram utilizadas seringas estéreis, sendo todos os procedimentos

realizados em cabine de fluxo laminar vertical garantindo assim um ambiente estéril.

Dessa forma, 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 o meio de cultura e solução de diluição (10^2) foram inoculados com 1,0 mL desta primeira diluição e assim sucessivamente, até completar a sequência da última diluição (10^8). A Figura 9 apresenta o esquema do método descrito.

Figura 9 - Representação do método do NMP em triplicata adotado para quantificação de BRS e BANHT

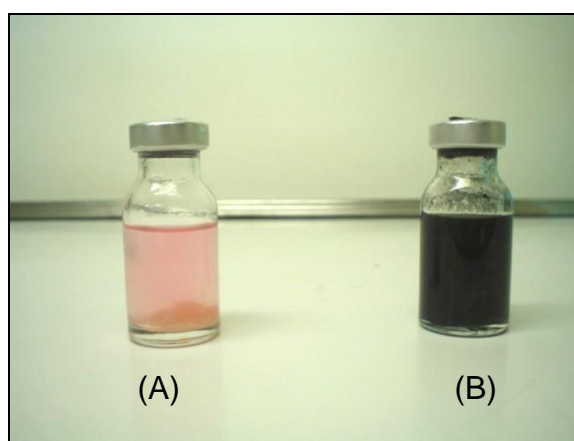


Fonte: ALMEIDA, 2007.

Todos os frascos inoculados com as diferentes amostras foram incubados durante 28 dias em estufa Nova Ética (modelo D411), a temperatura de 30°C tendo seu crescimento monitorado e quantificado a cada 7 dias como descreve a tabela de Harrigan.

Nos frascos contendo meio para BRS a positividade do crescimento é dada pela presença de um precipitado preto oriundo da reação entre o sulfeto produzido com o Fe^{2+} presente na composição do meio, fazendo com que o sulfato seja reduzido a sulfeto, gerando assim o sulfeto ferroso como observado na Figura 10.

Figura 10 - Frasco com meio Postgate E - modificado

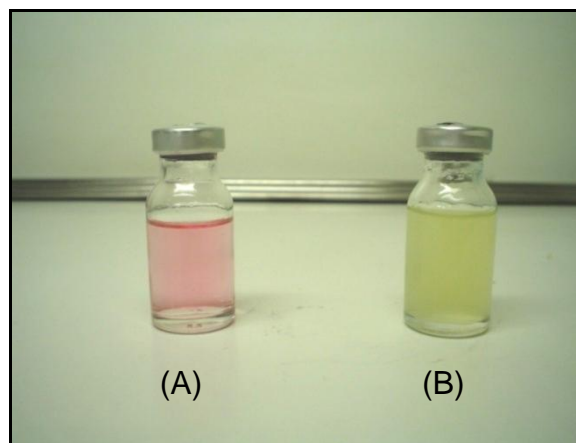


Legenda: sem cultivo de BRS (A) e frasco enegrecido devido à presença de BRS (B).

Fonte: O autor, 2015.

Para as BANHT a positividade do resultado é obtida através da turvação e descoloração do meio de cultura com o aparecimento de um precipitado decorrente do material biológico dos micro-organismos, como observado na Figura 11.

Figura 11- Frasco contendo o meio para BANHT



Legenda: isento do cultivo de bactérias (A) frasco turvo devido à presença de BANHT no meio de cultura (B).

Fonte: O autor, 2015.

Os resultados provenientes do método do NMP são obtidos através das três últimas diluições onde a primeira utilizada é geralmente a que obteve positividade em sua totalidade da triplicada

A quantificação das populações microbianas de BANHT e das BRS foram avaliadas pelo método do NMP de acordo com a tabela de HARRIGAN (1998), sendo essa a técnica utilizada na prática pelos pesquisadores e pela indústria petroquímica.

A Tabela de HARRIGAN (Anexo I) considera valores absolutos das quantificações microbiológicas deixando de lado os erros provenientes da técnica, por exemplo, tratando resultados anormais (quando um frasco na mesma diluição não obteve resultado positivo ou então quando uma diluição da negativo e a seguinte apresenta resultado positivo), limites inferiores e superiores decorrentes da técnica entre outros.

2.3. Quantificação de Sulfeto Total nas Amostras

A concentração total do sulfeto biogênico produzido pelas BRS foi aferida através do método do azul de metileno (JACOBS *et al.*, 1957), sendo este um método espectrofotômetro que se divide em duas etapas, são elas:

Etapa 1: Arraste de H₂S por gás inerte, neste trabalho N₂, e precipitação sob a forma de sulfeto de cádmio.

Nessa etapa, foi realizada a purga das amostras com nitrogênio a uma vazão de 100 mL/min por 30 minutos, utilizando-se para isso um cateter parental. A agulha foi introduzida até o fundo da amostra e o cateter plástico introduzido até um pouco acima do início da amostra, de maneira a ser a conexão de saída do H₂S produzido até então pelas BRS presentes na amostra. O H₂S arrastado é coletado por um sistema de absorção constituído por um frasco *impinger* contendo 50,0 mL de uma solução de CdSO₄ em meio alcalino, sob refrigeração e em ausência de luz, conforme Figura 12. O sulfeto biogênico formado reage com o cádmio da solução formando um precipitado amarelo que segue a seguinte equação:



Figura 12 - Esquema do arraste do sulfeto biogênico das amostras



Fonte: O autor, 2015.

Etapa 2: Quantificação do Sulfeto Biogênico por espectrofotometria, através do método do azul de metileno.

Nessa segunda etapa o H₂S que foi precipitado sob a forma de CdS é liberado em meio ácido através da reação com N,N-dimetil-p-difenilamina,

sendo o cloreto férrico o catalisador da reação, formando desta forma, o núcleo do azul de metileno. Após um período de quinze minutos é adicionado uma solução de fosfato monoácido de amônio, afim de corrigir a coloração devido ao excesso do cloreto férrico, onde o fosfato reage com o ferro, formando um complexo incolor. Após cinco minutos desta correção, a solução resultante é medida no comprimento de onda de 670 nm em um espectrofotômetro (Analytkjena Specord 50), utilizando o branco (ausência de H₂S) como referência.

Para a construção da curva padrão (Anexo II), inicialmente uma solução de 100 mg.L⁻¹ de H₂S foi padronizada por técnica iodométrica, utilizando tiosulfato de sódio, e diluída cem vezes com água bidestilada pré-purgada com N₂. Assim, alíquotas de volumes crescentes (0,2 à 8,0mL) desta solução de tiosulfato de sódio diluída foram adicionadas a balões volumétricos na presença do CdSO₄ em meio alcalino. As absorvâncias das alíquotas foram medidas pelo método do azul de metileno, método este descrito anteriormente.

Através desta técnica podemos alcançar linearidade entre as absorvâncias medidas, entre 0,0056 e 0,57, e as concentrações de sulfeto de hidrogênio, entre 0,2 µg e 12,0 µg, com um caminho ótico de 10 mm (APHA, 1998).

2.4. Avaliação da Atividade Biogênica Semi-Contínua (ABS)

Os arrastes de sulfeto foram conduzidos sob o regime semi-contínuo com o objetivo de minimizar os efeitos provocados decorrentes da acumulação do sulfeto de hidrogênio no meio de crescimento (POSTGATE, 1984).

Para avaliar a ABS foram inoculados 5mL de amostra em um frasco contendo 45mL de meio de crescimento Postgate E- modificado em estufa durante um período de 15 dias (360 horas). Durante esse período, todo o sulfeto de hidrogênio biogênico produzido foi arrastado, de acordo com a metodologia de determinação de sulfetos totais descrita anteriormente no item 3.3 deste trabalho, em tempos pré-determinados conforme a Tabela 4, o que nos permitiu realizar a avaliação do perfil de concentração do sulfeto de hidrogênio biogênico acumulado, indicando desta forma o potencial produtivo

das amostras, conseguindo então estabelecer uma comparação a atividade bacteriana destes micro-organismos.

Tabela 4– Tempo de amostragem para o H₂S produzido.

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

Fonte: O autor, 2015.

2.5. Cálculo das Velocidades Específicas e Instantâneas

Após obtermos os valores da quantificação de sulfeto e do número de células através da técnica do NMP, com valores expressos em mg.L⁻¹ e UFC/mL respectivamente, foram gerados gráficos da concentração de sulfeto obtido pelo tempo de produção, assim como do crescimento das culturas pelo tempo.

Sendo a velocidade instantânea de formação de produtos a inclinação da reta tangente ao ponto da curva que representa a concentração de sulfeto produzido x tempo, pode ser calculada através da equação:

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (1)$$

Como sabemos que com o aumento da concentração de células microbianas no meio de cultura traz consigo um aumento de produção de sulfeto, devido ao aumento de células viáveis, faz-se necessária a análise dos valores expressos através da velocidade instantânea relacionados diretamente com a quantificação de células microbianas presentes na amostra,

representada pela população bacteriana no exato momento (BORZANI *et al.*, 2001), sendo essa a velocidade específica de produção de sulfeto dada pela equação:

$$\mu_p = \frac{1}{X} \times \quad (2)$$

2.6. Determinação do pH Dos Meios de Cultura

O pH de todos os meios de cultura foi determinado utilizando para isso um medidor de pH Quimis (modelo Q400 M1) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 10,0. O valor de referência utilizado para o pH foi de 7,6 \pm 0,4, caracterizando desta forma um ambiente favorável para o crescimento microbiano das BRS.

2.7. Amostras

Para a realização deste trabalho foram selecionadas duas classes de amostras, podendo estas serem divididas em amostras da indústria do petróleo e culturas microbianas de águas de diferentes procedências da indústria do petróleo, uma vez que este é o setor mais prejudicado pela produção do sulfeto biogênico gerado pelas BRS. As amostras apresentaram variações na salinidade entre 0 a 160g.L⁻¹, ou seja, de água doce, de águas com a salinidade típica dos oceanos e de amostras hipersalinas. Com base nestes requisitos foram selecionadas as seguintes amostras:

2.7.1. Amostras da indústria do petróleo

As amostras da indústria do petróleo foram selecionadas com o intuito de atingir uns dos principais setores responsáveis pela produção do sulfeto de hidrogênio dentro das indústrias petrolíferas. Além destas amostras terem sido

oriundas de diferentes unidades exploradoras, elas possuem também variações em suas concentrações salinas. As características e suas salinidades destas amostras da indústria do petróleo podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Característica e Salinidade das amostras da indústria do petróleo.

Característica	Salinidade
Amostra Hipersalina	160,0 g.L ⁻¹
Amostra Hipersalina	80,0 g.L ⁻¹
Amostra Hipersalina	40,0 g.L ⁻¹
Água de Fundo de Tanque de Diesel	40,0 g.L ⁻¹
Água de Fundo de Tanque de Óleo	35,0 g.L ⁻¹
Água de Formação	35,0 g.L ⁻¹
Água de Mineradora	0,0 g.L ⁻¹
Água de Fundo de Tanque de Diesel	0,0 g.L ⁻¹

Fonte: O autor, 2015.

2.7.2. Culturas microbianas

As culturas microbianas foram selecionadas a partir do banco de culturas do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) de maneira que se possa validar os métodos propostos, em culturas onde se é conhecida a presença das BRS assim como das BANHT. Essas culturas, uma mista e as demais puras, assim como as amostras da indústria do petróleo, apresentaram variação em suas concentrações salinas como pode-se observar na Tabela 6.

Tabela 6 - Culturas x Salinidade das culturas microbianas.

Culturas	Salinidade
Cultura Pura de BRS nº1	40 g.L ⁻¹
Cultura Pura de BRS nº2	40 g.L ⁻¹
Consórcio Misto de BRS	5 g.L ⁻¹
Cultura Pura de BRS nº1	0 g.L ⁻¹
Cultura Pura de BRS nº2	0 g.L ⁻¹

Fonte: O autor, 2015.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos após as determinações analíticas e microbiológicas realizadas nas amostras da indústria do petróleo e culturas microbianas, seguindo rigorosamente as metodologias descritas anteriormente. É importante ressaltar que os experimentos para a determinação da quantificação de sulfeto total e a ABS somente foram realizados nas amostras que apresentaram um crescimento no NMP, demonstrando assim a presença de uma população microbiana de tamanho considerável para os tempos definidos, sendo assim, com um potencial de produção biogênica de sulfeto.

3.1. Populações Microbianas Encontradas a partir da Quantificação das BRS e BANHT com Base na Tabela Estatística De Harrigan (1998)

Para facilitar a compreensão e leitura deste trabalho, as amostras da indústria do petróleo e de culturas microbianas serão classificadas e tratadas, a partir de então, por sua devida classificação, como mostra a Tabela 7 e Tabela 8.

Tabela 7 - Classificação das culturas microbianas.

Classificação da Amostra	Procedência	Salinidade (%)
CM1	Cultura Pura de BRS nº1	4,0%
CM2	Cultura Pura de BRS nº2	4,0%
CM3	Consórcio Misto de BRS	0,5%
CM4	Cultura Pura de BRS nº1	0,0%
CM5	Cultura Pura de BRS nº2	0,0%

Fonte: O autor, 2015.

As amostras de culturas microbianas foram classificadas de CM e numeradas de 1 à 5, sendo este o número total destas amostras utilizadas no presente trabalho, como podemos observar na Tabela 7.

Tabela 8 - Classificação das amostras da indústria do petróleo.

Classificação da Amostra	Procedência	Salinidade (%)
R1	Amostra Hipersalina	16,0%
R2	Amostra Hipersalina	8,0%
R3	Amostra Hipersalina	4,0%
R4	Água de Fundo de Tanque de Diesel	4,0%
R5	Água de Fundo de Tanque de Óleo	3,5%
R6	Água de Formação	3,5%
R7	Água de Mineradora	0,0%
R8	Água de Fundo de Tanque de Diesel	0,0%

Fonte: O autor, 2015.

Já as amostras da indústria do petróleo, da mesma forma que as amostras de cultura microbiana, foram classificadas de R e numeradas de 1 à 8, sendo este o número total de amostras deste tipo utilizadas, como apresentado na Tabela 8.

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos para a quantificação das BANHT e das BRS, sempre monitoradas a cada 7 dias do crescimento microbiano e quantificados de acordo com a técnica do NMP considerando os valores estimados, segundo a tabela estatística de HARRIGAN (1998). Também utilizado por PAUL *et al.* (2011) a quantificação das bactérias

3.1.1. Quantificação das BANHT estimada com o NMP com base na tabela estatística de Harrigan (1998)

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para a quantificação de BANHT das oito amostras da indústria do petróleo.

Tabela 9 - Quantificação de BANHT para as amostras da indústria do petróleo

NMP (Número Mais Provável/mL) – BANHT - Amostras da indústria do petróleo				
Amostra	HARRIGAN			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
R1	$1,40 \times 10^3$	$3,00 \times 10^4$	$1,40 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$
R2	$1,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$
R3	$2,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$
R4	$2,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$4,50 \times 10^2$	$4,50 \times 10^2$
R5	$1,40 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$
R6	$4,50 \times 10^2$	$3,00 \times 10^3$	$4,50 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$
R7	$4,00 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$
R8	$4,00 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$

Fonte: O autor, 2015.

Após os 28 dias do crescimento microbiano foi possível observar os valores estimados para as Bactérias Anaeróbicas Heterotróficas Totais (BANHT), expressos na Tabela 9, encontrando valores para R1 de $1,40 \times 10^3$ NMP/mL com 7 dias de crescimento, $3,00 \times 10^4$ NMP/mL com 14 dias, $1,40 \times 10^5$ NMP/mL com 21 dias, mantendo este mesmo valor ao término do crescimento com 28 dias.

Pode-se observar que nas amostras R2 e R3, que representam $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ respectivamente da concentração salina de R1, o valor do NMP das BANHT teve um decréscimo conforme diminuiu-se esta concentração. Em R2 foram obtidos os valores estimados para a população microbiana de $1,50 \times 10^3$ NMP/mL em 7 dias e $4,50 \times 10^3$ NMP/mL para 14, 21 e 28 dias, demonstrando assim uma estabilização do crescimento na segunda semana. Já em R3 foi observado que o crescimento se estabilizou já na

primeira semana, mantendo assim, o mesmo valor para os 7, 14, 21 e 28 dias do crescimento, sendo este valor estimado em $2,50 \times 10^3$ NMP/mL.

Para as amostras de água de fundo de tanque de diesel, R4 e R8, a primeira com salinidade 4% e a segunda na ausência de sal, diferentemente das amostras explicitadas anteriormente, foi observado um aumento no valor estimado do NMP conforme foi retirado a salinidade, onde foram encontrados valores para R4 de $2,50 \times 10^2$ NMP/mL nos dias 7 e 14 e, $4,50 \times 10^2$ NMP/mL para os dias 21 e 28. Na amostra R8, a ausência da concentração salina possibilitou um aumento significativo do crescimento microbiano, em relação à R4, estimando valores de NMP em $4,00 \times 10^4$ NMP/mL aos 7 dias e de $7,50 \times 10^4$ NMP/mL para 14, 21 e 28 dias.

Na amostra R5 após 7 dias foram obtidos valores estimados de $1,40 \times 10^3$ NMP/mL, $7,50 \times 10^3$ NMP/mL após 14 dias e $4,50 \times 10^4$ NMP/mL após 21 e 28 dias.

R6 apresentou seu crescimento das BANHT estimado em $4,50 \times 10^2$ NMP/mL para 7 dias, $3,00 \times 10^3$ para 14 dias estabilizando no 21º dia com valor de NMP estimado em $4,50 \times 10^4$ NMP/mL.

R7, sendo uma amostra de água de uma mineradora, apresentou um perfil um pouco diferente das demais amostras analisadas, alcançando o maior valor estimado de BANHT entre todas as amostras da indústria do petróleo e, tendo sua estabilização do crescimento já na primeira semana, não variando assim seu valor, estimado em $4,00 \times 10^6$ NMP/mL.

Em estudos com o intuito de verificar a contaminação microbiológica de amostras da indústria do petróleo, VIEIRA *et al.* (2011) observaram valores expressivos de bactérias anaeróbias, principalmente de BRS, indicando o consumo dos constituintes da amostra como substrato para seu crescimento. VIEIRA *et al.* (2011) utilizaram, então, o método do NMP com a quantificação baseado na tabela de HARRIGAN (1998) em meio de cultivo Postgate E (Postgate, 1984) durante 28 dias a uma temperatura de 30°C. Os autores encontraram valores estimados para o NMP de $2,5 \times 10^4$ NMP/mL, estando esses resultados equivalentes com a maioria das amostras deste trabalho, variando um pouco para mais ou para menos quanto a sua grandeza.

A Tabela 10 apresenta os resultados estimados para a quantificação de BANHT das cinco amostras de culturas microbianas, amostras essas oriundas da indústria do petróleo, onde foram identificadas, classificadas e isoladas em cultivos específicos podendo então ser analisado a sua atividade de maneira independente.

Tabela 10 - Quantificação de BANHT para as amostras de culturas microbianas

NMP (Número Mais Provável/mL) – BANHT – Culturas microbianas				
Amostra	HARRIGAN			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
CM1	$1,40 \times 10^3$	$3,00 \times 10^4$	$1,40 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$
CM2	$1,40 \times 10^3$	$4,00 \times 10^4$	$4,00 \times 10^4$	$4,00 \times 10^4$
CM3	$1,50 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$
CM4	$2,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$4,50 \times 10^2$	$4,50 \times 10^2$
CM5	$1,40 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$

Fonte: O autor, 2015.

As amostras de culturas microbianas apresentaram valores de NMP com variação dependendo da concentração salina de cada uma delas.

Na amostra CM1 foram obtidos valores estimados em $1,40 \times 10^3$ NMP/mL após 7 dias do crescimento microbiano, tendo este valor aumentado para $3,00 \times 10^4$ NMP/mL em 14 dias, alcançando seu valor máximo em 21 dias, mantendo-se aos 28 dias de cultura, sendo este valor estimado em $1,40 \times 10^5$ NMP/mL.

A segunda cultura pura, amostra CM2, apresentou valores de NMP para as BANHT um pouco inferior aos valores estimados na primeira cultura, atingindo $1,40 \times 10^3$ NMP/mL no sétimo dia e já no décimo quarto dia obteve seu valor máximo, que se manteve até o vigésimo oitavo dia, sendo este valor estimado em $4,00 \times 10^4$ NMP/mL.

A amostra CM3, única cultura mista dentre as culturas microbianas, apresentou o menor valor de todos para o NMP de BANHT. Diferente de todas as amostras já mencionadas anteriormente, já na primeira semana do

crescimento microbiano a cultura atingiu seu ápice. O valor estimado foi de $1,50 \times 10^7$ NMP/mL.

As amostras CM4 e CM5 são da mesma procedência que as amostras que CM1 e CM2, respectivamente, apenas modificadas pela diminuição das suas concentrações salinas, onde foi alterada de 40g.L^{-1} para 0g.L^{-1} . A amostra CM4 apresentou valores menores que CM1 ao eliminarmos a salinidade da amostra, obtendo valores de $2,5 \times 10^2$ NMP/mL nos dias 7 e 14, tendo esse valor levemente aumentado para $4,50 \times 10^2$ NMP/mL nos dias 21 e 28. Já CM5 demonstrou um leve melhor crescimento em relação a CM2 ao removermos sua salinidade, obtendo assim valores de NMP estimados em $1,4 \times 10^3$ NMP/mL em 7 dias, $7,50 \times 10^3$ NMP/mL em 14 dias, alcançando a estagnação do crescimento e uma superação dos valores estimados quando comparados com CM2 em 21 dias com um valor estimado de $4,50 \times 10^4$ NMP/mL.

A presença das demais BANHT é de grande importância, uma vez que as BRS utilizam como substrato substâncias orgânicas de baixo peso molecular, substâncias essas que são geradas a partir da nutrição das BANHT, que excretam essas substâncias de menor peso molecular ao quebrarem moléculas mais complexas em menores, dessa forma gerando os substratos para o crescimento das BRS (VAZOLLER, 1993).

3.1.2. Quantificação das BRS estimada com o NMP com base na tabela estatística de Harrigan (1998)

A Tabela 11 apresenta os valores estimados para as BRS em todas as amostras da indústria do petróleo.

Tabela 11 - Quantificação de BRS para as amostras da indústria do petróleo

NMP (Número Mais Provável/mL) – BRS - Amostras da indústria do petróleo				
Amostra	HARRIGAN			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
R1	-	-	-	-
R2	-	-	-	-
R3	-	-	-	-
R4	-	-	-	-
R5	$7,50 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$
R6	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$
R7	$1,10 \times 10^8$	$1,10 \times 10^8$	$1,10 \times 10^8$	$1,10 \times 10^8$
R8	$4,00 \times 10^5$	$7,50 \times 10^5$	$7,50 \times 10^5$	$7,50 \times 10^5$

Fonte: O autor, 2015.

Como podemos observar na tabela apresentada acima, em algumas das amostras não foi possível estimar o número mais provável de Bactérias Redutoras de Sulfato mesmo tendo sido viável a quantificação para as Bactérias Anaeróbias Totais, sendo essas amostras R1, R2, R3 e R4, como visto por BRANDT *et al.* (2001) nos sedimentos pesquisados do lago de Utah (EUA), em taxas de salinidade de 10% a 15% de NaCl, os micro-organismos halofílicos já não possuíam as mesmas condições de redução de sulfato como observado nas concentrações salinas inferiores.

Diferente das BANHT, as BRS das amostras da indústria do petróleo quantificadas, apresentaram um comportamento muito similar em quase toda a sua totalidade, onde já nos 7 primeiros dias do crescimento atingiram o seu equilíbrio. Com exceção da amostra R8, que apresentou um valor estimado de $4,00 \times 10^5$ NMP/mL no sétimo dia

de cultura, tendo esse valor elevado e estabilizado no décimo quarto dia em $7,50 \times 10^5$ NMP/mL, pudemos observar que as demais culturas seguiram esse comportamento, alcançando valores estimados no sétimo dia que se mantiveram até o último dia do experimento, sendo esses valores estimados em $7,50 \times 10^4$ NMP/mL para a amostra R5, $1,10 \times 10^5$ NMP/mL para a amostra R6 e por fim de $1,10 \times 10^8$ NMP/mL para a amostra R7.

AGRAWAL *et al.* (2010) em estudos com amostras de tanque de separação de óleo e água inoculados em meio de crescimento seletivo para BRS, observaram um crescimento estimado de acordo com a tabela de HARRIGAN (1998) de 10^5 NMP/mL após os 28 dias de crescimento microbiano, demonstrando valores estimados para a quantificação das BRS equivalentes às amostras utilizadas no presente trabalho com as amostras utilizadas por AGRAWAL *et al.* (2010), com algumas variações para mais ou para menos, sendo considerado por QI *et al.* (2013) valores significativos para amostras microbianas variando entre 10^3 e 10^8 NMP/mL, o que nos dá a entender que diferentes amostras nos trarão bactérias redutoras de sulfato com diferentes características de crescimento devido as diferentes condições físico-químicas da amostra onde se encontram.

A Tabela 12 nos traz os valores estimados de NMP para a quantificação das 5 amostras de cultura microbiana oriundas das indústrias petrolíferas e classificadas pelo INT como mencionado anteriormente.

Tabela 12 - Quantificação de BRS para as amostras de culturas microbianas

NMP (Número Mais Provável/mL) – BRS – Culturas microbianas				
Amostra	HARRIGAN			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
CM1	-	-	-	-
CM2	-	-	-	-
CM3	$2,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$
CM4	$2,00 \times 10^4$	$1,10 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$
CM5	$1,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^4$	$9,50 \times 10^4$	$9,50 \times 10^4$

Fonte: O autor, 2015.

Tanto CM1 quanto CM2 quando submetidas as condições de crescimento com a concentração salina à 4% não apresentaram crescimento da BRS isolada, tendo apenas crescimento das BANHT, devido a essas culturas serem específicas de uma salinidade menor, o que corrobora com o trabalho de BRANDT *et al.* (2001) que nos traz elevados valores das populações microbianas assim como da produção do sulfeto biogênico quando observados em amostras com diminuição do índice de salinidade.

Apesar de CM3 ter apresentado um elevado valor estimado de NMP para as BANHT, não foi observado o mesmo comportamento quando se tratou das BRS. Aos 7 dias do crescimento microbiano foi obtido um valor estimado em $2,00 \times 10^4$ NMP/mL que se manteve até o 14º dia, tendo sido este valor aumentado e estabilizado em $3,00 \times 10^4$ NMP/mL aos 21 dias.

Na cultura CM4 foram obtidos os valores estimados para a BRS de $2,00 \times 10^4$ NMP/mL no 7º dia, aumentando para $1,10 \times 10^5$ no 14º dia e por fim, tendo esse valor um pouco aumentado no 21º dia, alcançando assim sua estabilização que se manteve até o 28º dia do crescimento microbiano, tendo esse valor sido estimado em $1,40 \times 10^5$ NMP/mL.

A amostra CM5 apresentou os valores estimados de NMP levemente inferiores aos valores estimados para CM4, contrariando assim a tendência observada nas mesmas amostras quando tratadas

em relação aos valores estimados de BANHT. Esses valores foram obtidos em $1,50 \times 10^3$ NMP/mL no 7º dia, aumentando para $4,50 \times 10^4$ NMP/mL no 14º dia e excedendo um pouco o dobro deste valor no 21º dia, $9,50 \times 10^4$ NMP/mL, que se manteve estável até o 28º dia do crescimento microbiano.

Pode-se observar que apesar dos valores estimados de NMP para as BANHT serem altos ou baixos, esses valores não representam um indicativo quantitativo de BRS na amostra, não sendo possível então estabelecer um comportamento padrão que possa correlacionar o aumento ou decréscimo destas populações, uma vez que os valores estimados das culturas não apresentam correspondência entre as BRS e as BANHT, tendo cada uma a sua especificidade no crescimento de acordo com as condições de substrato da amostra de origem (CASTILLO et al., 2012). Apesar desta independência aparente nas populações microbianas, ambas as espécies necessitam atuar de forma sinérgica, criando e mantendo as condições ideais para os seus crescimentos individuais, onde as BANHT quebrarão as moléculas de maior peso molecular, excretando as de menor peso molecular que serão utilizadas pelas BRS como substrato (VAZOLLER, 1993).

3.2. Quantificação da Produção Biogênica de Sulfeto de Hidrogênio Por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em Amostras da Indústria do Petróleo e Culturas Microbianas

A quantificação da produção de H_2S pelas BRS foi realizada apenas nas amostras que demonstraram um crescimento expressivo durante os ensaios da quantificação das populações microbianas através do método do Número Mais Provável, como já descrito anteriormente. As culturas que apresentaram tal crescimento dentre as culturas microbianas e as amostras da indústria do petróleo, foram: Consórcio Misto de BRS com salinidade a 0,5% (CM3); Cultura Pura de BRS nº1 com salinidade a 0% (CM4); Cultura Pura de BRS nº2 com

salinidade a 0% (CM5); Água de Fundo de Tanque de Óleo com salinidade à 3,5% (R5); Água de Formação com salinidade à 3,5% (R6); Água de Mineradora com salinidade a 0% (R7) e Água de Fundo de Tanque de Diesel com salinidade a 0% (R8).

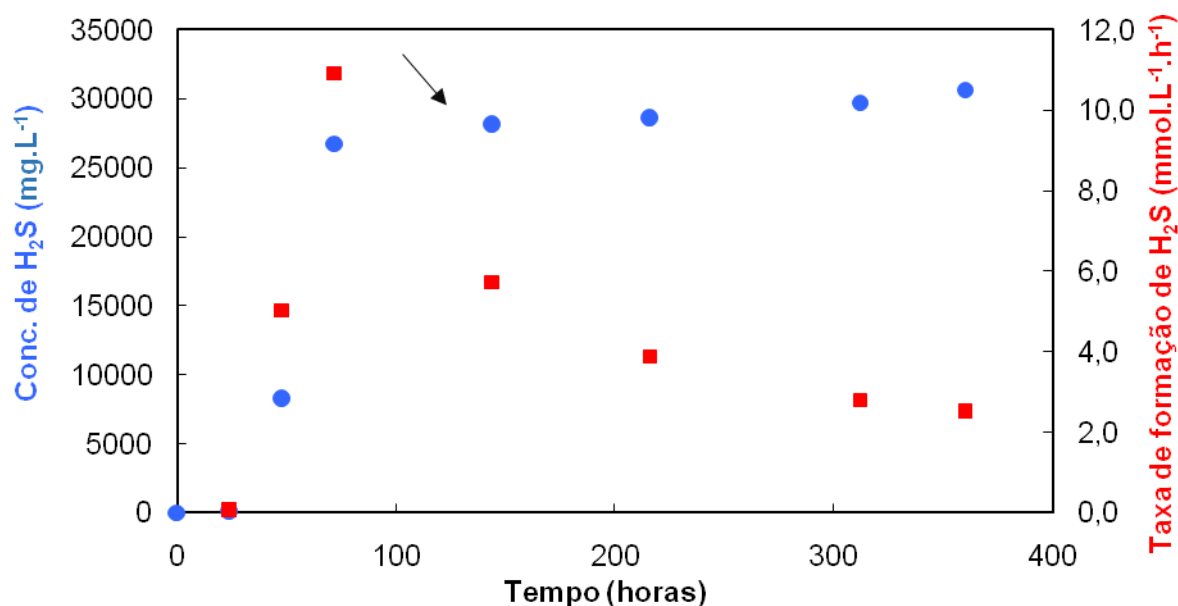
Segundo VIDELA (2003), a detecção do sulfeto biogênico nas diversas amostras sugere a probabilidade da geração de corrosões nas estruturas metálicas destes constituintes, pois o H_2S gerado pelas BRS é altamente corrosivo para essas estruturas em questão. Sendo assim, nessa etapa do trabalho primeiramente realizamos a quantificação total do H_2S produzido, obtendo assim a Atividade Biogênica Semi-contínua (ABS) para então depois correlacionarmos com o Número Mais Provável de células para obter a curva da velocidade instantânea assim como a curva da velocidade específica da formação do produto.

3.2.1. Atividade biogênica semi-contínua de BRS oriundas de amostras da indústria do petróleo

A seguir serão apresentadas uma série de gráficos que trazem os valores obtidos a partir da formação biogênica do sulfeto de hidrogênio pelas BRS, quantificados através da metodologia do azul de metileno, descrito no terceiro capítulo deste trabalho.

Inicialmente a produção biogênica de H_2S das amostras foi avaliada em 7 momentos distintos (01, 02, 03, 06, 09, 13 e 15 dias do crescimento) denotando um comportamento desta atividade biogênica, como poderemos observar nos gráficos abaixo.

Figura 13 -Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Fundo de Tanque de Óleo (R5)

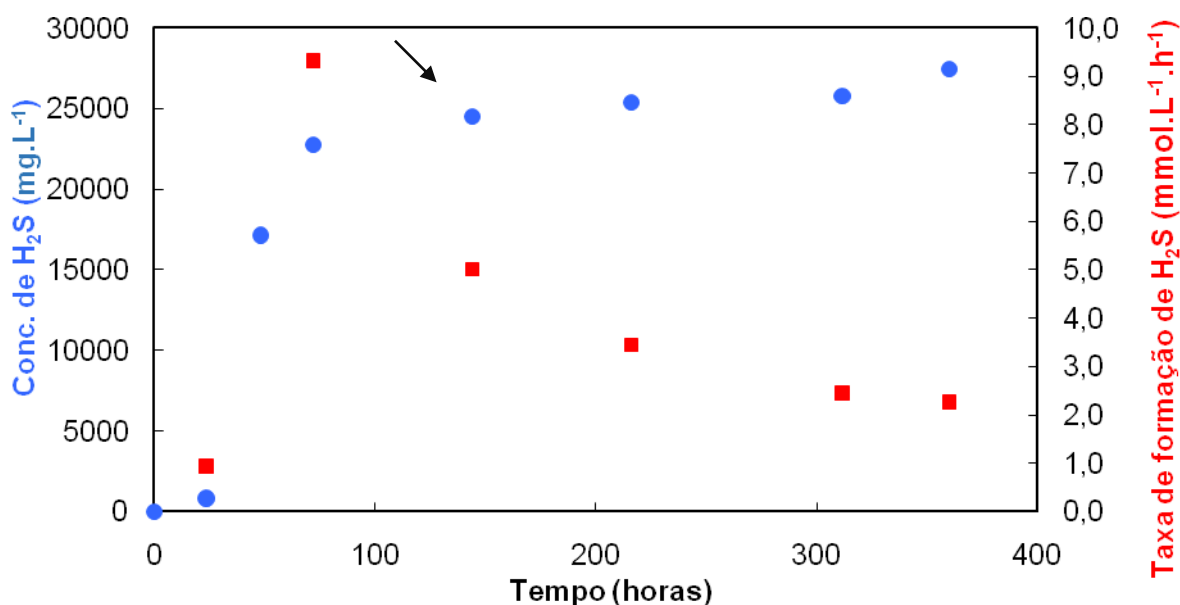


Fonte: O autor, 2015.

Ao longo das 360 horas do crescimento da amostra R5, a concentração do sulfeto produzido que se iniciou em 0mg.L^{-1} , obteve 37mg.L^{-1} em 24 horas tendo, então, uma aceleração nesta produção com valores acumulados de 8.217mg.L^{-1} em 48 horas e 26.737mg.L^{-1} em 72 horas. Próximo do término da primeira semana da cultura, foi obtido uma estabilização da produção de sulfeto, gerando assim um assentamento da curva de concentração de H_2S com valores de 28.077mg.L^{-1} em 144 horas, 28.557mg.L^{-1} em 216 horas, 29.717mg.L^{-1} em 312 horas, finalizando esse acúmulo com um valor de 30.637mg.L^{-1} em 360 horas do crescimento microbiano.

A taxa de formação do produto em questão, obtida através da divisão da concentração do H_2S por sua massa molecular, dividido pelo tempo de cultura, nos mostra o comportamento da estabilização da produção observada nos valores da concentração acumulada de sulfeto, demonstrando dessa forma uma grande aceleração inicial sucedida por uma diminuição da velocidade de produção do sulfeto biogênico.

Figura 14 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Formação (R6)



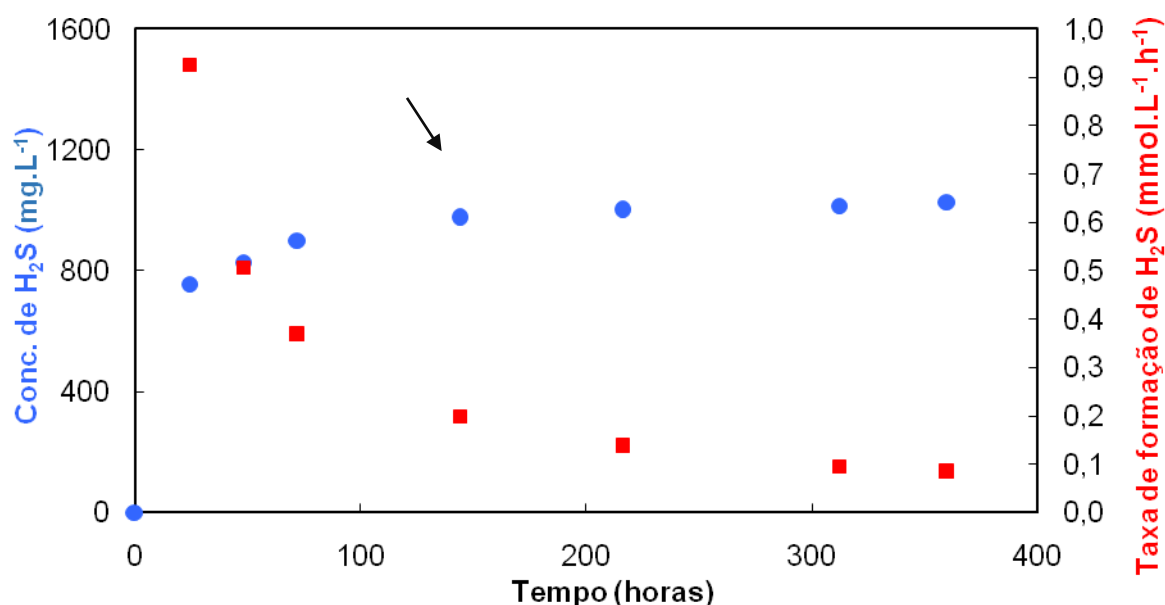
Fonte: O autor, 2015.

A amostra R6 demonstrou um comportamento similar ao de R5, onde podemos observar que existe uma grande produção inicial do sulfeto biogênico, encontrando valores de 744mg.L^{-1} em 24 horas do crescimento, dando um salto para um valor acumulado de 17.064mg.L^{-1} em 48 horas, começando então a estabilização em 72 horas com uma concentração de 22.784mg.L^{-1} . A estabilização dessa produção, novamente foi obtida em 144h com um valor de sulfeto acumulado de 24.524mg.L^{-1} . Após essa redução da produção ainda foi observado um leve aumento na concentração de H_2S , encontrando valores acumulados de 25.384mg.L^{-1} em 216 horas, 25.804mg.L^{-1} em 312 horas e,

27.464mg.L⁻¹ ao término do prazo pré-estabelecido para o crescimento microbiano, com 360 horas.

Através dos valores correspondentes a taxa de formação de sulfeto de hidrogênio pelas BRS existentes na Água de Formação, podemos confirmar o comportamento deste microrganismo, notando que existe uma grande produção inicial nos primeiros dias, alcançando então a estabilização por volta das 144 horas de cultura.

Figura 15 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Mineradora (R7)



Fonte: O autor, 2015.

A amostra da água de mineradora foi selecionada por se tratar de uma amostra de diferente procedência, porém, com grande presença de BRS (MONCUR et al., 2015). Em estudos muito recentes onde foram examinados a influência da oxidação de sulfetos-minerais em águas de superfície de rejeitos de uma mineradora de cobre e zinco, MONCUR et al. (2015) detectaram grande presença de BRS após utilizarem a técnica do NMP, atentando assim para a contaminação ambiental com H₂S devido a produção biogênica destes micro-organismos.

Sendo essa a única amostra não oriunda da indústria petrolífera, foi possível verificar que apesar dos valores de sulfeto de hidrogênio obtidos serem muito menores do que nas amostras anteriores, o comportamento observado anteriormente onde a produção biogênica de sulfeto alcança uma estabilização em 144 horas do cultivo microbiano se repetiu, com a diferença de que não existiu um pico inicial com um valor elevado da concentração de H_2S .

Nas primeiras 24 horas da cultura foi obtido um valor de $756mg.L^{-1}$, aumentando para $827mg.L^{-1}$ em 48 horas e $900mg.L^{-1}$ em 72 horas. Como já descrito, em 144 horas obteve-se a estabilização da produção desta amostra com um valor de $973mg.L^{-1}$, prosseguindo assim com um pequeno acréscimo da sua concentração, obtendo $999mg.L^{-1}$ em 216 horas, $1015mg.L^{-1}$ em 312 horas e por fim, $1028mg.L^{-1}$ no tempo de 360 horas.

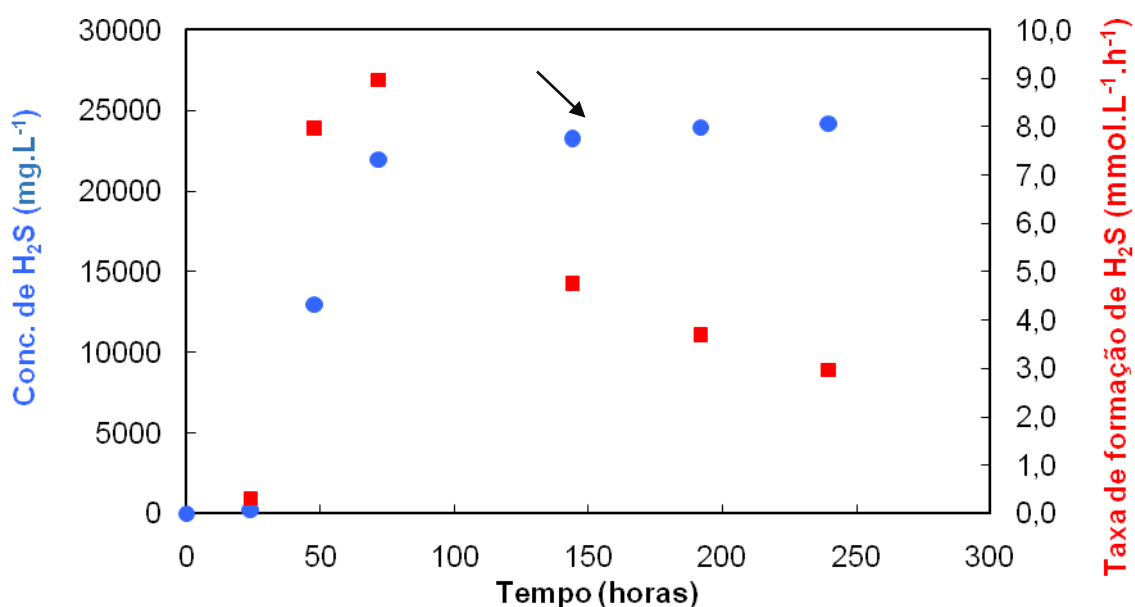
Em decorrência dos baixos valores de produção de H_2S , podemos observar que os pontos referentes à taxa de formação diminuem de forma suave após a elevação inicial referente as primeiras 24 horas do cultivo.

Após observar a tendência do comportamento da formação de sulfeto através da atividade biogênica semi-contínua das 3 amostras da indústria do petróleo analisadas, optou-se por diminuir o tempo de cultivo, uma vez que após o 6º dia do crescimento (144 horas) essa produção não apresentou valores expressivos.

Sabendo que muitas formas de matrizes energéticas vêm sendo utilizadas como forma de combustível (SORENSEN et al., 2011), decidiu-se então realizar em uma nova amostra, dessa vez de Água de Fundo de Tanque de Diesel (R8), a avaliação da ABS nos tempos de 24h, 48h, 72h, 144h, 192h, 240h, diminuindo o processo experimental em 5 dias, para observar se o comportamento se manteria, dessa forma sendo mais rápida a análise, o que coincide com o estudo de SORENSEN (2011), que atenta para a rápida degradação dos constituintes dos diversos combustíveis devido à formação de H_2S , o que torna importante a rápida detecção dos micro-organismos produtores de sulfeto assim como de suas concentrações, afim de

prevenir ou até mesmo controlar tais níveis de contaminação, garantindo assim a boa qualidade do produto, assim o quanto antes estas detecções forem feitas, mais rápido expressarão os resultados almejados.

Figura 16 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Água de Fundo de Tanque de Diesel (R8)



Fonte: O autor, 2015.

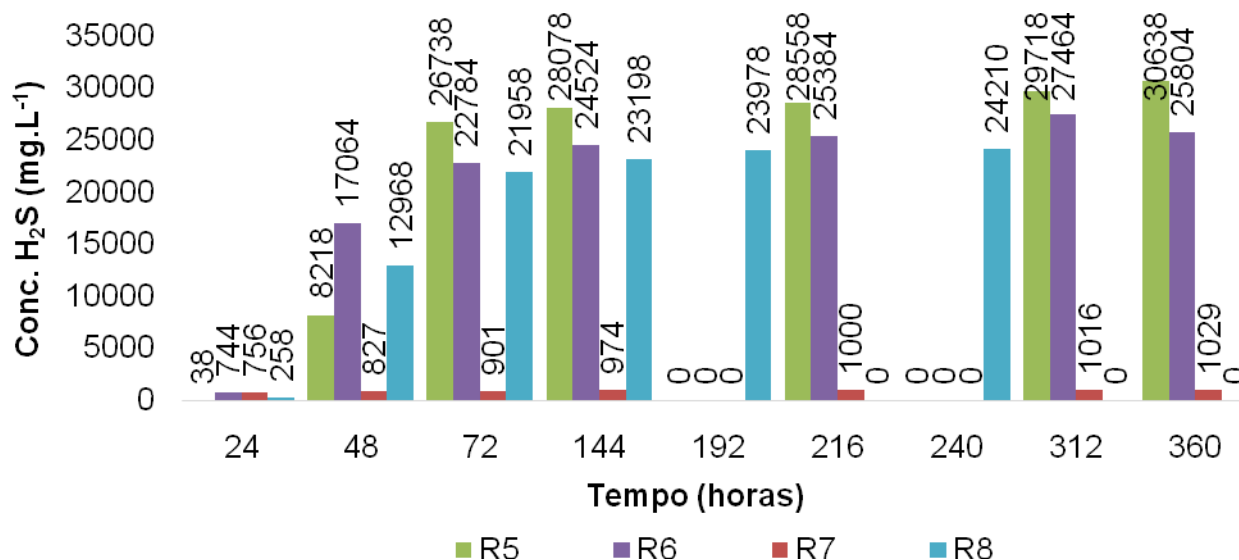
A amostra de Água de Fundo de Tanque de Diesel (R8), da mesma forma que R5 e R6, apresentou uma produção inicial moderada obtendo 257mg.L⁻¹ em 24 horas, aumentando para 12.967mg.L⁻¹ em 48 horas e atingindo um pico com um valor acumulado de sulfeto de hidrogênio de 21.957mg.L⁻¹ em 72 horas do crescimento microbiano. A partir daí, ocorreu a estabilização da produção biogênica com a concentração de 23.197mg.L⁻¹ em 144 horas, aumentando levemente para 23.977mg.L⁻¹ em 192 horas e por fim para 24.209mg.L⁻¹ em 240 horas do cultivo. Os valores encontrados para a produção de sulfeto na amostra da água do fundo de tanque de diesel se alinham com os estudos que demonstram concentrações que podem variar de 400 a 60.000mg.L⁻¹ (SPEIGHT, 1999; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 2003) ou então de 1.000 a 30.000mg.L⁻¹ (MONTICELLO, 2000). O perfil da

produção de sulfeto observado nesta amostra, assim como no trabalho apresentado por SORENSES et al. (2011), demonstrou a elevação inicial da produção de sulfeto e sua estabilização, ambas acompanhando a curva do crescimento celular deste microrganismo.

Os pontos referentes à taxa de formação de H_2S nos confirma mais uma vez o perfil do comportamento da produção biogênica pelas BRS, com um grande pico inicial na velocidade de formação nos primeiros dias de cultivo e após isso tendo um decréscimo dessa velocidade até sua estabilização.

SORENSEN (2011) atenta para a rápida degradação dos constituintes dos diversos combustíveis devido à formação de H_2S , o que torna importante a rápida detecção dos micro-organismos produtores de sulfeto assim como de suas concentrações, afim de prevenir ou até mesmo controlar tais níveis de contaminação, garantindo assim a boa qualidade do produto.

Figura 17 - Avaliação e quantificação da ABS de formação de sulfeto nas amostras da indústria do petróleo.



Fonte: O autor, 2015.

A Figura 17 apresenta o perfil de produção de sulfeto para as amostras da indústria do petróleo, já apresentadas anteriormente de

forma individual. Nota-se que a produção do sulfeto até as 48h se dá de forma lenta, o que coincide com a fase *lag* do crescimento bacteriano, sendo este o período em que as bactérias ainda estão se adaptando ao meio de cultura, dessa forma com uma lenta geração de metabólitos porém com foco na produção de enzimas e na adaptação para o crescimento que será acelerado na próxima fase (MADIGAN et al., 2010).

A importância de enfatizar a fase lag do crescimento microbiano se dá pelo fato de que a aferição do sulfeto instantâneo pode induzir a uma interpretação errônea das concentrações de BRS nas amostras, variando de acordo com a fase do crescimento, já que a capacidade de redução do sulfato pelas BRS está correlacionada com a sua fase do crescimento (TRUONG et al., 2013), sendo então a ABS uma melhor forma desta avaliação já que este método tem uma melhor representatividade da atividade metabólica destes micro-organismos.

Sendo a próxima fase, a fase exponencial do crescimento microbiano, podemos observar uma elevação significativa na geração de sulfeto por todas as amostras, elevando seus valores entre as horas 48 a 72 com valores expressivos médios de 12.750mg.L^{-1} em 48h e 23.826mg.L^{-1} em 72h. Vale ressaltar que por se tratar de aferições regulares, onde retiramos todo o produto periodicamente, evitamos o possível efeito tóxico inibidor do metabólito produzido que em concentrações elevadas interfere na produção do sulfeto pelas BRS (ZHOU et al., 2014).

Estabelecendo um paralelo entre a produção de sulfeto e o crescimento microbiano, confirmamos o observado nos gráficos anteriores, onde notamos a estabilização da produção de sulfeto nas amostras por volta das 144h do crescimento microbiano, o que provavelmente representa a fase estacionária onde o crescimento acelerado das bactérias se estabilizou mantendo-se assim por um tempo até seu decaimento para a fase de morte (MIDGAN et al., 2010).

PENNA et al. (2003), após analisarem a atividade geradora de sulfeto de quatro diferentes amostras de água de formação do Campo de Marlim, que foram inoculadas em meio de cultura e incubadas em

temperatura de 35°C durante 28 dias, obtiveram como maior concentração de sulfeto, 220 mg.L⁻¹ no 28º dia, considerando assim uma concentração significativa. Tendo o trabalho de PENNA et al. (2003) como parâmetro, o presente estudo obteve em todas as amostras analisadas uma concentração da produção biogênica de sulfeto muito maior e em um tempo muito menor, sugerindo assim uma maior contaminação das amostras utilizadas ou então com micro-organismos com maior potencial biogênico do que os do trabalho referenciado. A quantificação do sulfeto produzido pelas amostras de PENNA et al. (2003) foi feita através da metodologia da espectrofotometria utilizando o núcleo do azul de metileno em solução de sulfeto de acetato de zinco para absorver o sulfeto produzido, sendo este o mesmo método utilizado nessa dissertação, apenas modificando a solução absorvedora para uma solução de sulfato de cádmio.

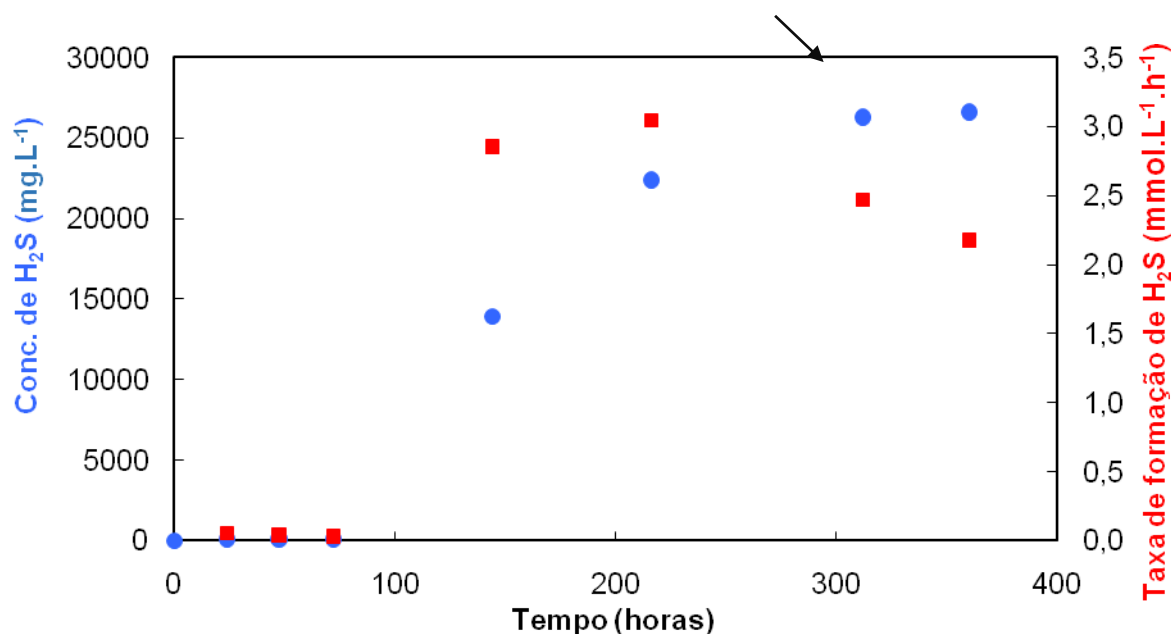
3.2.2. Atividade biogênica semi-contínua de BRS de amostras de culturas microbianas oriundas da indústria do petróleo

As amostras de culturas microbianas utilizadas para a quantificação do sulfeto biogênico produzido pelas BRS foram analisadas da mesma forma que as amostras da indústria do petróleo, através do método colorimétrico do núcleo do azul de metileno, descrito no segundo capítulo. Na amostra CM3, os tempos de coleta para quantificação do sulfeto seguiu exatamente a metodologia, porém, as amostras CM4 e CM5 por terem sido tratadas posteriormente às demais amostras, foram coletadas da mesma forma que a amostra R8. O tempo total de coleta para quantificação, tendo sido reduzido em 5 dias, nos faz economizar muitos dias de experimentos assim como reagentes e soluções, tornando então o trabalho mais sustentável. A redução no tempo total dessa análise só se deu, uma vez que a concentração acumulada da produção biogênica de sulfeto pelas BRS se dá de forma significativa até a fase estacionária deste microrganismo (MADIGAN et

al., 2010), fase esta tendo sido identificada neste trabalho com início em torno das 144h do crescimento bacteriano, o que dessa forma não torna significativo a redução do tempo quando se trata da concentração final acumulada da produção biogênica de sulfeto pelas amostras desta dissertação.

A seguir os gráficos da Atividade Metabólica Contínua das 3 amostras de cultura microbiana analisadas, nos trazem suas concentrações acumuladas e suas taxas de formação de sulfeto que serão posteriormente discutidas.

Figura 18 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Consórcio Misto de BRS (CM3)



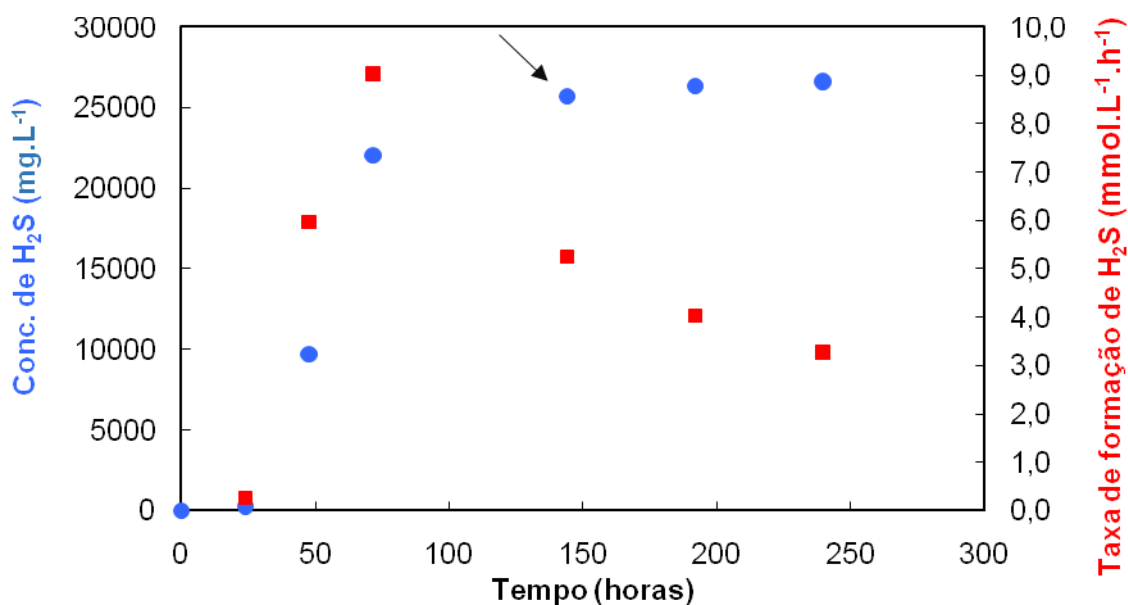
Fonte: O autor, 2015.

A amostra microbiana do Consórcio Misto de BRS (CM3) demonstrou um comportamento um tanto quando distinto quando comparado com às demais amostras analisadas. Ao invés de obtermos uma grande formação de produto já nos primeiros dias do cultivo bacteriano, essa amostra só começou a mostrar valores expressivos no 6º dia (144 horas), nos trazendo o valor de 13.933mg.L⁻¹. Antes disso, a produção de sulfeto biogênico acumulado foi de apenas 46mg.L⁻¹ em 24 horas, 50mg.L⁻¹ em 48 horas e de 53mg.L⁻¹ em 72 horas. Um novo salto

da produção acumulada de sulfeto foi obtido em 216 horas com um valor quantificado em 22.353mg.L^{-1} , estabilizando então somente em 312 horas com um valor de 26.233mg.L^{-1} sendo acrescido para 26.553 em 360 horas do cultivo.

Apesar da formação tardia de sulfeto por essa amostra, foi observado que após esse pico novamente ocorreu a estabilização da produção de H_2S , porém dessa vez não no 6º dia como anteriormente nas demais amostras, mas sim apenas no 13º dia de cultivo.

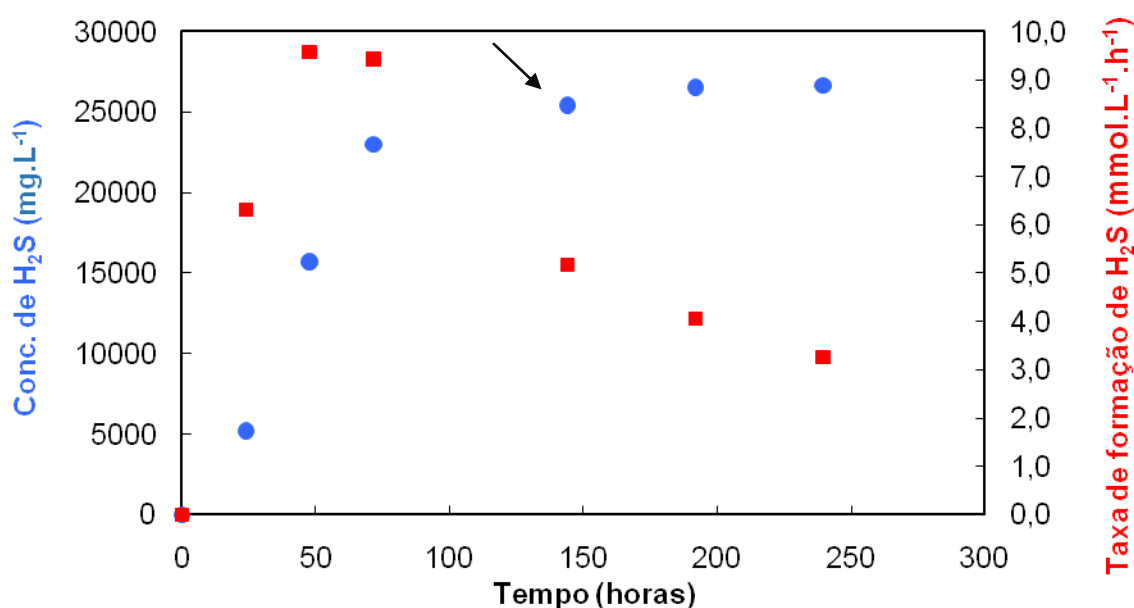
Figura 19 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Cultura Pura de BRS nº1 (CM4)



Fonte: O autor, 2015.

A amostra de Cultura Pura de BRS nº1 voltou a nos trazer o comportamento esperado já obtido nas amostras da indústria do petróleo. Essa amostra iniciou sua produção de forma lenta, com uma concentração de 217mg.L^{-1} em 24, aumentando sua velocidade de formação em 48h com uma quantidade acumulada de sulfeto de 9737mg.L^{-1} . O pico da produção biogênica desta amostra se deu em 72 horas, com seu valor quantificado em 22.047mg.L^{-1} . Seguindo o comportamento de formação já observado nas demais amostras analisadas anteriormente neste trabalho, a 144h do cultivo microbiano obteve-se a estabilização da produção acumulada de H_2S com um valor quantificado de 25.707mg.L^{-1} . Essa produção acumulada aumentou levemente, já dentro da estabilização da formação, para valores de 26.357mg.L^{-1} em 192 horas e para 26.551mg.L^{-1} no término do cultivo.

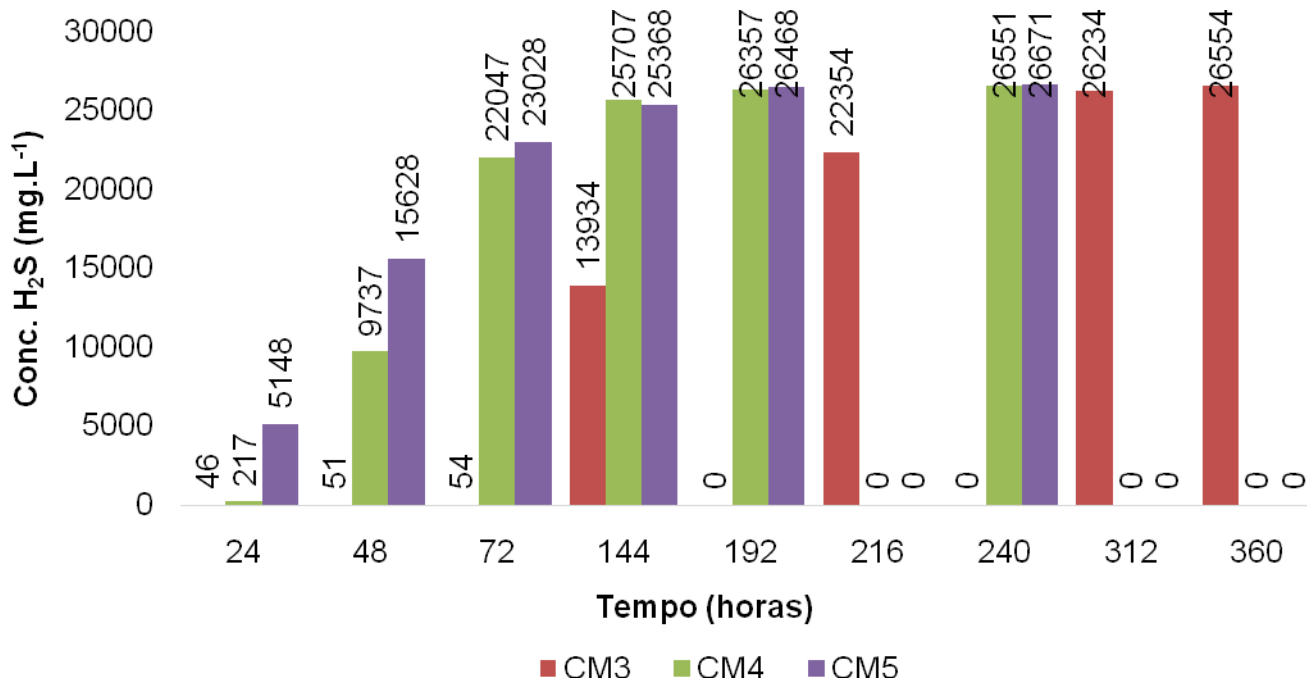
Figura 20 - Atividade Metabólica Contínua da amostra de Cultura Pura de BRS nº2 (CM5)



Fonte: O autor, 2015.

Com uma produção inicial não tão lenta quando comparado com às demais amostras deste trabalho, CM5 obteve já em 24 horas de cultura um valor de 5.148mg.L⁻¹ de concentração de H₂S, sugerindo assim um menor tempo na fase *lag* do que nas amostras observadas por CORTAS (2011), praticamente triplicando este valor para 15.628mg.L⁻¹ em 48 horas do crescimento e atingindo seu pico produtivo as 72 horas com um valor de 23.028mg.L⁻¹. Similar às demais amostras, a estabilização da produção do sulfeto biogênico se deu em 144 horas do cultivo, atingindo um valor de sulfeto acumulado de 25.368mg.L⁻¹, que após esse patamar cresceu lentamente até o término do experimento, com valores de 26.468mg.L⁻¹ em 192 horas e de 26.670mg.L⁻¹ em 240 horas.

Figura 21 - Avaliação e quantificação da ABS de formação de sulfeto nas amostras de culturas microbianas oriundas da indústria do petróleo.



Fonte: O autor, 2015.

A Figura 21 nos apresenta o perfil de produção do sulfeto biogênico acumulado produzido pelas culturas microbianas, mista e puras, oriundas de amostras da indústria do petróleo, tratadas primariamente pelo INT onde foram isoladas e caracterizadas.

Segundo BACHMANN et al. (2014) a relevância de se detectar as populações microbianas presentes nos combustíveis, assim como sua produção de metabólitos (no caso das BRS o sulfeto de hidrogênio) se dá pelo fato destes metabólitos deteriorarem os constituintes dos combustíveis, necessitando assim de uma identificação que permita o tratamento prévio com métodos biotecnológicos e/ou físico-químicos.

Da mesma forma que observado nas amostras da indústria do petróleo utilizadas na presente dissertação, nota-se que nas primeiras 48h existe uma baixa produção de sulfeto de hidrogênio pelas BRS presentes nas amostras, o que deve ocorrer devido ao estagiamento destes micro-organismos na fase lag do crescimento microbiano (MADIGAN et al., 2010; CORTAS, 2011). Durante a fase exponencial do crescimento, localizada entre as 48h e 144h, pode-se observar que em todas as amostras houve um “salto” na produção de H₂S atingindo valores muito elevados quando comparados com PENNA et al. (2003), que consideraram seus resultados significativo ao obter valores amostrais de 220mg.L⁻¹ ao término da curva de crescimento das BRS utilizadas em seu trabalho, valores estes consideravelmente menores que os dessa dissertação, o que corrobora com os resultados obtidos na estimativa da quantificação destes micro-organismos para cada amostras, realizadas através do NMP segundo a tabela de HARRIGAN (1998).

O fato de termos utilizado neste trabalho a ABS, o que fez com que constantemente estivéssemos removendo o H₂S produzido, possibilitou a grande atividade biogênica por parte dos micro-organismos presentes nas amostras analisadas, já que concentrações de sulfeto livre no meio de cultura podem agir de forma tóxica e afetar o crescimento das BRS (ZHOU et al., 2014),

É importante ressaltar que tanto em CM3 quanto em CM4 e CM5, apesar do isolamento dos micro-organismos em algumas dessas culturas ter ocorrido, a presença de outras bactérias anaeróbias heterotróficas é comum (VOORDOUW, 2011) e se faz necessário, afim de que estas promovam a

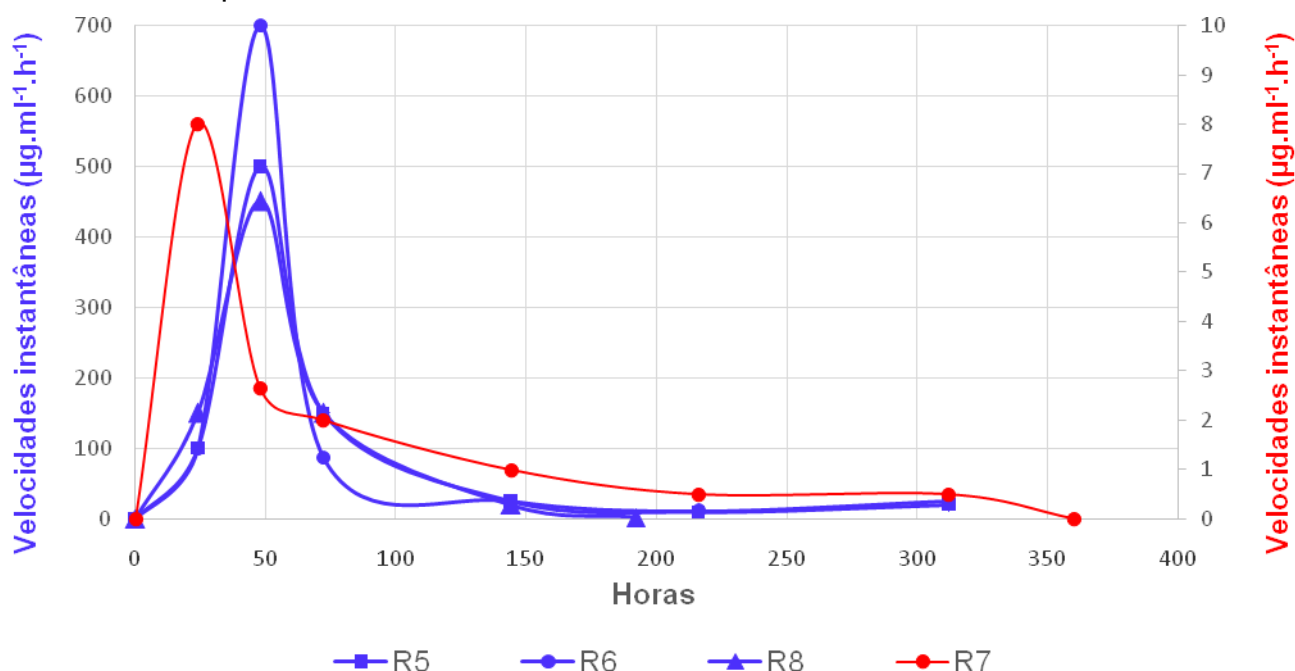
quebra dos hidrocarbonetos mais complexos em moléculas menores que serão utilizadas pelas BRS como substrato para o seu crescimento (VAZOLLER, 1993), assim compreendemos as relações ecológicas de mutualismo e competição que favorecem os cultivos microbianos com seus consórcios em culturas mistas e puras de bactérias redutoras de sulfato (STAMSet al., 2006).

Ao compararmos os valores obtidos para CM3 com de CM4 e CM5 podemos observar que apesar da redução do tempo de cultivo das amostras, já é possível atingirmos a estabilização da produção biogênica de sulfeto na fase estacionária do crescimento microbiano (MADIGAN, 2010), tornando assim desnecessário a continuação dos ensaios em tempo mais longos uma vez que a concentração acumulada de sulfeto não sofrerá grandes aumentos devido ao microrganismo que se prepara para seu decaimento produtivo na fase de morte, assim não gerando uma produção significativa, como pode se observar na fase exponencial da curva de crescimento microbiana destas bactérias em questão (MADIGAN, 2010).

3.2.3. Velocidades instantâneas das amostras da indústria do petróleo

A Figura 22 apresenta os valores das velocidades instantâneas de formação de sulfeto biogênico para as amostras da indústria do petróleo.

Figura 22 – Velocidades instantâneas de formação de H₂S para as amostras da indústria do petróleo.



Fonte: O autor, 2015.

Os resultados que o gráfico apresentado na Figura 22, traz que entre todas as amostras da indústria do petróleo R6 foi a que apresentou maiores valores para a velocidade instantânea de formação de H_2S , alcançando valores de $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 24h do crescimento, tendo esse valor aumentado para $700\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 48h e reduzindo constantemente até o fim do crescimento.

A amostra R5 apresentou valores de $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 24h elevando esse valor para $500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 48h e após isso reduzindo significativamente até a estabilização com valores de formação próximos a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ao término dos experimentos.

Similar a amostra R5, foi obtido para R8 valores de $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 24h, aumentando para $450\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 48h do crescimento e por fim diminuindo até atingir valores próximos a $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 360h do cultivo microbiano.

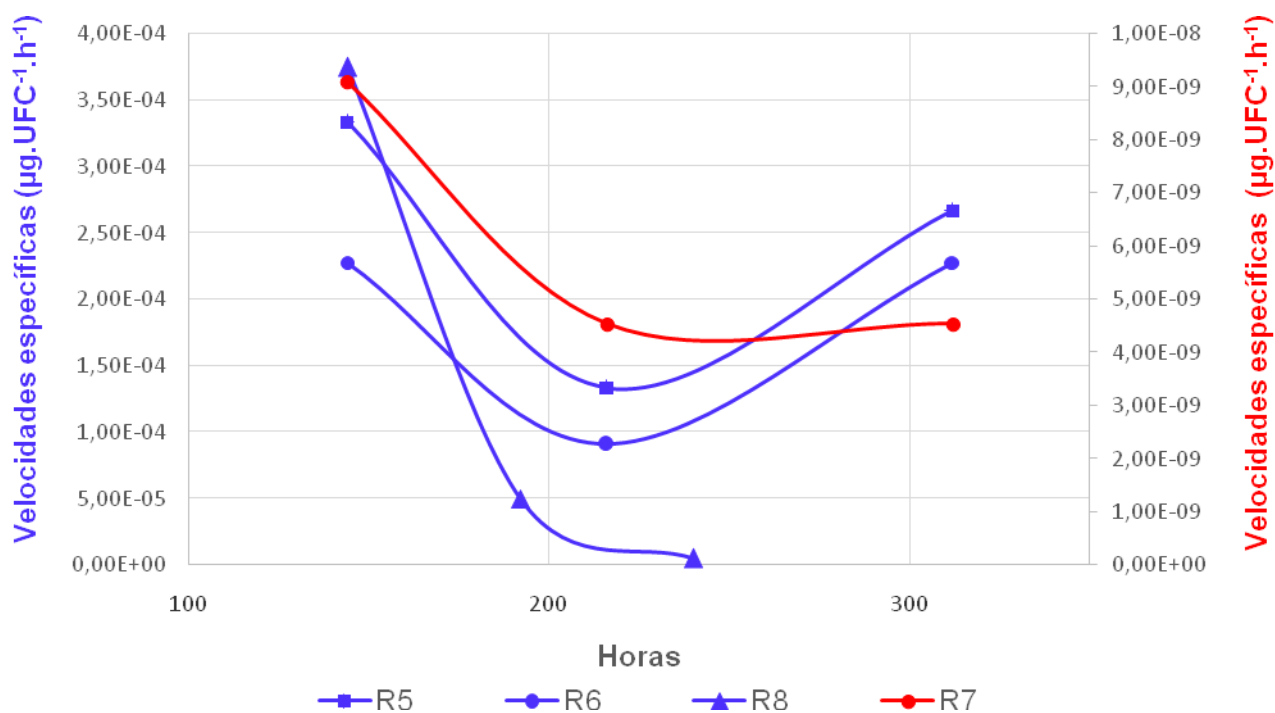
Apesar de ter demonstrado valores de formação de sulfeto biogênico muito inferiores as demais amostras, a amostra R7 apresentou um comportamento muito parecido com as outras, atingindo seus maiores valores nas primeiras 24h, sendo $8\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Após esse momento sua produção reduziu significativamente, assim como R8, chegando próximo a $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 360h do crescimento.

É possível observar a elevação dos valores da velocidade instantânea de formação de sulfeto biogênico nas primeiras 48h do cultivo microbiano, devido ao excesso de nutrientes disponível para o consumo microbiano no meio de crescimento, assim como o decréscimo da sua velocidade devido a multiplicação das populações bacterianas e ao consumo dos substratos.

3.2.4. Velocidades específicas das amostras da indústria do petróleo

A razão entre a produção de sulfeto biogênico e a população bacteriana presente na amostra (determinada previamente pelo método do NMP) nos fornecerá a velocidade específica de produção de sulfeto biogênico, nos dando assim uma visão diversificada quanto ao potencial biogênico das BRS. Estes dados são apresentados pela Figura 23.

Figura 23 -Velocidades específicas de formação de H₂S para as amostras da indústria do petróleo.



Fonte: O autor, 2015.

Com o cálculo das velocidades específicas foi possível obter para R5 valores de $3,33 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 144h, reduzindo para $1,33 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 216h do crescimento e por fim voltando a crescer com um valor de $2,67 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 312h do crescimento microbiano.

R6 e R8 apresentaram valores da mesma grandeza que R5, sendo para R6 esses valores obtidos em $2,27 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 144h, $9,09 \times 10^{-5} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 216h e voltando para o valor de $2,27 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 312h do

crescimento microbiano. Para R8 os valores foram de $3,75 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 144h, decaindo para $5,00 \times 10^{-5} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 192h e continuando a decair até um valor de $5,00 \times 10^{-6} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 240h do crescimento microbiano.

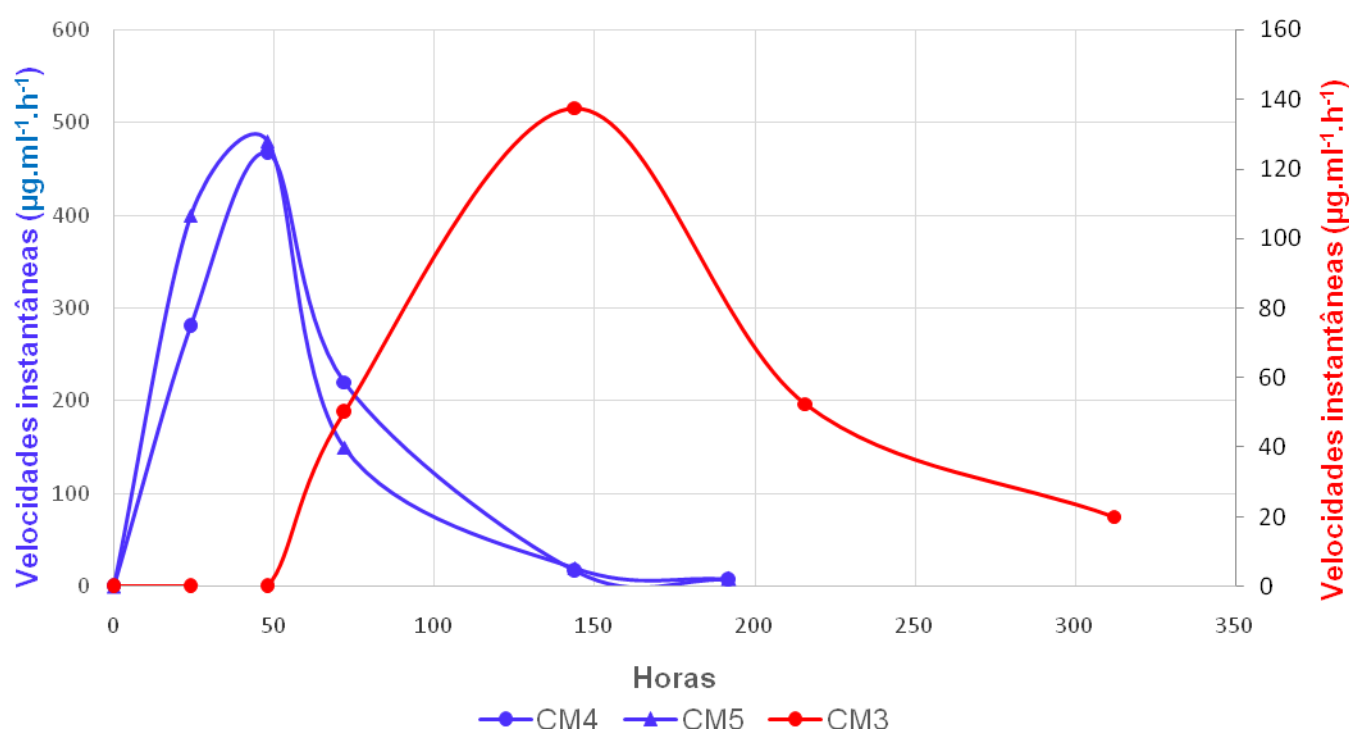
Diferente das amostras anteriores, R7 demonstrou valores menores que as demais, sendo então a única que não apresentou valores para a velocidade específica de formação de sulfeto biogênico na mesma grandeza, apesar de manter o comportamento das outras amostras. Para R7 foi possível observar valores de $9,09 \times 10^{-9} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 144h, decaindo para $4,55 \times 10^{-9} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 216h e, então, mantendo-se neste mesmo valor em 312h do cultivo microbiano.

Os resultados obtidos nos cálculos das velocidades específicas nos confirmam a fragilidade da quantificação do sulfeto biogênico, assim como o potencial de produção das populações microbianas, devido ao longo tempo necessário (28 dias) para se obter os valores totais de células. Porém quando alinhadas com a técnica da ABS podemos obter o real potencial biogênico de sulfeto por parte destes micro-organismos em um tempo muito menor, o que é de suma importância como já descrito por BACHMANN et al. (2014), prevenindo assim a corrosão ou exposição ocupacional por parte dos trabalhadores devido à produção do H_2S , tornando mais fácil a implicação de medidas preventivas que irão inibir a produção do sulfeto.

3.2.5. Velocidades instantâneas das amostras de culturas microbianas

A Figura 24 apresenta os gráficos dos valores para as velocidades instantâneas de formação de sulfeto biogênico para as amostras de culturas microbianas avaliadas neste trabalho.

Figura 24 - Velocidades instantâneas de formação de H₂S para as culturas microbianas.



Fonte: O autor, 2015.

Os resultados obtidos para as amostras de culturas microbianas, apresentaram valores e comportamentos similares aos observados nas amostras da indústria do petróleo.

Pode-se observar que os maiores valores encontrados para as velocidades Instantâneas de formação de H₂S se deram na amostra CM5, que apresentou valores de 400µg.ml⁻¹.h⁻¹ em 24h e atingiu seu ápice em 48h com uma velocidade de 480µg.ml⁻¹.h⁻¹. Após esse pico, a velocidade instantânea de formação decaiu gradativamente, com valores de 150µg.ml⁻¹.h⁻¹ em 72h,

$20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 144h, chegando a um valor de $8\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 192h do crescimento microbiano.

CM4 apresentou comportamento e valores análogos a CM5, onde foi possível observar valores de velocidade instantânea de $280\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 24h do crescimento, atingindo seu máximo de $466\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 48h e decaindo para valores de $220\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 72h, $16\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 144h, até obter o valor de $7\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 192h do crescimento.

A amostra do consórcio microbiano, CM3, apresentou valores e comportamento único, não podendo ser comparada com as demais amostras de culturas microbianas utilizadas neste estudo. Essa amostra se manteve com a velocidade instantânea de formação de H_2S muito próxima de $0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ até as 48h do crescimento microbiano, aumentando assim sua velocidade instantânea de geração de sulfeto as 72h com um valor de apenas $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. A maior velocidade atingida por CM3, se deu às 144h do crescimento, com um valor de $137\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e após isso decaiu para $52\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 216h e por fim chegando a $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 312h do crescimento microbiano.

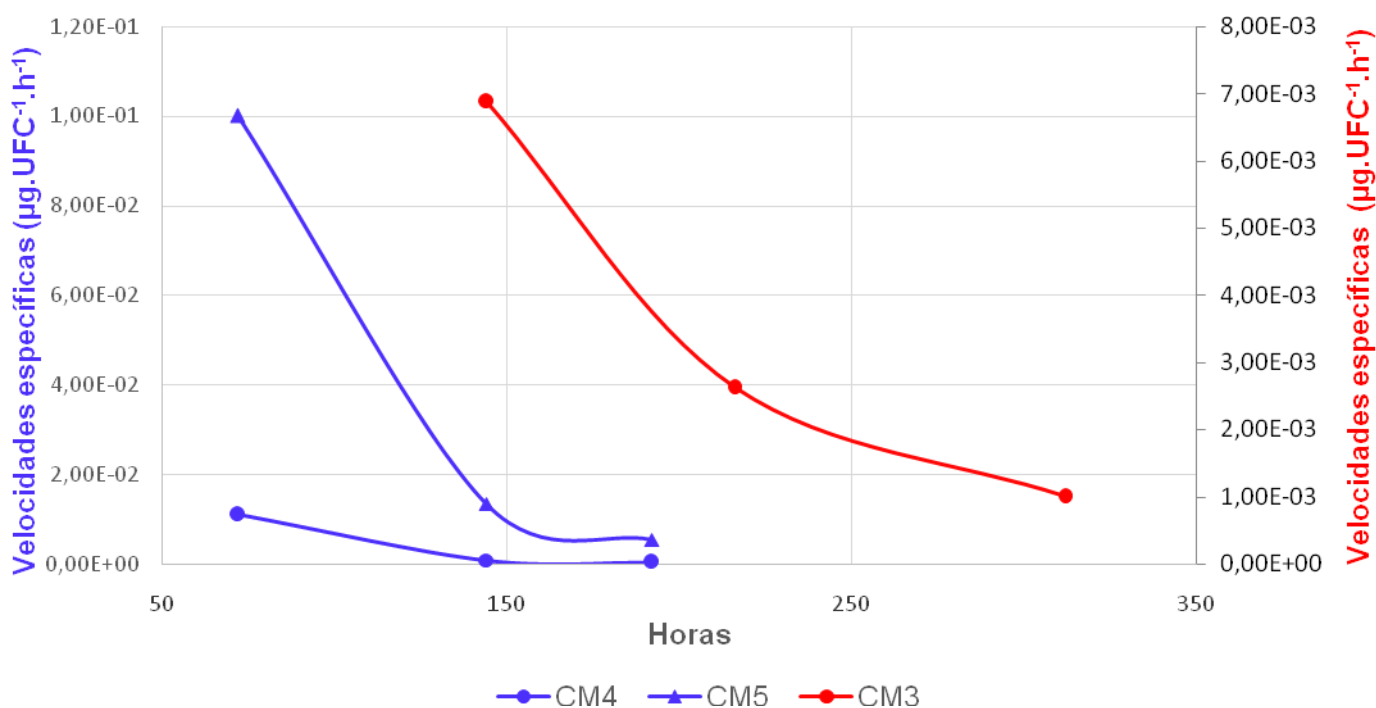
Com isso pudemos observar que enquanto as culturas puras apresentaram uma velocidade de geração elevada logo nos primeiros dias do crescimento, CM3 demorou alguns dias para que essa velocidade tomasse valores expressivos, só tendo esse valor sido constatado em 144h do crescimento bacteriano.

Se estabelecermos uma comparação entre o tamanho das populações de BRS, a produção final de sulfeto acumulado e as velocidades instantâneas podemos ver que apesar de um retardamento na produção pelas BRS da amostra CM3, essa amostra consegue atingir valores similares aos valores obtidos por CM4 e CM5, demonstrando assim uma compensação na produção de sulfeto biogênico em um momento tardio onde as demais amostras já estão tendo sua produção estabilizada.

3.2.6. Velocidades específicas das amostras de culturas microbianas

A Figura 25 apresenta os valores obtidos para as velocidades específicas de formação do sulfeto biogênico para as amostras de culturas microbianas, obtidas através da razão entre a produção de sulfeto biogênico e as populações microbianas, obtidas a partir do método do NMP.

Figura 25– Velocidades específicas de formação de H₂S para as culturas microbianas.



Fonte: O autor, 2015.

As amostras de culturas microbianas demonstraram valores para a velocidade específica de formação de H₂S distintos entre si. Apesar das 3 amostras analisadas nesta etapa terem apresentado um comportamento similar, seus valores foram todos de diferentes grandezas.

CM4 apresentou valores de $1,10 \times 10^{-2} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 72h do crescimento, tendo esse valor diminuído significativamente para $8,33 \times 10^{-4}$ em 144h e

mantendo-se próximo a esse valor com $3,57 \times 10^{-4} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 192h do cultivo microbiano.

A cultura pura CM5 foi a amostra que apresentou as maiores velocidades específicas de formação de sulfeto biogênico entre todas as amostras analisadas nesta etapa do trabalho, sendo possível observar valores de $1,00 \times 10^{-1} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 72h do crescimento, valor esse que reduziu gradativamente atingindo $1,33 \times 10^{-2} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 144h e por fim com um valor de $5,33 \times 10^{-3} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 192h do crescimento.

CM3 foi a amostra dentre as culturas microbianas que apresentou o comportamento mais estável, tendo assim todos os 3 pontos onde foram aferidos a velocidade específica de H_2S estando na mesma ordem de grandeza. Para as primeiras 144h do cultivo microbiano obteve-se um valor de $6,88 \times 10^{-3} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, valor este que reduziu constantemente para $2,63 \times 10^{-3} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 216h e por fim chegando a uma velocidade específica de $1,00 \times 10^{-3} \mu\text{g.UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 312h do crescimento deste consórcio de BRS.

CONCLUSÕES

Após a realização dos diversos ensaios para a análise da atividade biogênica semi-contínua de produção de H_2S nas diferentes amostras, pode-se concluir que:

- Dentre as amostras oriundas diretamente da indústria do petróleo R7 foi a que obteve o maior número estimado para a quantificação das BRS, porém foi a amostra que apresentou a menor geração de sulfeto biogênico, atingindo concentrações mais de 20 vezes menor quando comparada com as demais amostras, demonstrando um baixo poder de formação de H_2S ;

- A amostra R5 foi a amostra com o menor valor estimado para a quantificação das BRS, mas o valor obtido para a quantificação de sulfeto biogênico foi a maior entre as amostras de sua categoria, podendo concluir então que suas células possuem um maior potencial biogênico de produção de H_2S ;

- Nas amostras de culturas microbianas observamos que para as 3 amostras avaliadas quanto a sua viabilidade, todas apresentaram valores análogos quando se tratou na quantificação estimada através da técnica do NMP, assim como o valor final da concentração de sulfeto acumulada, apenas CM3 tendo uma produção tardia em relação às demais amostras, porém ao final do período pré-determinado alcançou valores para a concentração de H_2S na mesma faixa que as demais culturas;

- Analisando os gráficos de velocidade instantânea para as amostras da indústria petrolífera e para as amostras de culturas microbianas, podemos concluir que esses dados representam bem o comportamento observado quanto ao NMP e quanto à produção biogênica de sulfeto, podendo assim estimar as amostras com maior ou menor potencial de formação de sulfeto;

- As velocidades específicas para as amostras da indústria do petróleo e para as amostras de culturas microbianas nos permitem concluir que o número

de células é importante quando se trata da formação de sulfeto, porém não deve ser o único parâmetro analisado;

- Conclui-se então, que a previsão do potencial de formação de sulfeto biogênico apenas pelo NMP nem sempre é fidedigno, necessitando de outras formas de análise;

- Melhores previsões são obtidas através da avaliação da atividade biogênica semi-contínua, além deste método ser menos laborioso e expressar seus resultados em menor tempo que o NMP;

- A técnica se mostrou eficaz tanto para as amostras da indústria petrolífera quanto para as amostras de culturas microbianas.

Sugestões para trabalhos futuros:

Testar a técnica da atividade biogênica semi-contínua, associada a técnicas de biologia molecular afim de estabelecer uma ligação entre a fenotipagem e genotipagem com a geração de sulfeto.

REFERÊNCIAS

ABBAD-ANDALOUSSI, S. et al. Multicriteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds. *Enzyme Microb. Technol.*, v.32, p.446-454, 2003.

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*, v.16, p. 12-18, 2010.

ALMEIDA, K. Y. M. *Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em amostras de Petróleo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ. 77 f. 2007.

APHA, AWWA, WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20. ed., Washington, 1998.

BACHMANN, R. T., JOHNSON, A. C., EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.86, p.225-237, 2014.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understanding and state-of-the-art methods of study. *Int Biodeterior Biodegradation*, v.53, p.177-183, 2004.

BEECH, I.B., GAYLARDE, C.C. Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*, v.67, p.201-207, 1989.

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

BARTON, L.L.; TOMEI, F.A. Characteristics and activities of sulfate reducing bacteria. In: BARTON, L.L. *Biotechnology handbook 8. Sulfate Reducing Bacteria*. New York: Plenum Press, 1995.

BORZANI, W. et al. *Biotecnologia Industrial*, v. 2, Engenharia Bioquímica. Editora Blucher, 554p., 2001.

BRANDT, K. K. *et al.*. Sulfate reduction Dynamics and Enumeration of Sulfate-Reducing Bacteria in Hypersaline Sediments of the Great Salt Lake (Utah, USA). *MicrobEcol* v. 41, p. 1–11, 2001.

CANFIELD, D. E.; DEMARAIS, D. Journal of Aerobic Sulfate Reduction in Microbial Mats. *Science*. v. 251, p.1471-1473, 1991.

CASTANEDA, H. & BENETTON, X. D. SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel electrode interface when exposed to artificial seawater conditions. *Corrosion Science*, v.50, p.1169-1183, 2008.

CASTILLO, J. et. al. Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum. *Science of the Total Environment*, v.439, p.106–113, 2012.

CASTRO, H. F., WILLIAMS, N. H., OGRAM, A. Phylogeny of sulphate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 31, p 1-9, 2000.

CHERNICHARO C. A. L. Reatores Anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, v. 5, 2000.

CORRÊA, O. L. S. *Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

DANNENHAUER, C. E. *Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 73 p., 2010.

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

ENNING, D. et al. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. *Environ. Microbiol*, v.14, p.1772-1787, 2012.

ENZIMOLOGIA E TECNOLOGIA DAS FERMENTAÇÕES. Crescimento microbiano. Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal Fluminense. Disponível em: <http://www.uff.br/enzimo/index.php?option=com_content&view=article&id=17&Itemid=7>. Acesso em: 20 nov. 2014.

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

FEIO, M. J. et al. Desulfovibrioalaskensis sp. nov., a sulphate-reducing bacterium from a soured oil reservoir. *Int J SystEvolMicrobiol*,v.54, p.1747-52, 2004.

FIORESE, E. K. *Estudo Experimental e de Modelagem da Fluidodinâmica de Sistemas Água/Óleo*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, SC. 92f. 2004.

GALVÃO, M. M. *Efeito do potencial de proteção catódica na corrosão microbiologicamente induzida*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

GARTHRIGHT, W. E., BLODGETT, R. J. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. *Food Microbiol*. 20, p 439-445, 2003.

GENTIL, V. *Corrosão*. 5.ed. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2007.

GEWEELY, N.S. Evaluation of ozone for preventing fungal influenced corrosion of reinforced concrete bridges over the River Nile.Egypt. *Biodegradation* v.22, p.243-252, 2011.

GOMES, E. A. *Tratamento combinado da água produzida de petróleo por eletroflotação e processo fenton*. Dissertação (mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, SE. 95f. 2009.

GONZALEZ, J. M. A general purpose program for obtaining Most Probable Number. *Tables Journal of Microbiological Methods*, v. 26, p. 215-218, p. 1996.

HARRIGAN, W.F. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. USA: Academic Press, p. 532, 1998.

HEGGENDORN, F. L., et. al. Processos fisiológicos e patológicos das bactérias redutoras de sulfato do gênero *Desulfovibrio* sp. *Brasília Med*, v. 46 (3), p 247-252, 2009.

HERRERA, L.K., VIDELA, H.A. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *Int. Biodeterior. Biodegrad*, v.63, p.891-895, 2009.

HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.14, p.105-119, 1999.

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

HUBERT, C., VOODOUW, G. oil field souring control by *Sulfurospirillum* spp. That out compete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 2644-2652, 2007.

JACOBS, M. B., BRAVERMAN, M. M., HOCHHEISER, S. ultramicrodetermination of sulfides in air. *Analytical Chemistry*, v.29 (9), p.1349-1351, 1957.

JAVAHERDASHTI, R. et al. On the impact of algae on accelerating the biodeterioration/biocorrosion of reinforced concrete: a mechanistic review. *Eur. J. Sci. Res.* v.36, p.394-406, 2009.

JONES, D. A., AMY, P. S. A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion*, v.58, p.638-645, 2002.

LI, S.;ZHANG, Y.;LIU, J.;YU, M. Corrosion behavior of steel A3 influenced by *ThiobacillusFerrooxidans*. *Acta Phys.-chim. Sin.* v.24, p.1553-1557, 2008.

LITTLE, B., RAY, R. A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion*, v.58, p.424-428, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Ed. Artmed, 2010.

MAGOT, M., OLLIVIER B., PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.77, p.103-16, 2000.

MARIANO, J. B. As emissões atmosféricas. In: J. B. Mariano, *Impactos ambientais do refino de petróleo*, Rio de Janeiro: Interciência, p.78-9, 2005.

MCCRADY, M. H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. Infect. Dis.*, v. 17, p. 183-212, 1915.

MONCUR, M. C., et. al. Long-term mineralogical and geochemical evolution of sulfide mine tailings under a shallow water cover, *Applied Geochemistry* (2015), doi. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.01.012>>

MONTICELLO, D.J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.11, p.540-546, 2000.

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

NERIA-GONZÁLEZ, I. et al. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe*, v.12, p.122-33, 2006.

ODON, J. M., SINGLETON, R. J. The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1992.

ORNEK, D. et al. Pitting corrosion control of aluminum 2024 using protective biofilms that secrete corrosion inhibitors. *Corrosion*, v.58, p.761-767, 2002.

PAUL, S. S., DEB, S. M., SINGH, D. Isolation and characterization of novel sulphate-reducing *Fusobacterium* sp. and their effects on in vitro methane emission and digestion of wheat straw by rumen fluid from Indian riverine buffaloes. *Animal Feed Science and Technology* v.166–167, p.132–140, 2011.

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). *Bol. Téc. Petrob.* 46, p 208-219, 2003.

PINEAU, S., DUPONT, I., BRAISAZ, T. Interrelationship between cathodic protection and microbiologically influenced corrosion um marine environment: Brief-review and prospects. 13. International Harbour Congress Proceedings, Bélgica, p. 169-178, 2003.

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

QI, P., ZHANG, D., YI, W. Sulfate-reducing bacteria detection based on the photocatalytic property of microbial synthesized ZnS nanoparticles. *AnalyticaChimicaActa*, v.800, p.65–70, 2013.

RAJASEKAR, A. et al. N. Bacterial degradation of naphtha and its influence on corrosion. *CorrosionSci*, v.47, p.257-271, 2005.

ROCHA, S. M. S. *Avaliação da utilização de nitrato em efluentes contendo sulfato e cultura mista enriquecida com bactérias redutoras de sulfato (BRS)*. 2006. 159 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós - Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, MG.

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

SCHMIDELL, W., et. al. Cinética de Processos Fermentativos. In: *Biotechnology Industrial*, v.2, Engenharia Bioquímica. Cap.6, p.93-122, 2001.

SPEIGHT, J. G. The chemical and physical structure of petroleum: effects on recovery operations. *J. Petrol. Sci. Eng.* v.22, p.3-15, 1999.

STAMS, A. J. M., et al. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 8, 3, p.371-382, 2006.

TANJI, Y. et al. Biological souring of crude oil under anaerobic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v.90, p.114–120, 2014.

TELES, D. R. S., AZEVEDO, A. E. G., DOS SANTOS, C. P. L. Caracterização isotópica de águas de formação hipersalinas de um campo de petróleo da Bacia do Recôncavo, Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 28 (2), p. 291-301, 2010.

THOMAS, J. E. et al. *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*, 2. ed., Rio de Janeiro: Interciência, PETROBRAS, 2004.

TRUONG, H. T., CHEN, Y., BELZILE, N. Effect of sulfide, selenite and mercuric mercury on the growth and methylation capacity of the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Science of the Total Environment*, v.449, p.373–384, 2013.

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.

VAZOLLER, R. F. *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. 259 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

VIEIRA, D. S., CAMMAROTA, M. C., CAMPORESE, E. F. S. *Redução de Contaminantes presentes na água de produção de petróleo*. 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

VIDELA, H. A. *Biocorrosão, Biofouling e biodeterioração de materiais*. Editora Edgard Blucher, 2003.

VIDELA, H. A., HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, v. 8, p. 169-180, 2005.

VOORDOUW, G. Production-related petroleum microbiology: progress and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, v.22, p.401–405, 2011.

WORDEN, R. H., MANNING, D. A. C., BOTTRELL, S. H. Multiple generations of high salinity formation water in the Triassic Sherwood Sandstone: Wytch Farm oilfield, onshore UK. *Applied Geochemistry*, v. 21, p 455-475, 2006.

ZARASVAND, K. A.; RAI, V. R. Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.87, p.66-74, 2014.

ZHOU, C. et al. Effect of growth conditions on microbial activity and iron-sulfide production by *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials*, v.272, p.28–35, 2014.

ANEXO A – TABELA NMP

Número de tubos positivos observados em cada diluição			NMP de micro-organismos por mL da 1ª diluição
1ª diluição	2ª diluição	3ª diluição	
0	0	0	0
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	1	1	0,6
0	2	0	0,6
1	0	0	0,4
1	0	1	0,7
1	0	2	1,1
1	1	0	0,7
1	1	1	1,1
1	2	0	1,1
1	2	1	1,5
1	3	0	1,6
2	0	0	0,9
2	0	1	1,4
2	0	2	2,0
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	1	2	3,0
2	2	0	2,0
2	2	1	3,0
2	2	2	3,5
2	2	3	4,0
2	3	0	3,0
2	3	1	3,5

2	3	2	4,0
3	0	0	2,5
3	0	1	4,0
3	0	2	6,5
3	1	0	4,5
3	1	1	7,5
3	1	2	11,5
3	1	3	16,0
3	2	0	9,5
3	2	1	15,0
3	2	2	20,0
3	2	3	30,0
3	3	0	25,0
3	3	1	45,0
3	3	2	110,0
3	3	3	140,0

ANEXO B – Curva de calibração do sulfeto