



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Renato Cerqueira Guarçoni Baêso

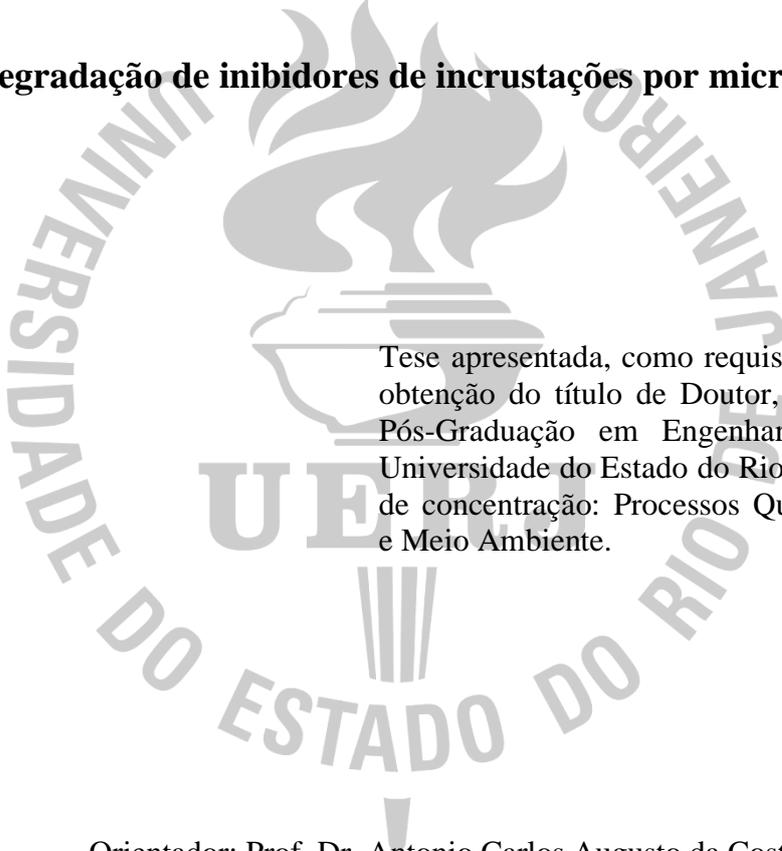
**Biodegradação de inibidores de incrustações por microrganismos**

Rio de Janeiro

2022

Renato Cerqueira Guarçoni Baêsso

## **Biodegradação de inibidores de incrustações por microrganismos**



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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Teresa Soares Lutterbach

Prof. Dr. Luciano Procópio da Silva

Rio de Janeiro

2022

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

B142 Baêso, Renato Cerqueira Guarçoni.

Biodegradação de inibidores de incrustações por microrganismos.  
– 2022.  
158 f.

Orientador(a): Antonio Carlos Augusto da Costa  
Márcia Teresa Soares Lutterbach  
Luciano Procópio da Silva

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

1. Biodegradação – Teses. 2. Incrustações – Teses. I. Costa, Antonio  
Carlos Augusto da. II. Lutterbach, Márcia Teresa Soares. III. Silva,  
Luciano Procópio da. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Química. V. Título.

CDU 54

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou  
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Renato Cerqueira Guarçoni Baêso  
Assinatura

29/06/2022  
Data

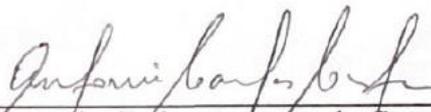
Renato Cerqueira Guarçoni Baêso

**Biodegradação de inibidores de incrustações por microrganismos**

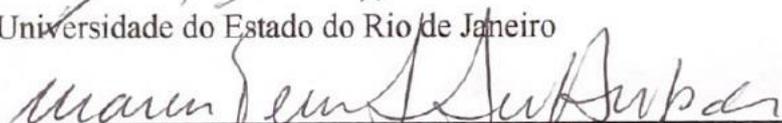
Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 29 de junho de 2022

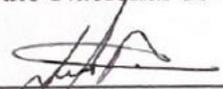
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (orientador)

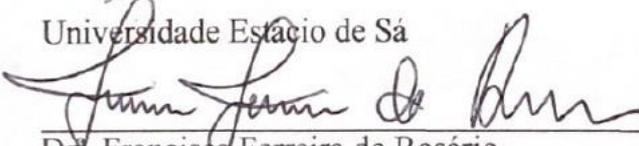
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Márcia Teresa Soares Lutterbach (orientadora)

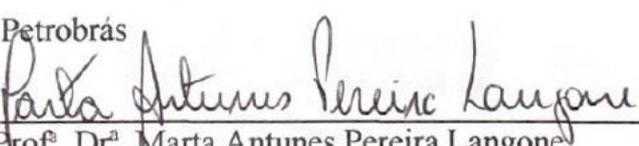
Instituto Nacional de Tecnologia

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luciano Procópio da Silva (orientador)

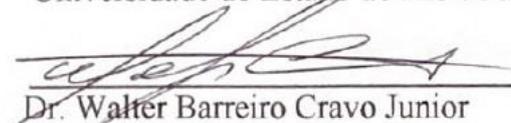
Universidade Estácio de Sá

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisca Ferreira do Rosário

Petrobrás

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Marta Antunes Pereira Langone

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Walter Barreiro Cravo Junior

Instituto Nacional de Tecnologia

Rio de Janeiro

2022

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arley e Regina Cele, à tia Maria Aparecida e à Patrícia meus grandes incentivadores, por me darem carinho e coragem para enfrentar todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Há quem diga que a vida é feita de encontros, responsáveis por formar aquilo que somos. No meu caso não resta dúvidas disso.

Agradeço a Deus, já que Ele me abençoou com o dom da vida, sabedoria, saúde e por toda luz enviada nos momentos difíceis. Obrigado por colocar pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais o caminho seria muito mais difícil.

Agradeço imensamente aos meus pais Arley e Regina Cele, à minha irmã Laura e à Tia Ida por compreenderem minhas mudanças e pelo apoio incondicional em cada etapa, pelas inúmeras manifestações de amor, paciência e pelo respaldo nos momentos difíceis. Vocês são meu alicerce, minha fonte de energia constante e de todo amor que brota dentro de mim.

À Patrícia que sempre está ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e alegria este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

Um agradecimento a todos os meus amigos. Cada um à sua maneira tornou meus dias mais felizes e os obstáculos mais fáceis de serem transpostos. Agradeço, assim, pelas valiosas discussões, pela troca de ideias e pelo apoio nos momentos de dificuldades acadêmicas e pessoais, pelo carinho, alegria e cuidado compartilhados.

Não posso deixar de agradecer aos professores que passaram pela minha trajetória acadêmica e me mostraram a beleza que há na transmissão do conhecimento, especialmente os meus orientadores, professor doutor Antonio Carlos Augusto da Costa, doutora Márcia Teresa Soares Lutterbach e professor doutor Luciano Procópio da Silva pelo apoio intelectual, por acreditarem no meu trabalho e por terem me auxiliado a fazer as melhores escolhas para que essa pesquisa fosse realizada.

À equipe de trabalho da UERJ e do LABIO-INT pela ajuda em diversas etapas desta pesquisa, pela paciência, dedicação e por todo conhecimento transmitido a mim todo o carinho e atenção dedicados a mim.

Agradeço à Petrobras pela bolsa de pesquisa e pelo financiamento para execução do projeto de tese.

E por ter proporcionado alguns dos encontros mais importantes da minha história, agradeço à Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao LABIO/INT: os ensinamentos que tive durante o doutorado serão para sempre lembrados.

Nunca deixe que  
lhes digam que não vale a pena  
acreditar no sonho que se tem.

*(Renato Russo)*

## RESUMO

BAÊSSO, Renato Cerqueira Guarçoni. *Biodegradação de inibidores de incrustações por microrganismos*. 2022. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Petróleo e gás como fontes de combustíveis fósseis desempenham um papel relevante quando comparadas a outras fontes de energia. O desenvolvimento industrial faz com que a demanda mundial de energia aumente, sendo necessário elevar as reservas de petróleo e a capacidade de produção. Entretanto, a sua extração é desafiadora e emprega uma série de procedimentos de alta complexibilidade. Muitas dessas técnicas utilizam a injeção de fluidos para diversas finalidades. Os inibidores de incrustações se fazem necessários, pois, nas operações da indústria do petróleo existe o risco de deposição de compostos que podem causar o mau funcionamento de equipamentos ou dificultar o escoamento dos fluidos. Muitos desses aditivos contêm em sua composição carbono, nitrogênio e fósforo, dentre outros elementos, que servem como substrato e como fatores estimulantes e/ou inibidores do crescimento de microrganismos que causam prejuízos. Com isso, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito de diferentes anti-incrustantes sobre culturas de microrganismos típicos de um sistema de produção de óleo e avaliar o consumo destes produtos como fontes de carbono, nitrogênio e fósforo. Os microrganismos estudados foram a *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella algae*, *Desulfovibrio desulfuricans* e um consórcio de bactérias redutoras de sulfato. Para tanto, foi estabelecida a composição do meio de cultivo ideal para cada microrganismo, a concentração de inóculo a ser utilizada e a concentração de aditivo empregada nos testes. Em seguida, monitorou-se o crescimento microbiano submetido às condições de cultivo determinadas, em presença e ausência de aditivos químicos. Os resultados demonstraram diferentes graus de crescimento das espécies microbianas, dependendo da composição do meio e da concentração de aditivo químico e a utilização dos aditivos como alguma fonte de nutriente foi observada para cada espécie.

Palavras-chave: Biodegradação. Aditivos. Inibidores de Incrustações. *Pseudomonas aeruginosa*. *Shewanella algae*.

## ABSTRACT

BAËSSO, Renato Cerqueira Guarçoni. Biodegradation of scale inhibitors by microorganisms, Brazil, 2022. 158p. Thesis (D.Sc. in Chemical Engineering) - Institute of Chemistry, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022

Oil and gas as fossil sources play a relevant role when compared to other energy sources. Industrial development has been increased the global energy demand, and its essential to increase oil reserves and production capacity. However, its extraction is challenging and uses a series of complex procedures, which aim to extract the maximum from these reserves. Many of these techniques are based on stimulating the well by injecting fluids. Scale inhibitors are needed, because in oil industry operations, there is a risk of scale deposition. They can cause the malfunction of pumps and other equipment, deposit along the pipes, reducing the internal diameter of tubes which can block the flow of fluids. Many of these compounds contain carbon, nitrogen and phosphorus, among other elements that serve as substrate, as stimulants or as inhibitors factors for microorganisms' growth that cause damage such as scale and corrosion. Thus, the objective of this study is to evaluate the effect of different scale inhibitors on the concentration of microorganisms, typical of a production system, and to evaluate the consumption of these products as sources of carbon, nitrogen and phosphorus. The microorganisms studied were *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella algae*, *Desulfovibrio desulfuticans* and a consortium of sulfate reducing bacteria. To do so, the composition of the ideal culture medium was established for each microorganism, as well as the concentration of inoculum to be used and the concentration of the additive used in the tests. Then, the microbial growth was monitored under the determined culture conditions, in the presence and absence of chemical additives. The results showed different degrees of growth of the microbial species, depending on the composition of the medium and the concentration of chemical additive. Moreover, the use of the additives as a source of nutrient (phosphorus, nitrogen and carbon) was observed for each species.

Keywords: Biodegradation. Additives. Scale Inhibitor. *Pseudomonas aeruginosa*. *Shewanella algae*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação das técnicas empregadas na EOR. ....	32
Figura 2- Formação de incrustação dentro de uma tubulação.....	39
Figura 3- Solubilidade do carbonato de cálcio em relação à temperatura. ....	41
Figura 4- Esquema ilustrando a variação das espécies de acordo com pH da solução.....	42
Figura 5- Hidrato de gás. À esquerda é apresentado um esquema ilustrando a formação do hidrato de gás. À direita uma tubulação com escoamento interrompido devido à formação de hidrato de gás. ....	45
Figura 6- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em placa de Petri com meio Ágar Cetrimide sob luz U.V.....	49
Figura 7- <i>Shewanella algae</i> em placa de Petri com meio de cultura Marine Ágar .....	52
Figura 8- Ciclo do enxofre: Ciclo redox do enxofre. As oxidações são indicadas pelas setas amarelas, e as reduções, pelas vermelhas. As reações nas quais não ocorrem alterações redox estão em branco. DMSO, dimetil-sulfóxido; DMS, dimetil-sulfeto. ....	53
Figura 9- Ilustração de partes de uma tubulação do sistema de injeção de água em poço de petróleo que sofreu corrosão microbiologicamente influenciada por BRS.....	56
Figura 10- Fluxograma das etapas executadas nesse trabalho. ....	58
Figura 11- Esquema ilustrando o procedimento de verificação de contaminações microbiológicas.....	62
Figura 12- Esquema detalhado dos procedimentos realizados na Etapa 2. ....	64
Figura 13- Procedimento de reativação e confirmação da pureza dos microrganismos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Shewanella algae</i> . ...	67
Figura 14- Diagrama montagem da microplaca para a escolha do meio e da concentração de inóculo.....	71
Figura 15- Fluxograma ilustrando os procedimentos realizados na etapa 3 ....	72
Figura 16- Esquema ilustrando os procedimentos realizados na Etapa 4. -N refere-se a retirada de nitrogênio da composição; -C refere-se à retirada de carbono da composição; -P refere-se à retirada de	

fósforo da composição; e, NC, NP, PC e NPC as retiradas simultâneas desses elementos.....	74
Figura 17- Esquema da montagem da microplaca para o teste com os meios empobrecidos.....	77
Figura 18- Imagem ilustrando o resultado do teste de contaminação microbiológica das Amostras 1, 2 e 4 em meio PCA (à esquerda) e meio Sabouraud (à direita). ....	81
Figura 19- A) Imagem ilustrando o resultado do teste de contaminação microbiológica da Amostra 3 em meio PCA. B) Resultado do teste da coloração de Gram.....	82
Quadro 1- Quadro 1- Resultados dos testes preliminares com BRS .....	81
Figura 20- Crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ambiental em meio de cultura CN, BHG, BHL e BH. Inóculo de 1:3 (v/v), 35° C e tempo de 73 h.....	89
Figura 21- Crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ambiental: (A) BHL e (B) BHG e com proporções de inóculos/meio de 1:3, 1:30, 1:300, 1:3.103, 1:3.104, 1:3.105, 1:3.106, 1:3.107(v/v). 35° C e tempo de 73 h.....	91
Figura 22- Curva de crescimento da <i>Shewanella algae</i> ambiental em meio de cultura Caldo Nutriente e Bushnell-Hass com glicose, com lactato e isento de fonte de carbono. Inóculo de 1:300, temperatura do experimento de 30° C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 h).....	92
Figura 23- Curva de crescimento da <i>Shewanella algae</i> ambiental no meio Bushnell-Haas com Lactato e com proporções de inóculos/meio de 1:300, 1:3.103, 1:3.104, 1:3.105, 1:3.106, 1:3.107, 1:3.108 e 1:3.109. Temperatura do experimento de 30° C e tempo de experimento ....	93
Figura 24- Curva de crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 1 e 2. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inóculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 h).....	95

- Figura 25- Curva de crescimento da *Shewanella algae* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 1 e 2. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 8560 minutos (142 h)..... 98
- Figura 26- Curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 3. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 h).....100
- Figura 27- Curva de crescimento da *Shewanella Algae* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 3. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell- Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 8640 minutos (360 h).....102
- Figura 28- Curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 4. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 horas).....104
- Figura 29- Curva de crescimento da *Shewanella Algae* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 4. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:300 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 8120 minutos (135 horas). .....106
- Figura 30- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de carbono. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C.

Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....109

Figura 31- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de fósforo. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....113

Figura 32- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....115

Figura 33- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio e fósforo simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....117

Figura 34- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio e carbono simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....119

Figura 35- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de fósforo e carbono simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30

e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....121

Figura 36- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio, fósforo e carbono simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.....123

Figura 37- Cromatograma da mistura de todos os padrões dos ácidos carboxílicos de cadeia curta: (C1) ácido fórmico, (C2) ácido acético, (C3) ácido propiônico, (IsoC4) ácido isobutírico, (C4) ácido butírico, (IsoC5) ácido isovalérico e (C5) ácido valérico. Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. \*6.0 e \*6.4: impureza do solvente .....126

Figura 38- Cromatogramas de todos os componentes do meio de cultivo: Bushnell-Hass com glicose (BHG), Bushnell-Hass com glicose sem adição de fosforo (BHG-P), Bushnell-Hass com glicose sem adição de nitrogênio (BHG-N) e Bushnell-Hass com glicose sem adição de fósforo e carbono (BHG-PC). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. 6.2 e 6.8\*: impureza do solvente. ....129

Figura 39- Cromatograma da amostra BHG 1 (meio de cultivo com Aditivo 1), BHG 1M (meio de cultivo com Aditivo 1 após degradação microbiológica) e amostra BHG 1M + C2 + C4 (meio de cultivo com Aditivo 1 e microrganismo fortificado com ácido acético e ácido butírico).M= *P. aeruginosa*. Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente.....131

- Figura 40- Cromatograma da amostra BHG 2 (meio de cultivo com Aditivo 2), BHG 2M (meio de cultivo com Aditivo 2 após degradação microbiológica). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente. ....132
- Figura 41- Cromatograma da amostra BHG-N 1 (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 1) e amostra BHG-N 1M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 1 e microrganismo). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 5.9, 6.2 e 6.8\* impureza do solvente. ....133
- Figura 42- Cromatograma da amostra BHG-N 2 (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2) e amostra BHG-N 2M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2 e microrganismo) Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6 e 6.8\* impureza do solvente.....134
- Figura 43- Cromatograma da amostra BHG-P 2 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2), amostra BHG-P 2M (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 e microrganismo) e amostra BHG-P 2M + C2+C4 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 fortificada com ácido acético e ácido butírico). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente .....135
- Figura 44- Cromatogramas de todos os componentes do meio de cultivo com lactato: Bushnell-Hass com lactato (BHL), Bushnell-Hass com lactato sem adição de fosforo (BHL-P), Bushnell-Hass com lactato sem adição de nitrogênio (BHL-N) e Bushnell-Hass com lactato sem adição de nitrogênio e carbono (BHL-NC). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. 6.4\*impureza do solvente. ....137

- Figura 45- Cromatograma da amostra BHL 2 (meio de cultivo com Aditivo 2), BHL 2M (meio de cultivo com Aditivo 2 após degradação microbiológica) e amostra BHL 2M +IsoC4 (meio de cultivo com Aditivo 2 e fortificado com ácido Isobutírico). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente: 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *S. algae*. 5.3 e 6.2\* impureza do solvente. ....138
- Figura 46- Cromatograma da amostra BHL-P 2 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2), BHL-P 2M (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 após degradação microbiológica) e amostra BHL-P 2M + C3 + IsoC4 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2, microrganismo e fortificado com ácido propiônico e Isobutírico) Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente: 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *S. algae*. 5.3 e 6.1\* impureza do solvente. ....140
- Figura 47- Cromatograma da amostra BHL-N 2 (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2) e BHL-N 2M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2 após degradação microbiológica). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente: 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *S. algae*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente. ....141
- Figura 48- Cromatograma da amostra BHL-NC 2 (meio de cultivo sem nitrogênio e carbono com Aditivo 2), BHL-NC 2M (meio de cultivo sem nitrogênio e carbono com Aditivo 2 após degradação microbiológica) e BHL-NC 2M + C1 (meio de cultivo sem nitrogênio e carbono com Aditivo 2 após degradação microbiológica e ácido fórmico). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210nm. M= *S. algae*. 6.1\* impureza do solvente.....142
- Figura 1- Cromatograma dos padrões de ACCC analisados isoladamente por CLAE: Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 5°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento

de onda de 210 nm. 5.9 e 6.4\*: impureza do  
solvente.....152

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos e seus produtos utilizados nas MEOR.....	35
Tabela 2 - Principais tipos de inibidores de incrustações e suas limitações de emprego.....	48
Tabela 3 - Processos do ciclo do enxofre e microrganismos envolvidos. DMSO, dimetil-sulfóxido; DMS, dimetil-sulfeto. ....	54
Tabela 4 - Informações técnicas das amostras. ....	59
Tabela 5 - Informações sobre as culturas de BRS utilizadas no trabalho. ....	63
Tabela 6- Características dos microrganismos empregados em testes de biodegradação .....	65
Tabela 7 - Composição dos meios de cultivo em que se substituiu o elemento a ser testado como nutriente pelo aditivo .....	75
Tabela 8 - Resultado teste de contaminação das amostras .....	81
Tabela 9 - Resultado do crescimento de cultura pura de BRS e cultura mista de BRS em diferentes tipos de meio na presença das amostras. (+) crescimento positivo e (-) ausência de crescimento. ....	83
Tabela 10 - Confirmação da pureza das colônias testadas .....	87
Tabela 11- Resumo dos resultados de todos os experimentos em que os aditivos foram testados como fonte de C, P e N, isoladamente e em combinação.....	108
Tabela 12- Tempos de retenção para cada ácido carboxílico de cadeia curta presente na mistura.....	126
Tabela 13- Tabela resumo das condições selecionadas para a confirmação dos resultados obtidos nos testes de biodegradação com a <i>P. aeruginosa</i> . ....	128
Tabela 14- Tabela resumo das condições selecionadas para a confirmação dos resultados obtidos nos testes de biodegradação com a <i>S. algae</i> . ....	136

Tabela 1- Composição do Caldo de Bushnell-Haas.....	153
Tabela 2- Composição meio Caldo Nutriente.....	154
Tabela 3- Composição do meio de cultura Postgate C.....	154
Tabela 18- Composição das soluções para preparo da água do mar sintética.....	155

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCC	Ácidos Carboxílicos de Cadeia Curta
BH	Caldo Bushnell-Haas
BHC	Caldo Bushnell-Haas com adição de fonte de carbono
BHG	Caldo Bushnell-Haas com glicose
BHL	Caldo Bushnell-Haas com lactato
BRS	Bactérias redutoras de Sulfato
C	Carbono
C1	Ácido fórmico
C2	Ácido acético
C3	Ácido propiônico
C4	Ácido butírico
C5	Ácido valérico
CEOR	Chemical Enhanced Oil Recovery
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Caldo nutriente
DO <sub>600</sub>	Densidade ótica a 600 nanômetros
EOR	Enhanced Oil Recovery
IsoC4	Ácido isobutírico
IsoC5	Ácido isovalérico
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery
Min	Minutos
MWD	Multiple Wavelength Detector
N	Nitrogênio
P	Fósforo
PCA	Plate Count Agar

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	31
2.1	<b>Extração do óleo</b> .....	31
2.2	<b>Transtornos enfrentados na produção do petróleo</b> .....	37
2.3	<b>Incrustações</b> .....	38
2.3.1	<u>Incrustações de carbonato de cálcio</u> .....	40
2.3.2	<u>Incrustações de sais de sulfato</u> .....	42
2.3.3	<u>Incrustações de sulfetos</u> .....	43
2.3.4	<u>Incrustações de cloreto de sódio</u> .....	44
2.4	<b>Hidratos gasosos</b> .....	44
2.5	<b>Inibidores de incrustações</b> .....	45
2.6	<b>Bactérias da espécie <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	49
2.7	<b>Bactérias da espécie <i>Shewanella algae</i></b> .....	50
2.8	<b>Bactérias Redutoras de Sulfato</b> .....	53
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	57
3.1	<b>Etapa 1- Recebimento das Amostras, informações dos compostos e testes de contaminações</b> .....	58
3.1.1	<u>Recebimento das amostras</u> .....	59
3.1.2	<u>Testes de contaminação microbiológica das amostras fornecidas</u> .....	61
3.1.3	Testes preliminares de biodegradação dos aditivos por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) .....	62
3.2	<b>Etapa 2 - Avaliação do crescimento dos microrganismos em (a) Caldo Nutriente, (b) Bushnell-Haas isento de fonte de carbono, (c) Bushnell-Haas com Glicose e (d) Bushnell- Haas com Lactato</b> ....	64

3.2.1	Microrganismos utilizados como cepas de referência nos testes de biodegradação.....	65
3.2.2	<u>Reativação e confirmação da pureza dos microrganismos</u> .....	66
3.2.3	<u>Meios de cultivo utilizados</u> .....	67
3.2.4	<u>Preparo do inóculo para os testes de degradação dos aditivos</u> .....	68
3.2.5	<u>Curvas de crescimento dos microrganismos nos meios selecionados</u>	69
3.3	<b>Etapa 3 – Análise do crescimento dos microrganismos na presença dos aditivos e determinação da concentração de amostra a ser utilizada nos testes</b> .....	72
3.4	<b>Etapa 4 - Testes da utilização dos aditivos como fonte de nutrientes</b> .....	73
3.4.1	<u>Preparo dos meios de cultivo definidos completos e com composição nutricional parcial</u> .....	74
3.4.2	<u>Testes de utilização dos aditivos como fonte de nutriente</u> .....	76
3.5	<b>Etapa 5 - Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com as amostras biodegradadas</b> .....	78
3.5.1	<u>Análise dos ácidos carboxílicos de cadeia curta – ACCC</u> .....	78
3.5.2	<u>Análise dos meios de cultura com ou sem adição dos aditivos anti-incrustantes</u> .....	79
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	80
4.1	<b>Etapa 1</b> .....	80
4.1.1	<u>Testes de contaminação das amostras fornecidas</u> .....	80
4.1.2	<u>Testes preliminares de biodegradação dos aditivos por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)</u> .....	82
4.2	<b>Etapa 2 – Avaliação do crescimento dos microrganismos em a) Caldo Nutriente, (b) Bushnell-Haas isento de fonte de carbono, (c) Bushnell-Haas com glicose e (d) Bushnell-Haas com Lactato</b> .....	87
4.2.1	<u>Reativação e confirmação da pureza dos microrganismos</u> .....	87
4.2.2	<u>Curvas de crescimento dos microrganismos nos meios selecionados</u>	88

4.3	<b>Etapa 3 – Análise do crescimento dos microrganismos na presença dos aditivos e determinação da concentração de amostra a ser utilizada nos testes</b> .....	94
4.3.1	<u>Resultado para o Aditivo 1 e Aditivo 2</u> .....	94
4.3.2	<u>Resultado para o Aditivo 3</u> .....	100
4.3.3	<u>Resultado para o Aditivo 4</u> .....	103
4.4	<b>Etapa 4 - Utilização dos aditivos como fonte de nutrientes</b> .....	107
4.4.1	<u>Aditivos como fonte de Carbono</u> .....	109
4.4.2	<u>Aditivos como fonte de Fósforo</u> .....	113
4.4.3	<u>Aditivos como fonte de Nitrogênio</u> .....	115
4.4.4	<u>Aditivos como fonte de Nitrogênio e Fósforo</u> .....	117
4.4.5	<u>Aditivos como fonte de Nitrogênio e Carbono</u> .....	119
4.4.6	<u>Aditivos como fonte de Fósforo e Carbono</u> .....	121
4.4.7	<u>Aditivos como fonte de Nitrogênio, Fósforo e Carbono</u> .....	123
4.5	<b>Etapa 5 - Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b> .....	125
4.5.1	<u>Análise dos ácidos carboxílicos de cadeia curta – ACCC</u> .....	125
4.5.2	<u>Análise dos meios de cultura com ou sem adição dos inibidores de incrustações</u> .....	127
4.5.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	127
4.5.2.1.1	Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo sem aditivo.....	127
4.5.2.1.2	Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo com aditivos e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	130
4.5.2.2	<i>Shewanella algae</i> .....	136
4.5.2.2.1	Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo sem aditivo.....	136
4.5.2.2.2	Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo com aditivos e <i>Shewanella algae</i> .....	138
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	143

6	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	146
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	147
	<b>APÊNDICE A - Cromatograma dos padrões de ACCC</b> .....	154
	<b>ANEXO A – Metodologia preparo meios de cultivo</b> .....	155

## INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte energética mundial e desempenha um papel relevante quando comparadas a outras fontes, tais como energia solar, eólica, hidrelétrica etc. O desenvolvimento industrial faz com que a demanda mundial de energia aumente, sendo necessário elevar as reservas de petróleo e a capacidade de produção (MOHSENATABAR FIROZJAI; SAGHAFI, 2020). No entanto, estima-se que, no futuro próximo, não haverá mais descobertas significativas dos campos de petróleo convencionais. (DRUETTA; RAFFA; PICCHIONI, 2019). Com isso, o aumento da produtividade dos reservatórios, se faz necessário.

O óleo cru está presente em uma rede complexa de capilares nos reservatórios, o que torna a sua recuperação um desafio, porque os mesmos estão localizados em regiões de difícil acesso e o óleo está preso aos poros por pressões capilares (SEN, 2008). A extração do petróleo é realizada em três estágios de recuperação: 1) recuperação primária; 2) recuperação secundária e; 3) recuperação terciária ou recuperação avançada de óleo (Enhanced Oil Recovery - EOR) (DEMIRBAS; ALSULAMI; HASSANEIN, 2015).

As duas primeiras fases da extração estão relacionadas à utilização da pressão do reservatório e à repressurização pela injeção de fluidos. Segundo Sen (2008), após o emprego das técnicas primárias e secundárias de recuperação de óleo, ainda restam cerca de 2/3 do total de óleo no reservatório e se faz necessário o emprego das técnicas terciárias. A recuperação terciária abrange um conjunto de técnicas que modificam as propriedades físicas e/ou químicas dos reservatórios e, conseqüentemente, aumentam a taxa de recuperação de óleo e a vida de produção dos poços de petróleo (DRUETTA; RAFFA; PICCHIONI, 2019). Esses métodos buscam superar as forças capilares responsáveis pela retenção de óleo residual nos reservatórios subterrâneos (NAZAR; SHAH; KHOSA, 2011) e se refere à recuperação do óleo pela injeção de materiais que normalmente não estão presentes nos reservatórios (PAPI; SHARIFI; ABDALI, 2019). Dentre as técnicas da EOR mais empregadas podemos citar a recuperação química avançada de óleo (Chemical Enhanced Oil Recovery - CEOR), injeção de gases como CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>,

recuperação térmica e a recuperação microbiológica avançada de óleo (Microbial Enhanced Oil Recovery - MEOR) (OLAJIRE, 2014). A MEOR utiliza o crescimento microbológico e os metabólicos gerados para estimular a extração dos reservatórios de petróleo (CUI et al., 2017a). A recuperação química avançada do óleo é adequada para reservatórios altamente esgotados e inundados, baseando-se na estimulação do poço através da alteração de propriedades físico-químicas promovidas pela injeção de produtos químicos (ATILHAN; APARICIO, 2021). É uma das técnicas mais utilizadas na recuperação de poços em que métodos térmicos não são aplicáveis (MANDAL, 2015).

Durante as etapas de extração do petróleo é injetado diversos produtos químicos para facilitar as operações envolvidas. De acordo com Fink (2012) os principais aditivos químicos utilizados na extração do petróleo são os surfactantes, antiespumantes, polímeros, sequestradores de oxigênio, inibidores de incrustações e biocidas. Os inibidores de incrustações se fazem necessários, pois em certas operações da indústria do petróleo como a produção, estimulação e transporte, existe o risco de deposição de incrustações (FINK, 2012). Algumas das incrustações mais encontradas em um sistema de produção incluem carbonato de cálcio, sulfato de bário, sulfato de estrôncio e sulfato de cálcio. Essas incrustações geralmente se formam como resultado de mudanças repentinas nas características do fluido (pH, temperatura ou pressão) ou se a mistura de salmoura é incompatível. O acúmulo de incrustação pode limitar severamente a produtividade de um poço até o ponto onde deve ser limpo ou abandonado. Além dos problemas operacionais, a formação de incrustações de material radioativo de ocorrência natural (sulfato de rádio) pode oferecer, adicionalmente, problemas ambientais (BROWNING; FOGLER, 1995).

A maioria dos inibidores de incrustações são compostos a base de fósforo, como por exemplo: polifosfatos inorgânicos, ésteres de fosfato, fosfonatos e aminofosfatos. Substâncias alternativas como os polímeros - poliacrilatos e seus derivados - e vários homopolímeros e copolímeros, a base de ácidos maleico e ácido sulfônico, vem sendo estudadas e empregadas (BARAKA-LOKMANE et al., 2009). No entanto, como mostrado por Sund et al. (1990) os aditivos adicionados à água de injeção elevam a quantidade de

carbono, nitrogênio e fósforo disponíveis que podem ser usados como nutrientes por bactérias presentes no sistema de injeção. Isso poderia acarretar o aumento da bioincrustação de reservatórios e do sistema de água de injeção ocasionando o aumento da taxa de corrosão. Além disso, a degradação dos aditivos utilizados para inibir a formação de incrustações faz com que esses percam sua eficiência levando à formação dos precipitados.

A possível contaminação microbiana de aditivos químicos por microrganismos (detectada pela Petrobras), já na recepção dos produtos pelas empresas do setor de petróleo poderia levar à introdução de vários tipos de microrganismos em reservatórios, durante o emprego de aditivos químicos. Uma vez que há uma ampla variedade de produtos aditivos empregados pelo setor de Petróleo e Gás (Surfactantes, polímeros, sulfonatos, polietilenoglicol, fosfonatos etc.) a possibilidade de composição com águas salinas e óleo, pode levar à formação de uma ampla gama de produtos metabólicos, dependendo das condições ambientais. Esses produtos podem ser gases, ácidos carboxílicos, solventes, polímeros, entre outros. Essa ampla gama de produtos (em uso como aditivos químicos ou decorrentes de metabolismo microbiano) pode estimular o crescimento de outras classes de microrganismos (como as Bactérias Redutoras de Sulfato - BRS) levando, inclusive, à geração de gás sulfídrico, aumentando a possibilidade de corrosão e aumento nos gastos com biocidas, devido à formação de biopolímeros viscosos nas superfícies e aumento nas incrustações, com queda na produtividade. Dessa forma, a avaliação da qualidade de produtos das mais diferentes naturezas, no que tange à biodegradabilidade e decomposição por microrganismos, torna-se crucial para a redução de custos e aumento na eficácia da recuperação de óleo, com substancial redução na formação de incrustações.

O que motivou a realização da presente pesquisa foi a verificação, por parte da Petrobras, de que algumas amostras de aditivos químicos utilizados pela empresa estavam visivelmente contaminadas com microrganismos, o que poderia estar alterando as características dos produtos, comprometendo sua eficácia. Uma vez que não é do conhecimento da empresa a natureza exata dos aditivos químicos empregados na recuperação de óleo, produtos das mais diferentes composições químicas poderiam estar sendo utilizados por microrganismos como fontes nutricionais, aumentando a possibilidade de

formação de incrustações, de corrosão do sistema e, comprometendo assim, a eficácia na prospecção de óleo. Posto isto, é de extrema importância investigar quais linhagens microbianas são capazes de utilizar diferentes tipos de aditivos como fonte de nutrientes, conseqüentemente, levando à sua degradação.

Realizou-se o estudo com quatro tipos diferentes de aditivos utilizados como inibidores de incrustações: Uma amostra combinada de etilenoglicol e aminoetanol, uma amostra constituída de um copolímero de ácidos orgânicos, uma amostra de misturas ácidos carboxílicos e uma amostra de fosfonato.

Os microrganismos selecionados para os ensaios foram as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* ambiental, isolada de um poço de petróleo, e *Shewanella algae*, também de origem ambiental, isolada de uma praia brasileira. Adicionalmente, foram também utilizadas nos testes, bactérias redutoras de sulfato (BRS) em cultura pura e em cultura mista combinadas com outros microrganismos anaeróbios.

De acordo com Li et al. (2022) *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria capaz de ser a pioneira na formação de biofilmes complexos, em diferentes tipos de metais, promovendo a corrosão microbiologicamente influenciada. Segundo os autores, já foi demonstrado que a cepa é responsável por corroer metais como aço carbono, aço inoxidáveis e até mesmo ligas de alta entropia.

*Shewanella* spp. são encontradas em vários nichos ecológicos devido à sua diversidade no uso de moléculas como aceptores de elétrons e são microrganismos ambientalmente importantes devido ao seu envolvimento na transformação do Fe e Mn em ambientes aquáticos. Produzem sulfeto como metabólito o que associa o microrganismo a processos de corrosão. Ademais, é relatado na literatura diversas aplicações envolvendo a diversidade metabólica da espécie, podemos citar: aplicações em tratamento de águas residuais, conversão de biomassa residual e biorremediação de poluentes químicos, elementos tóxicos, substâncias orgânicas nocivas e outros compostos (SATOMI, 2014).

Por fim, as BRS são conhecidas por reduzir sulfatos inorgânicos em sulfetos na presença de hidrogênio ou matéria orgânica (PERMEH; LAU; DUNCAN, 2021). Entre os microrganismos, as bactérias redutoras de sulfato são as bactérias predominantes e mais problemáticas associadas à corrosão,

elas contribuem para quase metade dos casos de corrosão (ZHANG et al., 2020).

Dessa forma, o estudo da biodegradação dos aditivos utilizados na extração do petróleo se torna de extrema importância para prevenir, reduzir ou remediar alguns inconvenientes enfrentados.

## 1 OBJETIVOS

A presente tese tem como objetivo principal avaliar a biodegradabilidade de diferentes tipos de aditivos, utilizados como inibidores de incrustações em indústrias petrolíferas, por *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella algae*, ambas de origem ambiental, e por culturas de bactérias redutoras de sulfato.

Em termos gerais, os objetivos específicos do presente estudo são:

1. Avaliar a cinética de crescimento dos microrganismos nos meios Caldo Nutriente, Bushnell- Haas e meios Bushnell-Haas com diferentes fontes de carbono, objetivando estabelecer condições ideais de crescimento para comparação com os ensaios com adição de aditivos.
2. Determinar concentrações de aditivos químicos adequadas ao crescimento de microrganismos isolados do ambiente de petróleo (*P. aeruginosa* e *S. algae*) e seu potencial de toxicidade para as espécies;
3. Avaliar, na composição dos meios de cultivo empregados, os fatores limitantes e determinantes (carbono, nitrogênio e fósforo) para o cultivo das cepas selecionadas;
4. Verificar se as amostras podem ser diretamente utilizadas como fontes nutricionais por linhagens puras e mistas de bactérias anaeróbias redutoras de sulfato, sem degradação prévia dos aditivos por microrganismos heterotróficos
5. Avaliar a biodegradação dos aditivos e a utilização deles como fontes individuais e combinadas de carbono, fósforo e nitrogênio;
6. Utilizar as análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para confirmação dos resultados dos testes de biodegradação e identificar os metabólitos produzidos pelos microrganismos.
7. Fornecer subsídios para a aquisição de produtos químicos com base nos protocolos desenvolvidos quanto à relação com biodegradação;
8. Identificar por microbiologia clássica e por biologia molecular, espécies potencialmente utilizadoras de fluidos aditivos que possam contribuir para a minimização da ação desses compostos pela indústria do petróleo;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Extração do óleo

O petróleo no estado líquido é uma substância oleosa, com coloração variando entre o negro e o castanho claro, com cheiro característico e é inflamável. Tem origem a partir da matéria orgânica depositada junto com outros sedimentos e é constituído, basicamente, por uma mistura de hidrocarbonetos. Quando a mistura contém uma maior percentagem de moléculas pequenas seu estado físico é gasoso e quando a mistura contém moléculas maiores seu estado físico é líquido, nas condições normais de temperatura e pressão (TRIGGIA, 2001)

Segundo o mesmo autor, o tipo de hidrocarboneto gerado, óleo ou gás, é determinado pela constituição da matéria orgânica original e pela intensidade do processo térmico atuante sobre ela, sendo esse material acumulado e armazenado dentro de rochas chamadas reservatório.

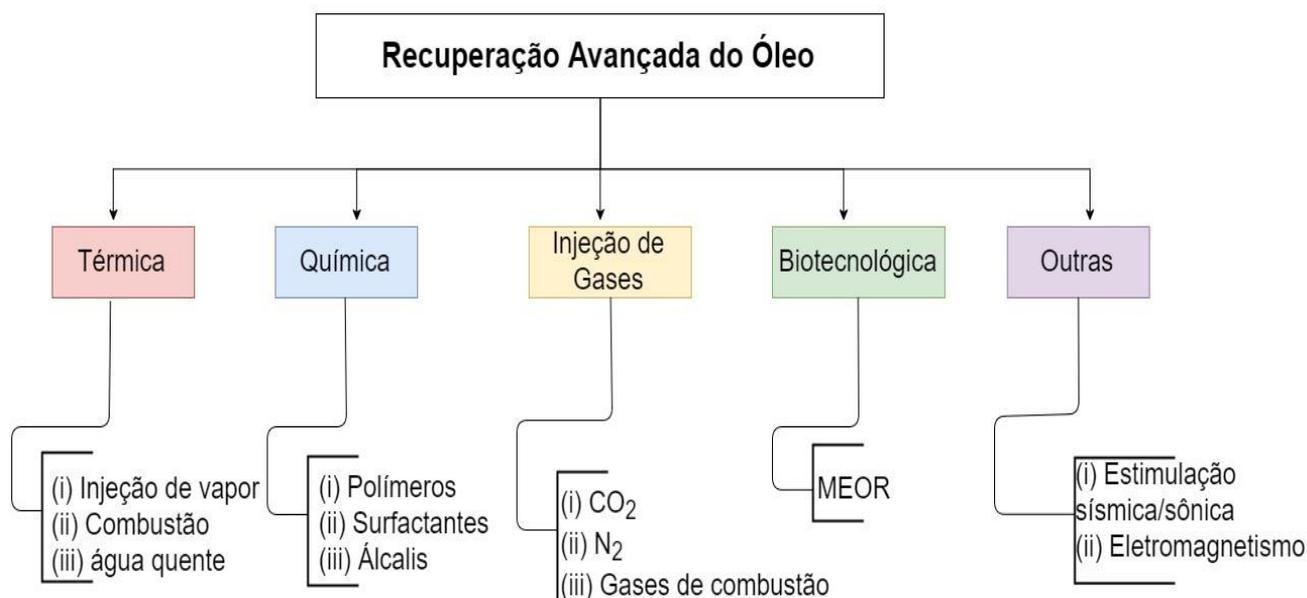
Para a extração do óleo são empregadas as técnicas de recuperação primária, recuperação secundária e recuperação terciária ou recuperação avançada de óleo (EOR).

A técnica de recuperação primária utiliza a pressão natural do poço para a extração do óleo e do gás existente, e estima-se que tal processo recupera cerca de 5 a 10% do total de óleo da reserva. Com isso, se faz necessário o emprego das técnicas secundárias (SEN, 2008).

Os métodos secundários de recuperação se baseiam na injeção de água ou gás no reservatório para a repressurização dos reservatório (DEMIRBAS; ALSULAMI; HASSANEIN, 2015). Como geralmente a água do mar é um insumo barato e está abundantemente disponível, o método de recuperação secundário mais empregado é o alagamento. Entretanto, com o passar do tempo, a quantidade de água nos fluidos produzidos se eleva e o custo de remoção e descarte pode exceder a receita de produção do petróleo e a técnica é interrompida. A eficiência da extração pode se elevar em 15% com essa técnica (LAKE; SCHMIDT; VENUTO, 1992).

Para aumentar a eficiência de extração de petróleo é empregado as técnicas avançadas de recuperação de óleo. Dentre as principais técnicas utilizadas na EOR, podemos citar a estimulação térmica, a injeção de gases e a injeção de produtor químicos (ATILHAN; APARICIO, 2021). Esses métodos buscam superar as forças capilares responsáveis pela retenção de óleo residual nos reservatórios subterrâneos e apesar da complexibilidade das técnicas empregadas a recuperação de óleo pode-se elevar para 60% do óleo presente no reservatório (NAZAR; SHAH; KHOSA, 2011). Na Figura 2 está exposto um esquema exemplificando a classificação dessas técnicas.

Figura 2- Classificação das técnicas empregadas na EOR.



Fonte: Adaptado de SEM, 2008.

Os métodos térmicos são os mais empregados, principalmente em reservatórios de arenito. Consiste na introdução de calor no reservatório com intuito de reduzir a viscosidade do óleo ou promover mudanças na molhabilidade da rocha. No entanto, não podem ser aplicados reservatórios profundos por apresentam problemas relacionados às perdas térmicas (ATILHAN; APARICIO, 2021).

Outra técnica utilizada, é a injeção de gases nos reservatórios. Os gases mais utilizados são: CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e gases de hidrocarbonetos. Sabe-se que a injeção de dióxido de carbono e gases de hidrocarbonetos são os mais

eficientes. Porém, devido ao elevado custo do gás natural, a utilização de CO<sub>2</sub> é mais adequada (NWIDEE et al., 2016). Alguns autores como Nuñez-López e Moskal (2019) afirmam que a injeção de CO<sub>2</sub> nos poços de petróleo além de estimular a recuperação do óleo remanescente pode contribuir com a captura e estocagem do gás auxiliando na redução de emissão de gases de efeito estufa. Os autores, ainda afirmam que essa técnica captura mais CO<sub>2</sub> do que qualquer outra operação industrial.

A recuperação química avançada do óleo ou CEOR (Chemical Enhanced Oil Recovery) foi desenvolvido nos anos 80 e é baseado na adição de diferentes produtos químicos, como álcalis, polímeros surfactantes à água de formação (LEITENMÜLLER; RUPPRECHT, 2019). Em muitos casos, a depender das características do reservatório é realizada uma combinação desses aditivos. Os compostos químicos são utilizados para aumentar a viscosidade dos fluidos injetados, para aumentar a eficiência de varredura e para reduzir a tensão interfacial entre a água e óleo cru (KAMAL; SULTAN; HUSSEIN, 2015).

A MEOR – Microbial Enhanced Oil Recovery, explora os microrganismos dos poços ou microrganismos de cepas selecionadas para produzir metabólitos específicos que ajudam na recuperação do óleo (SEN, 2008). Alguns exemplos da utilização dos microrganismos na MEOR estão expostos na Tabela 4.

Existem dois componentes essenciais envolvidos no processo: microrganismos e nutrientes. As fontes de microrganismos podem ser exógenas (SHENG, 2013). Não há dúvida de que os microrganismos têm a capacidade de melhorar a recuperação do petróleo em virtude da formação de alguns produtos. Por exemplo, as bactérias podem produzir ácidos a partir de óleo e outros compostos orgânicos que dissolverão os carbonatos, aumentando assim a permeabilidade do meio. Também podem produzir gases que aumentam a pressão no reservatório e que se dissolvem no óleo e diminuem a sua viscosidade. Biosurfactantes, emulsionantes e solventes que diminuem a viscosidade do óleo, tornando-o mais fácil de escoar, ou podem produzir biopolímeros que aumentam a viscosidade da água em operações de injeção, tornando a operação mais eficaz. Portanto, a questão não é se os microrganismos podem melhorar a recuperação do petróleo, mas sim como

empregar essa habilidade de uma maneira prática e cientificamente válida (BROWN, 2010).

Tabela 4- Microrganismos e seus produtos utilizados nas MEOR.

<b>Produtos microbiológicos</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>Papel na MEOR</b>
Gases (H <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> )	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Methanobacterium spp.</i> , <i>Desulfovibrio spp.</i>	Aumenta a pressão do reservatório, aumenta o volume do óleo, reduz a viscosidade do óleo, aumenta a permeabilidade pela dissolução de carbonatos.
Ácidos (ácidos de baixo peso molecular, ácido fórmico, ácido propanoico, ácido (iso)-butírico etc.)	<i>Clostridium spp.</i> , cultura mista de acidogênicas <i>spp.</i> , <i>Desulfovibri spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i>	Aumenta a porosidade e a permeabilidade pela dissolução de precipitados de carbonatos, reduz a permeabilidade, ajuda a emulsificação, produz CO <sub>2</sub> através da reação com minerais de carbonato que reduzem a viscosidade do óleo e aumentam as gotas de óleo.
Solventes (propanol, butanol, acetona, propano-2-diol etc.)	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Zymomonas spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Arthrobacter spp.</i>	Reduz a viscosidade do óleo pela dissolução de asfaltenos e componentes pesados do óleo, aumenta a permeabilidade do óleo pela dissolução de componentes pesados dos gargalos dos poros, tem efeito de cossurfactantes.
Biossurfactantes (ramnolipídios, glicolipídeos etc.)	<i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Rhodococcus spp.</i> , <i>Arthrobacter spp.</i>	Efeitos surfactante como mudança na molhabilidade, redução da saturação do óleo residual e emulsificação.

	<p><i>Corynebacterium spp.</i>,  <i>Clostridium spp.</i>,  <i>Mycobacterium spp.</i>, <i>Norcadia spp.</i></p>	
Biopolímeros	<p><i>Xanthomonas spp.</i>,  <i>Aureobasidium spp.</i>, <i>Bacillus spp.</i>, <i>Alcaligeness spp.</i>,  <i>Leuconostoc spp.</i>, <i>Sclerotium spp.</i>, <i>Brevibacterium spp.</i>,  <i>Enterobacter spp.</i></p>	Efeitos poliméricos como aumento da viscosidade da água.
Biomassas	<p><i>Bacillus spp.</i>,  <i>Leuconostoc spp.</i>,  <i>Xanthomonas spp.</i></p>	Atuam como agentes de conexão, deslocam o óleo pelo seu crescimento, melhoram a molhabilidade, reduzem a viscosidade do óleo emulsificando e removendo o enxofre.

Fonte: Adaptado de SHENG, 2013.

## 2.2 Transtornos enfrentados na produção do petróleo

Durante as operações de produção do óleo é enfrentando diversos tipos de inconvenientes e para superá-los são utilizados aditivos químicos. Essas substâncias atuam como inibidores de corrosão, inibidores de incrustações, sequestrantes de oxigênio, antiespumantes, polímeros, biocida, dentre outros.

Os dutos utilizados na indústria do petróleo e gás são em sua maioria constituídos de aço carbono e podem sofrer corrosão (ZHANG et al., 2015). Seja pela ação do oxigênio, gás carbônico, H<sub>2</sub>S dissolvidos nos fluidos, pelo crescimento de microrganismos, pelo pH dos fluidos ou por ação de salmouras e compostos ácidos (CHILINGAR; MOURHATCH; AL-QAHTANI, 2013). Esses mecanismos podem ser diminuídos ou retardados pela adição de inibidores de corrosão, biocidas, sequestrantes de oxigênio e outros compostos.

Outra questão é a deposição de compostos. Incrustações são normalmente formadas quando dois produtos químicos são empregados de forma conjunta e podem formar um precipitado. A inibição da formação de incrustações pode ser realizada pela adição de substâncias que reagem com os potenciais formadores de incrustações ou adicionando substâncias que reprimem a formação de cristais. Os inibidores de incrustações são hidrofílicos, se dissolvem em água e são adicionados juntos aos inibidores de corrosão. Fosfonatos são os inibidores mais eficientes a altas temperaturas, enquanto os polímeros são mais eficientes a baixas temperaturas (FINK, 2012).

No entanto, alguns dos compostos químicos utilizados na água de injeção podem servir de fontes de nutrientes para algumas bactérias o que pode estimular a atividade microbiana e promover a geração de sulfetos. A geração de sulfeto no reservatório não é apenas um problema de segurança e saúde, mas também reduz o valor econômico dos produtos aumentando o custo para manter a integridade dos produtos refinados (YIN et al., 2018)

### 2.3 Incrustações

Um problema comum nos reservatórios de campos petrolíferos são as incrustações que causam milhões de dólares em prejuízos anuais (BARAKA-LOKMANE; SORBIE, 2010). A formação de incrustações é a deposição de sais inorgânicos moderadamente solúveis em soluções aquosas. Junto à corrosão e formação de hidratos gasosos a precipitação de incrustações é um dos três maiores problemas relacionados às águas de produção. (KELLAND, 2010).

Essas incrustações geralmente se formam como resultado de mudanças repentinas nas condições do fluido (pH, temperatura ou pressão) ou se a mistura de salmoura é incompatível (BROWNING; FOGLER, 1995). A Figura 3 ilustra a formação de incrustações em uma tubulação.

De acordo com Patterson et al. (2017), a diminuição da pressão e/ou aumento da temperatura de uma salmoura, leva a uma redução na solubilidade de alguns sais o que leva à precipitação. Geralmente, esses fatores levam à precipitação de incrustações de carbonato (Ex:  $\text{CaCO}_3$ ). Segundo o mesmo autor, outro fator que viabiliza a formação de incrustações, é a evaporação da salmoura, o que resulta em um aumento da concentração de sal para mais do que o limite de solubilidade. Esse tipo de mecanismo pode ocorrer em poços de gás de alta pressão / alta temperatura, onde um fluxo de gás seco pode se misturar com a salmoura, resultando em desidratação e precipitação de cloreto de sódio.

Figura 3- Formação de incrustação dentro de uma tubulação.



Fonte: BARAKA-LOKMANE; SORBIE, 2010.

Além disso, Larestani et al. (2021) mostra que durante a extração do petróleo, é necessário realizar a manutenção da pressão do reservatório e para isso, uma grande quantidade de água é injetada. Devido ao alto custo da água doce, a água do mar que contém uma variedade de minerais, incluindo sulfato, é normalmente utilizada para operações de injeção de água. Ademais, a água de formação (salmoura) contém cátions de bário, estrôncio e cálcio etc. Antes da injeção de água, os íons existentes na salmoura são estáveis e estão em condição de equilíbrio. Porém, assim que a água do mar entra em contato com a salmoura existente, ambos os fluidos começam a trocar íons. Se a água injetada não for compatível com a salmoura existente, o processo de inundação causará precipitação de sais (normalmente incrustações de sulfato, como sulfato de bário, sulfato de estrôncio e sulfato de cálcio), o que leva à redução da permeabilidade, bem como ao declínio da porosidade.

A inibição desse processo pode ser obtida adicionando-se substâncias que reagem com potenciais formadores de incrustação ou adicionando-se substâncias que impedem o crescimento de cristais. (ZHANG et al., 2019).

De acordo com Kelland (2010) o acúmulo de incrustação pode causar o mau funcionamento de bombas e outros equipamentos além de reduzir o diâmetro interno da tubulação e, conseqüentemente, bloquear o escoamento

de fluidos. Segundo o mesmo autor, as incrustações mais comuns na indústria do petróleo são:

1. Carbonato de cálcio (calcita e aragonita)
2. Sais de sulfato: Sulfato de cálcio (gesso), Sulfato de estrôncio (celestita), e Sulfato de bário (barita) – O Rádio também pode ser encontrado na rede principalmente na rede de sulfato de bário.
3. Incrustações de sulfetos: Sulfeto de ferro (II), zinco e chumbo (II) são os mais comuns.
4. Cloreto de sódio (halita).

### 2.3.1 Incrustações de carbonato de cálcio

Ao contrário do bicarbonato de cálcio ( $\text{CaHCO}_3$ ), o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) é bastante insolúvel em água. Águas de formação normalmente apresentam em sua composição íons bicarbonato e cálcio. O equilíbrio químico representado pela Equação 1 é encontrado no sistema (KELLAND, 2010):



De acordo com o princípio de Le Chatelier, se a pressão do sistema cair o equilíbrio acima tende a deslocar para a direita para restabelecer a pressão, favorecendo a formação de  $\text{CO}_2$ . Como resultado, mais íons carbonatos são formados e o pH aumenta. Em um dado instante, a concentração de íons carbonato é suficientemente grande e ocorre a precipitação de carbonato de cálcio de acordo com a Equação 2 (KELLAND, 2010):

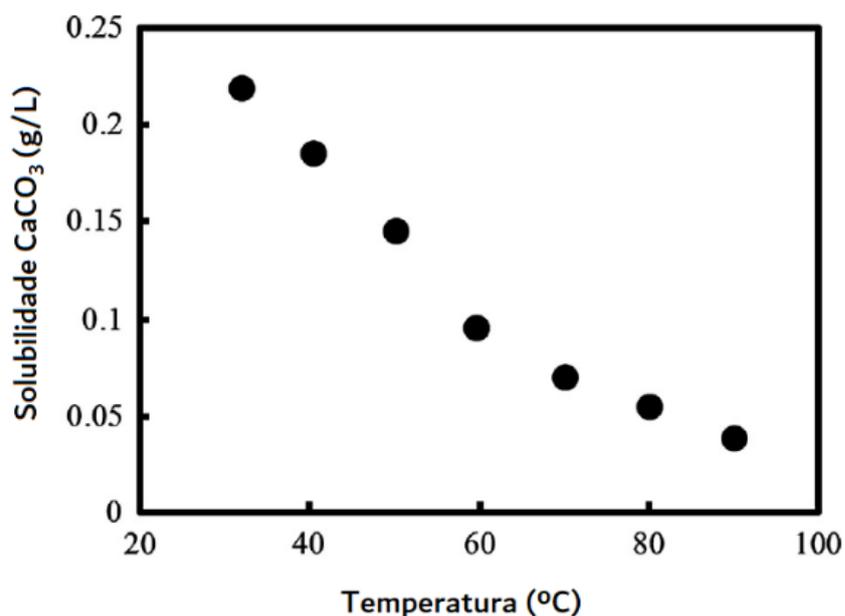


A queda brusca da pressão pode ocorrer em qualquer lugar do sistema de produção, por exemplo, durante as perfurações em regiões de estrangulamento da tubulação de produção, seja no fundo ou no topo do poço. Em casos em que as salmouras contêm altas concentrações de íons ferro (II)

pode acontecer a deposição de carbonato de ferro junto com as incrustações de carbonato de cálcio (KELLAND, 2010).

Outros fatores que influenciam na precipitação de  $\text{CaCO}_3$  é o aumento da temperatura, do pH ou da concentração de íons como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{HCO}_3^-$ . Quanto maior a concentração de íons incrustantes, maior será a supersaturação da solução e mais cedo ocorrerá a deposição de carbonato de cálcio. Para a temperatura, tem-se que a solubilidade do  $\text{CaCO}_3$  diminui à medida que a temperatura aumenta. Assim, a deposição de carbonato de cálcio frequentemente ocorre em regiões de elevadas temperaturas. (WANG et al., 2018). A Figura 4 correlaciona a temperatura com a solubilidade desse composto e ilustra essa questão.

Figura 4- Solubilidade do carbonato de cálcio em relação à temperatura.



Fonte: Adaptado de SANO; NAKASHIMA, 2018.

A relação entre os valores de pH e formação de carbonato de cálcio é explicada por Sano e Nakashima (2018). Os autores, utilizam o esquema apresentado na Figura 5 e a equação 3 para mostrar que a formação de  $\text{CaCO}_3$  ocorre quando o pH da solução atinge valores mais elevados, assim é favorecido a formação da espécie  $\text{CO}_3^{2-}$  que reagirá com o íon cálcio presente no meio. Por outro lado, em valores de pH baixos favorece a formação de  $\text{CO}_2$ .

Sendo assim, a manutenção dos fluidos com valores de pH abaixo de 6,9 previne a formação desse tipo de incrustações, uma vez que os íons estão completamente na forma de bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ).

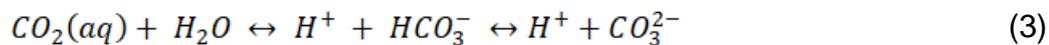
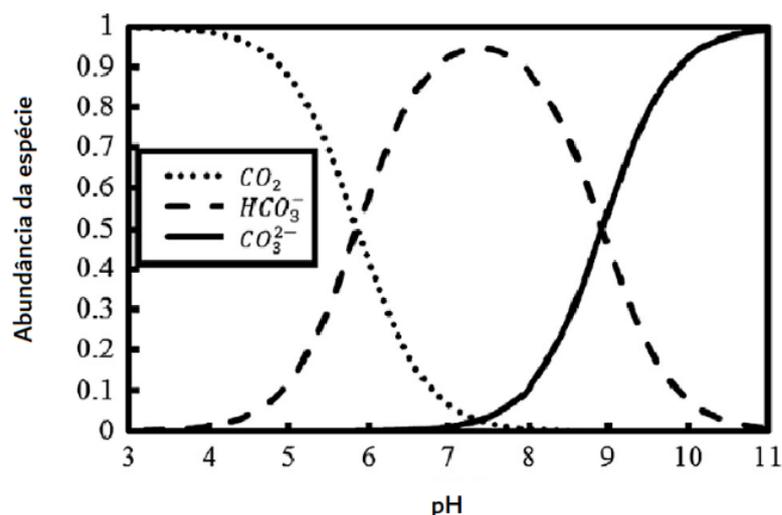


Figura 5- Esquema ilustrando a variação das espécies de acordo com pH da solução



Fonte: Adaptado de SANO; NAKASHIMA, 2018.

### 2.3.2 Incrustações de sais de sulfato

Como já mencionado anteriormente nesse trabalho, as incrustações de sulfatos geralmente se formam quando a água de formação, rica em íons de metais alcalinos terrosos, e água do mar com alta concentração de íons de sulfato se misturam. Os três principais tipos de incrustação de sulfato são: Sulfato de Cálcio, Sulfato de Bário e Sulfato de Estrôncio (CHILINGAR; MOURHATCH; AL-QAHTANI, 2013).

De acordo com Kelland (2010) os íons metálicos do Grupo II da Tabela Periódica, com exceção do magnésio, podem formar sulfatos ligeiramente solúveis (Equação 4):

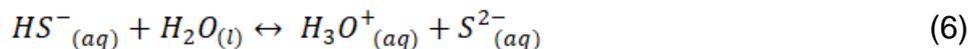
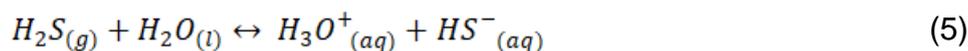


A solubilidade dos sulfatos diminui à medida que se desloca na família dos alcalino-terrosos, sendo o sulfato de cálcio (gesso anidro) a incrustação de sulfato mais fácil para se tratar por ser levemente solúvel em água e solúvel em muitos agentes quelantes. Já o sulfato de bário é o sulfato mais insolúvel e o mais difícil de controlar, sendo dissolvido a uma taxa razoável apenas em solventes específicos. Devido à sua alta insolubilidade, não é necessária uma concentração muito elevada de íons bário na água de formação para a incrustação de sulfato de bário (barita) se depositar (KELLAND, 2010).

### 2.3.3 Incrustações de sulfetos

As incrustações de sulfeto são menos comuns que as incrustações de carbonato e sulfato, mas tendem a se formar em grandes quantidades em poços ácidos, onde o gás  $H_2S$  é produzido e podem causar sérios problemas se não forem controladas. Os depósitos mais comuns incluem  $FeS$ ,  $ZnS$  e  $PbS$ . Quando ocorre esse tipo de incrustação, os poços geralmente são obstruídos de repente, e não gradativamente (KO et al., 2021).

O sulfeto de hidrogênio nos reservatórios de petróleo está associado à atividade microbológica, pela presença de Bactérias redutoras de Sulfato (BRS), e à processos geoquímicos resultantes da injeção de água do mar. Os cátions de diversos metais estão presentes na água de formação devido a dissolução de seus respectivos minérios com o passar dos anos. No entanto, a água de injeção enriquece ainda mais o meio com a presença desses metais. A depender do pH, os íons  $S^{2-}$  e  $HS^-$  se formam pela dissociação do sulfeto de hidrogênio na água e, com isso, ocorre a precipitação dos sulfetos metálicos (KEOGH et al., 2017). As equações químicas a seguir exemplificam esse processo com a formação de  $ZnS$ .



Similarmente, incrustações de sulfeto de ferro ou chumbo podem ser formadas

#### 2.3.4 Incrustações de cloreto de sódio

O cloreto de sódio é muito mais solúvel do que as incrustações descritas acima e sua solubilidade aumenta com o aumento da temperatura. Águas de formação têm concentrações muito elevadas deste sal, particularmente nos reservatórios de alta pressão e temperatura (KELLAND, 2009).

A água é supersaturada com NaCl nos reservatórios devido a vários fatores como temperatura, pressão pH, turbulência, evaporação e condensação. Contudo, principalmente na região próxima ao poço, durante o processo de produção, ocorre a diminuições de pressão e temperatura ocasionando a precipitação do NaCl (TAHERI-SHAKIB et al., 2018).

A cinética deste processo é muito rápida de tal forma que uma tubulação pode ser bloqueada rapidamente (KELLAND, 2010).

## 2.4 Hidratos gasosos

Outro desafio operacional enfrentado pela indústria petroleira é a ocorrência de hidratos de gás durante as operações de produção e transporte, o que causa prejuízos econômicos e ambientais (KHATINZADEH et al., 2020).

De acordo com Jordan et. al (2005) a formação desses compostos ocorre sobre a influência de alta pressão e baixa temperatura. Nessa condição, pequenas moléculas de hidrocarbonetos são presas em gaiolas formadas por moléculas de água que se ligam umas nas outras com ligações do tipo ponte de hidrogênio. São compostos sólidos com estrutura cristalina semelhantes ao gelo. A ocorrência de hidratos é bastante comum em plantas offshore e podem obstruir o poço e impedir a produção de gás. A Figura 6 ilustra a formação de hidrato de gás.

O método mais empregado para a inibir a formação de hidratos de gás é a utilização de inibidores químicos, que por sua vez, são compostos químicos onerosos ao tratamento (BAHADORI, 2015)

Figura 6- Hidrato de gás. À esquerda é apresentado um esquema ilustrando a formação do hidrato de gás. À direita uma tubulação com escoamento interrompido devido à formação de hidrato de gás.



Fonte: Adaptado de YEOMANS, 2020.

## 2.5 Inibidores de incrustações

Sabe-se que em certas operações da indústria do petróleo, tais como produção, estimulação e transporte, há o risco associado de deposição de incrustações. Isto ocorre devido à supersaturação das soluções, que ocorre basicamente devido às mudanças de temperatura ao longo das operações de

injeção. Como forma de prevenir a formação de incrustações o método mais empregado é a utilização de inibidores químicos. (ZHANG et al., 2019).

A prevenção à formação de incrustações é fundamental a fim de garantir a produção contínua das reservas existentes, impedindo o abandono prematuro devido ao inadequado gerenciamento da formação de incrustação e processos de corrosão associados (FINK, 2012).

Os inibidores de incrustações cessam o crescimento de cristais ou atrasam o processo de nucleação (aumentam o tempo de indução), o que, por sua vez, retardam o processo de formação de incrustações (ZHANG et al., 2019). Segundo Vilorio et al. (2010) os inibidores podem atuar de duas formas:

1. Através de efeitos de adsorção: Nesse caso, moléculas do inibidor ocupam os sítios de nucleação que são preferidos pelas moléculas formadoras de incrustações. Assim, os cristais não conseguem encontrar os sítios ativos onde aderir à superfície; conseqüentemente, a nucleação dos cristais é evitada.
2. Através de modificações morfológicas dos sítios em crescimento: Nesse caso, ocorrem mudanças morfológicas que impedem a formação dos cristais, em presença do inibidor. Dependendo das características do inibidor e da natureza do substrato sobre o qual atuará, é possível que seja adsorvido sobre a rede cristalina, gerando uma superfície de natureza complexa, que apresenta dificuldades em permanecer ou crescer nos sítios ativos.

Visto a importância do emprego dos inibidores de incrustações na recuperação do óleo, a seleção correta dos aditivos é de extrema importância para o sucesso do controle dos precipitados. Dessa forma, algumas características devem ser obedecidas (DUCCINI et al., 1997):

- Controle eficiente das incrustações a baixas concentrações de inibidor;
- Compatibilidade com água do mar e água de formação;
- Boas condições de adsorção e dessorção, de modo que os produtos químicos possam ser lentamente liberados na água de formação;
- Boa estabilidade térmica;
- Baixa toxicidade e biodegradabilidade;
- Baixo custo.

Os inibidores de incrustação podem ainda ser mais amplamente classificados como orgânicos ou inorgânicos. Os do tipo inorgânico incluem fosfatos condensados, tais como polimetafosfatos ou sais de fósforo. Os de natureza orgânica são os ácidos poliacrílico e fosfinocarboxílico, polímeros sulfonados e fosfonatos. Os fosfonatos tem sua atividade maximizada a altas temperaturas, enquanto os polímeros sulfonados comportam-se melhor a baixas temperaturas (ONOJAKE; WAKA, 2021).

Sendo que dentre todas as substâncias utilizadas como inibidores de incrustações, destacam-se as moléculas a base de fósforo como por exemplo polifosfatos inorgânicos, ésteres de fosfato, fosfonatos e aminofosfatos (YOUNES; EL-MAGHRABI; ALI, 2017).

Fosfonatos são altamente solúveis e estáveis em água enquanto ácidos fosfônicos são moderadamente solúveis. Fosfonatos não são voláteis e são pouco solúveis em solventes orgânicos. São efetivos sequestradores da maioria dos íons metálicos bivalentes como os íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . A afinidade por metais dessa classe química é maior em valores de pH altos. Todos os fosfonatos são bons quelantes dos metais de transição (JAWORSKA et al., 2002). Além disso, de acordo com Nowack (2003) a estabilidade do complexo metálico aumenta com o aumento do número de grupamentos  $\text{P}(\text{OH})_2$  e essa classe química são potentes inibidores da precipitação mineral (NOWACK, 2003).

As ligações C-P conferem às moléculas de fosfonatos uma alta resistência à hidrólise química e à decomposição térmica. Porém, estudos sobre a bioquímica da utilização de fosfonatos por microrganismos sugerem que a ligação C-P é muitas vezes o fator limitante da biodegradação desses compostos (SCHOWANEK; VERSTRAETE, 1990). No entanto, vários microrganismos foram identificados como capazes de usar fosfonatos como sua única fonte de fósforo: *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* e *Streptomyces morookaensis* (GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017).

Um tipo de fosfonato empregado para essa finalidade é o ácido dietileno-triamina-pentametileno-fosfônico (DTPMP) que é conhecido por ser o inibidor de incrustação mais eficaz em incrustações a base de carbonato (BARAKA-LOKMANE; SORBIE, 2010).

Porém, por questões ambientais a utilização de altas concentrações de fosfonatos estão se tornando cada vez mais restritas e o emprego de substâncias menos tóxicas ao ambiente vêm sendo desenvolvidas. Podemos citar os polímeros como os poliacrilatos e seus derivados, e vários homopolímeros e copolímeros a base de ácidos maleico e ácido sulfônico (BARAKA-LOKMANE et al., 2009). A eficiência dos inibidores de incrustações poliméricos estão associados ao pH, temperatura do fluido e à massa molar do próprio polímero (SENTHILMURUGAN et al., 2011)

Os principais tipos de inibidores de incrustação encontram-se descritos abaixo (Tabela 5), bem como suas principais limitações de aplicação (VILORIA et al., 2010):

Tabela 5- Principais tipos de inibidores de incrustações e suas limitações de emprego.

<b>Tipo de inibidor</b>	<b>Limitação no emprego</b>
Polifosfatos inorgânicos	Sofre hidrólise e pode precipitar como fosfato de cálcio devido à temperatura, pH, e presença de algumas enzimas.
Polifosfatos orgânicos	Sofre hidrólise dependendo da temperatura. Não é efetivo à altas concentrações de cálcio e deve ser aplicado a altas concentrações.
Polímeros baseados em ácidos carboxílicos	Baixa tolerância à presença de cálcio (em torno de 200 mg/L). Necessita de altas concentrações de inibidor.
Polímeros baseados no ácido tetracético	Alto custo.

Fonte: Adaptado de VILORIA et al., 2010.

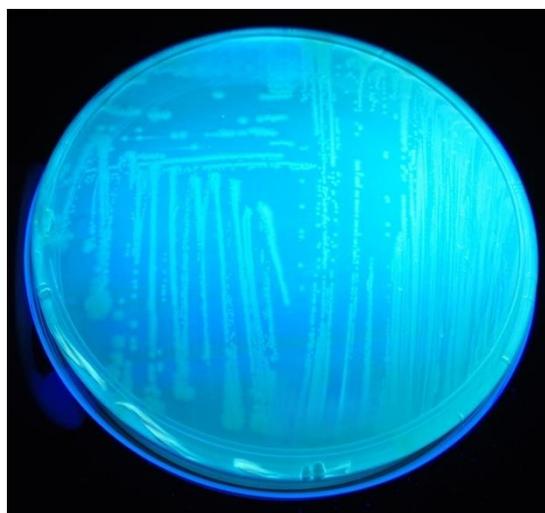
Ademais aditivos com etilenoglicol e metanol são empregados como inibidores de hidratos gasosos (KAN; FU; TOMSON, 2003). Como auxiliar ao etilenoglicol, etanolaminas podem ser usadas para formar sais úteis como inibidores de corrosão em soluções para perfuração de petróleo ou como anticongelantes de etilenoglicol (KNAAK et al., 1997).

Entretanto, Sunde et al. (1990) descreveu experimentos de crescimento microbiano, a partir de espécies isoladas de instalações de óleo, com o uso de vários produtos químicos utilizados em tratamentos de injeção de água. Os estudos revelaram que boa parte dos produtos pode ser utilizada como fonte nutricional, particularmente fontes de nitrogênio, carbono e fósforo. No entanto, os autores afirmam que o potencial de biodegradação é altamente dependente do tipo de aditivo e deve ser investigado.

## 2.6 Bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas*, descrito em 1894, é um dos gêneros bacterianos mais variados e onipresentes que abrangem espécies isoladas em todo o mundo. Nos últimos anos, foram descritas mais de 70 novas espécies, que foram isoladas de diferentes ambientes. Além disso, algumas espécies recentemente descritas são patógenas vegetais ou animais (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2017). Uma de suas espécies que merece atenção é a *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 7).

Figura 7- *Pseudomonas aeruginosa* em placa de Petri com meio Ágar Cetrimide sob luz U.V.



Fonte: O autor, 2022.

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbico Gram-negativo altamente cosmopolita, tendo sido isolado do solo, águas, plantas e animais, incluindo seres humanos. Os requisitos nutricionais mínimos, a tolerância à uma grande variedade de condições físicas e a relativa resistência aos agentes antimicrobianos contribuem para o sucesso ecológico e papel como agente patogênico efetivo (GALES et al., 2001). Além disso, são altamente adaptáveis e podem utilizar uma grande variedade de substratos para o seu crescimento (LAMBERT, 2002).

De acordo com Holt (1974) suas células são caracterizadas como bastonetes Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, mas não helicoidal com dimensões de 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm. São aeróbias e possuem um metabolismo respiratório com oxigênio como acceptor de terminal de elétrons.

As espécies de *Pseudomonas* são frequentemente encontradas no solo, em ambientes marinhos e tubulações de escoamento de óleo, são produtoras de biofilmes e associadas à corrosão em aços (JIA et al., 2017).

Essa bactéria é a principal produtora de ramnolipídeo, um glicolipídeo biosurfactante largamente estudado que pode efetivamente reduzir a tensão superficial de um sistema mesmo em pequenas concentrações (SHAO et al., 2017). Além disso, como comprovado por Zhou et al. (2018), é uma espécie formadora de biofilmes o que pode acelerar o processo de corrosão por pite em aços.

## 2.7 Bactérias da espécie *Shewanella algae*

A *Shewanella* spp. é um bacilo Gram-negativo móvel, cuja característica fenotípica mais importante é a produção de sulfeto de hidrogênio. A primeira descrição da espécie foi fornecida em 1931 por Derby e Hammer, que isolaram um taxon bacteriano, até então desconhecido, da manteiga apodrecida e do sistema de abastecimento de água de laticínio, e o chamou de *Achromobacter putrefaciens*. Em 1941, Long e Hammer propuseram que esta espécie fosse transferida para o gênero *Pseudomonas* sob o nome de *Pseudomonas putrefaciens*. Durante as próximas três décadas, estes organismos foram

classificados no grupo IV das *Pseudomonas* (HOLT; GAHRN-HANSEN; BRUUN, 2005).

De acordo com Holt, Gahrn-Hansen e Bruun (2005), na edição de 1974 do Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática, a *Pseudomonas putrefaciens* foi classificada como 'incertae sedis', principalmente porque o conteúdo de G+C (43-55%) estava abaixo do intervalo para *Pseudomonas* spp. (58-70%). No entanto, vários estudos concordaram que as cepas de *Pseudomonas putrefaciens* poderiam ser separadas em pelo menos duas diferentes classificações com base nas diferenças de tolerância ao sal, temperaturas de crescimento e atividade sacarolítica. Em 1978, foram divididas em quatro grupos homólogos de DNA. Em 1985, estudos filogenéticos resultaram em uma reclassificação desses organismos para a família *Vibrionaceae*, e a descrição de um novo gênero *Shewanella*. *Shewanella putrefaciens* e as espécies relacionadas *Shewanella hanedai* e *Shewanella benthica* foram incluídas nesse novo gênero.

No início dos anos 90, o grupo de homologia do DNA IV foi reclassificado como uma nova espécie, *Shewanella algae*, com base em estudos genômicos e fenotípicos que verificaram que a *Shewanella algae* tinha um teor de G+C de 52-54%, em comparação com 46% para as cepas do tipo *Shewanella putrefaciens*. Além disso, a homologia do DNA entre as cepas *Shewanella algae* e *Shewanella putrefaciens* foi detectada em taxas menores que 10%. Outros estudos confirmaram as diferenças genômicas significativas entre as duas espécies. Em 1997, o nome foi corrigido para *Shewanella algae* (HOLT; GAHRN-HANSEN; BRUUN, 2005).

As bactérias do gênero *Shewanella* são onipresentes, muito generalizadas no ambiente, encontradas em solos e em águas salobras onde esses microrganismos estão envolvidos na reciclagem de metais como ferro e manganês (PAGNIEZ; BERCHE, 2005). Elas são importantes na renovação da matéria orgânica e são capazes de realizar a redução dissimilatória de vários metais e outras substâncias, como nitrato, nitrito, tiosulfato (HOLT; GAHRN-HANSEN; BRUUN, 2005).

Linhagens de *Shewanella putrefaciens* podem reduzir óxidos metálicos, e, na sua maioria, bactérias do gênero *Shewanella* podem utilizar butano, como forma de reduzir a contaminação por óleo, em processos de bioremediação.

Biofilmes de *Shewanella* podem sequestrar gases, particularmente o dióxido de carbono, em formações geológicas subterrâneas, evitando sua liberação para a atmosfera. A *S. putrefaciens* é capaz de crescer sob condições anaeróbicas denitrificantes em óleo cru como única fonte de carbono. Este organismo pode ser utilizado na remoção de óleo, quando crescida às expensas de lactato ou peptona como fonte de carbono. Dessa forma, pode ser usada para fins de recuperação de óleo (KEELER et al., 2010).

A biocorrosão é um grave problema que afeta as instalações da indústria de petróleo e gás em todo o mundo e tradicionalmente, o grupo de bactérias de redução de sulfato foi considerado o principal responsável pela corrosão microbiologicamente influenciada. No entanto, outros microrganismos, como bactérias redutoras de metais e metanogênicos, podem desempenhar um papel fundamental nesses processos. *Shewanella* são bactérias anaeróbicas facultativas, redutoras de ferro e conhecidas pelo seu metabolismo versátil. Por essas bactérias terem a capacidade de reduzir ferro e sulfato, oxidar o gás hidrogênio e produzir sulfeto podem estar envolvidas na biocorrosão (LUTTERBACH et al., 2009). A Figura 8 ilustra uma placa de Petri com *Shewanella algae*.

Figura 8- *Shewanella algae* em placa de Petri com meio de cultura Marine Ágar



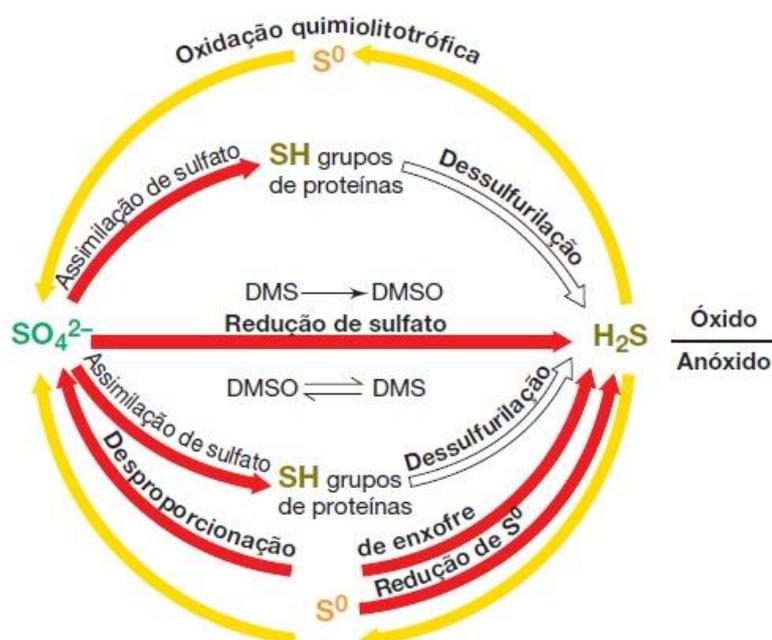
Fonte: O autor, 2022.

## 2.8 Bactérias Redutoras de Sulfato

As bactérias redutoras de sulfato ou BRS são microrganismos procariontes, anaeróbicos e amplamente encontrados na natureza. Geram energia (ATP) por meio da fosforilação acoplada à transferência de elétrons com o sulfato como o acceptor terminal de elétrons, o que resulta na formação de produtos finais altamente tóxicos (HEIDELBERG et al., 2004).

Esses microrganismos realizam a redução dissimilatória do sulfato, ou seja, geram energia pela oxidação de compostos orgânicos ou  $H_2$  com a redução do sulfato ( $SO_4$ ) para sulfeto ( $S^{-2}$ ) e outras substâncias contendo enxofre. Portanto, estão associados diretamente ao ciclo natural do carbono e enxofre (ZHOU et al., 2011). Um esquema representando a atividade de microrganismos na transformação do enxofre é mostrado na Figura 9.

Figura 9- Ciclo do enxofre: Ciclo redox do enxofre. As oxidações são indicadas pelas setas amarelas, e as reduções, pelas vermelhas. As reações nas quais não ocorrem alterações redox estão em branco. DMSO, dimetil-sulfóxido; DMS, dimetil-sulfeto.



Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2016

Como forma de complementar a Figura 9 a Tabela 6 correlaciona os processos do ciclo do enxofre com os organismos envolvidos.

Tabela 6- Processos do ciclo do enxofre e microrganismos envolvidos. DMSO, dimetil-sulfóxido; DMS, dimetil-sulfeto.

Processos-chave e procariotos no ciclo do enxofre	
Processo	Organismo
<b>Oxidação de sulfeto/enxofre</b>	
<b>(H<sub>2</sub>S → S<sup>0</sup> → SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Aeróbio</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quimiolitotróficos de enxofre (<i>Thiobacillus</i>, <i>Beggiatoa</i>, muitos outros)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anaeróbio</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bactérias fototróficas púrpuras e verdes, alguns quimiolitotróficos)</li> </ul>
<b>Redução de sulfato (anaeróbio)</b>	<i>Dessulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Archaeoglobus</i>
<b>(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> → H<sub>2</sub>S)</b>	<i>(Archaea)</i>
<b>Redução de sulfato (anaeróbio)</b>	<i>Dessulfuromonas</i> , várias arqueias hipertermofílicas
<b>(S<sup>0</sup> → H<sub>2</sub>S)</b>	
<b>Desproporcionação de enxofre</b>	<i>Dessulfovibrio</i> , e outros
<b>(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> → H<sub>2</sub>S + SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>	
<b>Oxidação ou redução de compostos orgânicos sulfurados</b>	Vários organismos são capazes de realizar esse processo
<b>(CH<sub>3</sub>SH → CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>S)</b>	
<b>(DMSO → DMS)</b>	
<b>Dessulfurilação</b>	Vários organismos são capazes de realizar esse processo
<b>(S → orgânico → H<sub>2</sub>S)</b>	

Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2016.

Segundo Muyzer e Stams (2008) as bactérias redutoras de sulfato são capazes de utilizarem diferentes fontes de substratos, incluindo açúcares,

aminoácidos e substâncias de um carbono como o metanol, monóxido de carbono e metanotiol. Essas bactérias também podem crescer pela desproporção de tiosulfato, sulfito e enxofre. Além disso, benzoato, fenol e hidrocarbonetos aromáticos também são degradados.

No entanto, segundo o mesmo autor, apesar da descoberta de que as BRS são capazes de crescer às custas de alquenos de cadeia carbônica longa e alcanos com tamanhos de cadeia carbônica variada, geralmente a utilização de polímeros orgânicos como amido, celulose, proteínas, ácidos nucleicos (DNA ou RNA) e gorduras não são utilizados diretamente como fonte de substrato por elas. No meio ambiente as BRS dependem de outros microrganismos que degradam esses substratos poliméricos em produtos menos complexos que são utilizados pelas bactérias redutoras de sulfato.

Logo, a biodegradação dos inibidores de incrustações por outras cepas como a *Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp. podem gerar produtos metabólicos que servirão como substrato para as BRS e conseqüentemente produzir H<sub>2</sub>S no sistema desencadeando processos de biocorrosão.

De acordo com Beech e Sunner (2004) o processo em questão, é o resultado de interações entre a superfície do metal, produtos de corrosão abiótica e células bacterianas e seus metabólitos que incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e compostos voláteis, como amônia e sulfeto de hidrogênio.

Wu et al. (2019) ilustra em seu trabalho estudos que correlacionam diretamente a atividade de BRS com a corrosão de aços carbono. Os dados mostram que cerca de 77% das falhas industriais por corrosão na indústria petrolífera dos Estados Unidos estão associadas a esses microrganismos. Outro ponto demonstrado pelo autor é a redução do tempo de vida útil de tubulações que sofreram corrosão microbiologicamente influenciada. Além disso, Gallego et al. (2021) estudaram a corrosão em tubulações de injeção de água de poços petrolíferos e verificaram que as bactérias redutoras de sulfato ativaram um mecanismo de corrosão localizada (por pite e rachaduras) que levou o sistema analisado à falha após apenas um ano em operação. A Figura 10 ilustra tubulações em que sofreram corrosão microbiologicamente influenciada.

Figura 10- Ilustração de partes de uma tubulação do sistema de injeção de água em poço de petróleo que sofreu corrosão microbiologicamente influenciada por BRS.



Fonte: Adaptado de GALLEGO et al., 2021.

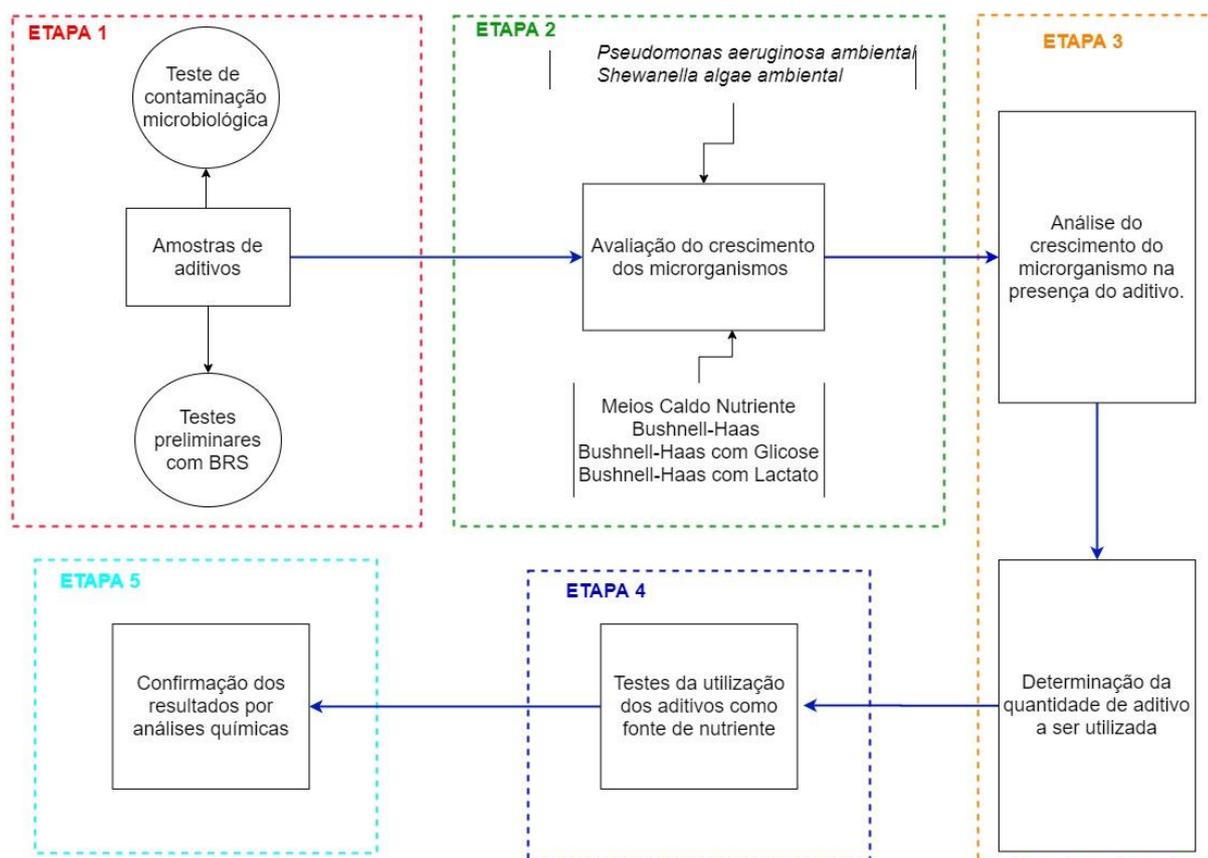
Além do mais, nos campos de petróleo, ambiente em que esses microrganismos são abundantemente encontrados, seu metabolismo tem consequências negativas como a acidificação do petróleo por produção de sulfeto, obstrução de máquinas e poros de rocha com biomassa e precipitados de sulfeto e a corrosão de máquinas de perfuração, bombas e tanques de armazenamento (HEIDELBERG et al., 2004).

### 3 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais adotados em cada etapa deste trabalho e suas respectivas metodologias são descritas a partir deste item. A mesma sequência de protocolos descrita a seguir deverá ser aplicada a todas as amostras de aditivos, com pequenas adaptações para atender às características químicas de cada amostra. Este trabalho foi composto basicamente por 5 etapas (visualizadas no fluxograma da Figura 11), a saber:

- Recebimento das Amostras, testes de detecção de contaminação e testes preliminares com BRS;
- Avaliação do crescimento dos microrganismos nos seguintes meios de cultura líquidos: Caldo Nutriente (CN), Bushnell-Haas isento de fonte de carbono (BH), Bushnell-Haas com Glicose (BHG) e Bushnell-Haas com Lactato (BHL);
- Determinação da concentração de aditivos a ser utilizada nos testes e análise da toxicidade das amostras;
- Testes da utilização dos aditivos como fonte de nutrientes; e,
- Confirmação da biodegradabilidade dos aditivos por testes químicos.

Figura 11- Fluxograma das etapas executadas nesse trabalho.



Fonte: O autor, 2022.

### 3.1 Etapa 1- Recebimento das Amostras, informações dos compostos e testes de contaminações

A primeira parte da metodologia se refere ao recebimento das amostras dos aditivos, a identificação de possíveis microrganismos originalmente presentes nas amostras como contaminantes e a realização de testes com bactérias redutoras de sulfato.

### 3.1.1 Recebimento das amostras

As amostras foram enviadas pelo CENPES da Petrobras e são recebidas pela equipe do laboratório. Poucas informações sobre as composições, concentrações e dosagens de aplicação dos aditivos são de conhecimento. No entanto, junto com o produto químico é fornecida a Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos - FISPQ, na qual se obtêm informações iniciais e gerais sobre a amostra. A partir daí, uma pesquisa bibliográfica é realizada para adquirir conhecimento sobre o produto químico.

O trabalho estudou quatro amostras de aditivos de composições diferentes. E algumas informações a respeito das amostras são expostas na Tabela 7.

Tabela 7- Informações técnicas das amostras.

<b>Amostra /Aditivo</b>	<b>Composição</b>	<b>Emprego</b>	<b>Temperatura de aplicação</b>	<b>Concentração de uso</b>
1	Etilenoglicol (30-60%) + Aminoetanol (0,1-1,0%)	Inibidor de Incrustações	65 °C	100 mg/L
			113°C	300 mg/L
2	Copolímero de ácido orgânico	Inibidor de Incrustações	90 °C	150 mg/L
			115 °C	400 mg/L
3	Mistura de ácidos policarboxílicos modificados em água	Inibidor de Incrustações	Não informado	Não informado
4	Pentafosfonato (DTPMP)	Inibidor de Incrustações	Não informado	50-100 mg/L ou 10% (v/v)

Fonte: O autor, 2022.

O Aditivo 1 é recomendado para uso como inibidor de incrustação, sendo classificado como um produto de toxicidade aguda oral Categoria 4 e de toxicidade de órgão-alvo específico para exposições sucessivas Categoria 2. Com relação à composição e informação sobre os ingredientes, o etilenoglicol está presente na concentração de 30-60% (v/v) e o 2-aminoetanol na concentração de 0,1-1% (v/v). O produto é um líquido transparente, incolor com

densidade relativa igual a 1,078 g/cm<sup>3</sup> e com ponto de fulgor de 95 °C. O Aditivo 1 é usado como inibidor na concentração de 100 mg/L a 65°C e 300 mg/L a 113 °C.

Diferentemente do que foi descrito anteriormente para a mistura de etilenoglicol e aminoetanol, as informações acerca do Aditivo 2 caracterizado como “Copolímero de ácidos orgânicos são bem mais escassas, incluindo até mesmo aquelas descritas na FISPQ relacionada ao produto.

A escassez de informações acerca do produto deve-se ao fato do produto ser caracterizado pelo fornecedor como um inibidor de incrustações, que na sua caracterização química é descrito como um “Polímero proprietário”, o que impede sobremaneira o acesso a informações que constituem segredo industrial.

As informações acerca da composição sobre os ingredientes apenas indicam o “polímero proprietário” na concentração de 35 a 50% e utilizado na concentração de 150 mg/L a 90 °C e 400 mg/L a 115 °C.

Do que se informa acerca do produto é que “não contém quantidades relevantes de substâncias cujo valor limite relacionado no local de trabalho tenha que ser monitorizado”, porém é corrosivo para os metais. Sabe-se que se trata de um líquido límpido, de coloração amarela a âmbar, com pH entre 6,0 e 7,0. Sua densidade pode variar de 1,16 a 1,24 g/cm<sup>3</sup>, com alta estabilidade química, não decomposto termicamente se usado conforme indicado.

A FISPQ do Aditivo 3 apenas descreve a composição como uma mistura de ácidos policarboxílicos modificados em água sem menção à concentração das substâncias presentes. A mistura é um líquido de coloração amarela, com odor característico e pH de 4,0. Outras informações técnicas presente são: ponto de ebulição de 96 °C; ponto de fulgor maior que 100 °C; ponto de congelamento a -1 °C; densidade de 1,050 g/cm<sup>3</sup> e solubilidade em água de 1000 g/L.

Ademais, a ficha alerta que a exposição ao produto pode provocar queimaduras severas à pele e danos aos olhos. É também considerado muito tóxico para organismos aquáticos. No entanto, nenhuma informação de aplicação é fornecida sobre essa amostra.

Assim como o Aditivo 2, o Aditivo 4 não apresenta muitas informações técnicas. Apenas foi informado que se trata de um inibidor de incrustações que

contém DTPMP (diethylenetriamine penta(methylene phosphonic acid). A FISPQ informa que o aditivo é um líquido de coloração marrom claro, com pH ácido na faixa de 3,0 a 4,0, ponto de ebulição de 100 °C, ponto de fulgor maior que 93,3 °C e densidade variável de 1,38 a 1,44 g/cm<sup>3</sup>. Também é característica do Aditivo 4 a estabilidade química em temperaturas normais e no uso recomendado do produto. A FISPQ ainda relata que o produto é incompatível com agentes oxidantes fortes e que a amostra pode se decompor em óxido de carbono, óxidos de nitrogênio e óxidos de fósforo.

Todas as amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos para avaliação da biodegradação, alterando-se eventualmente, em função da especificidade ou susceptibilidade à biodegradação apresentada por cada uma.

### 3.1.2 Testes de contaminação microbiológica das amostras fornecidas

Nessa etapa, procedeu-se à possível detecção de contaminação microbiana em todas as amostras. Para isso, em câmara de fluxo laminar, sob condições de assepsia, com auxílio de uma pipeta, foi inoculado o volume de 1 mL de cada amostra fornecida em placas de Petri estéreis, contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud, ideal para o crescimento de fungos filamentosos e Plate Count Agar (PCA), ideal para o cultivo e contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis, tudo em triplicata.

Com auxílio de uma alça de Drigalsky o volume inoculado foi espalhado superficialmente sobre a placa. As placas de Petri que continham Ágar Sabouraud completo foram incubadas em estufa a 23° C por 10 dias e as que continham o meio PCA foram incubadas a 35°C por até uma semana. Após os tempos de incubação foram avaliadas a presença ou ausência de crescimento de bactérias heterotróficas cultiváveis e fungos. Um esquema sintetizando o procedimento do teste de contaminação biológica é apresentado na Figura 12.

Figura 12- Esquema ilustrando o procedimento de verificação de contaminações microbiológicas.



Fonte: O autor, 2022.

### 3.1.3 Testes preliminares de biodegradação dos aditivos por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

A fim de verificar se o grupo de BRS é capaz de biodegradar diretamente as amostras fornecidas, procedeu-se à execução de um ensaio qualitativo, visando avaliar a estabilidade das amostras frente à biodegradação por BRS. Esta investigação foi programada com base em informação da literatura que alguns aditivos podem ser diretamente utilizados por essa classe de microrganismos.

Com base na formulação do Meio de Cultivo C proposto por Postgate (1984), foi preparado um litro da solução sendo este envasado em frascos tipo de penicilina, sob purga constante de nitrogênio para garantir anaerobiose. Um outro meio de cultivo foi preparado seguindo o mesmo procedimento do meio anterior, porém sem adição de fonte de carbono. Assim esse meio fica isento de fonte de carbono, permitindo o teste para avaliar o uso direto dos aditivos como fonte de carbono pelas BRS. Além disso, visando avaliar condições ultraconservativas do fundo do mar, foi preparada água do mar sintética e armazenada em frascos de vidro tipo de penicilina. Dessa forma, foram estabelecidos 3 grupos de meios: (1) Meio C completo; (2) Meio C isento de fonte de Carbono; (3) Água do mar sintética.

Após a esterilização dos frascos com 9 mL de meio de cultivo, em câmara de fluxo laminar, sob condições de assepsia, com auxílio de uma seringa foi adicionado 1 mL da amostra, em triplicata.

Por fim, foi inoculado 0,1 mL de inóculo contendo: (a) cultura pura de BRS; ou (b) cultura mista de BRS. Informações sobre as culturas de BRS são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8- Informações sobre as culturas de BRS utilizadas no trabalho.

Cultura	Microrganismo	Origem	Salinidade	Temperatura de cultivo
Cultura Pura	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Banco de Cepas (DSMZ)	Adaptada para 3,5% NaCl	30° C
Cultura Mista	<i>Desulfovibrio capillatus</i> ; <i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i> ; <i>Petrotogaceae bacterium</i> ; <i>Proteiniphilum sp</i> ; <i>Synergistaceae bacterium</i> ; <i>Synergistes sp.</i> ; <i>Tissierella sp.</i> ; <i>bacterium</i>	Água de produção	3,5% NaCl	30° C

Fonte: O autor, 2022.

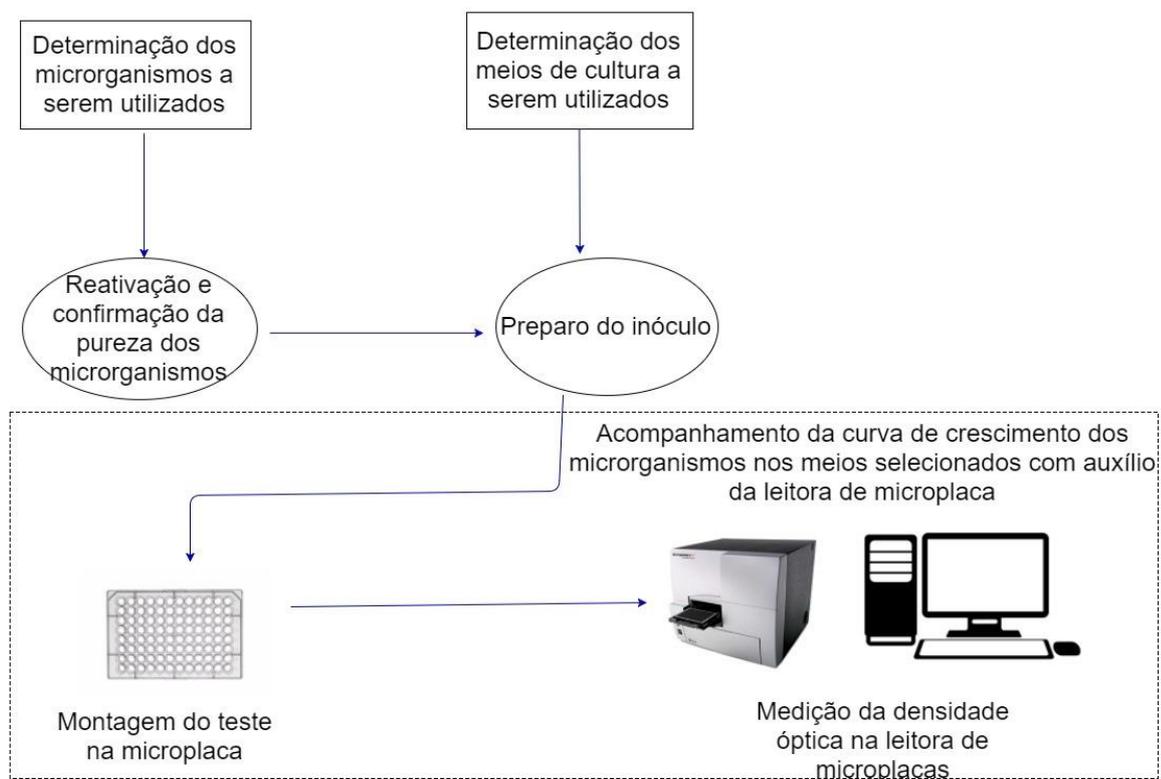
Após 28 dias verificou-se se houve crescimento microbiano nos frascos contendo o Meio C, Meio C isento de carbono e solução salina. O crescimento foi acompanhado pela mudança da coloração do meio de rosa para preto pela precipitação de sulfeto de ferro. No caso da solução salina, onde não há ferro, após 28 dias fez-se um novo inóculo, a partir das soluções salinas, e verificando-se a viabilidade das BRS (puras e mistas) em meio C completo. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Preparou-se um controle positivo, contendo apenas Meio de Cultivo C e inóculo para certificar que as células estão viáveis para o crescimento.

### 3.2 Etapa 2 - Avaliação do crescimento dos microrganismos em (a) Caldo Nutriente, (b) Bushnell-Haas isento de fonte de carbono, (c) Bushnell-Haas com Glicose e (d) Bushnell- Haas com Lactato

A segunda parte da metodologia foi realizada visando compreender a cinética de crescimento dos microrganismos selecionados para estudo e determinar a composição ideal dos meios de cultivo para cada cepa selecionada e as concentrações de inóculo a serem utilizadas nos experimentos. Os procedimentos realizados na etapa 2 são ilustrados na Figura 12.

Figura 13- Esquema detalhado dos procedimentos realizados na Etapa 2.

## ETAPA 2



Fonte: O autor, 2022.

### 3.2.1 Microrganismos utilizados como cepas de referência nos testes de biodegradação

Determinou-se que para o desenvolvimento do trabalho, seriam utilizadas as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* de origem ambiental, *Shewanella algae* também de origem ambiental. As cepas das bactérias foram obtidas do Banco de Cepas do LABIO/INT – Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação do Instituto Nacional de Tecnologia. A Tabela 9 resume algumas informações dos microrganismos e suas condições de cultivo utilizadas nos experimentos.

Tabela 9- Características dos microrganismos empregados em testes de biodegradação

<b>Microrganismo</b>	<b>Origem</b>	<b>Salinidade (g/L de NaCl)</b>	<b>Meio de cultivo (Sólido/Líquido)</b>	<b>Temperatura ideal de cultivo (°C)</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolada de poço do petróleo LABIO/INT	35	Ágar Plate Count e Ágar Cetramide/ Caldo Nutriente	30
<i>Shewanella algae</i>	Isolada de praia no RJ LABIO/INT	35	Ágar Marine/ Caldo Nutriente	30

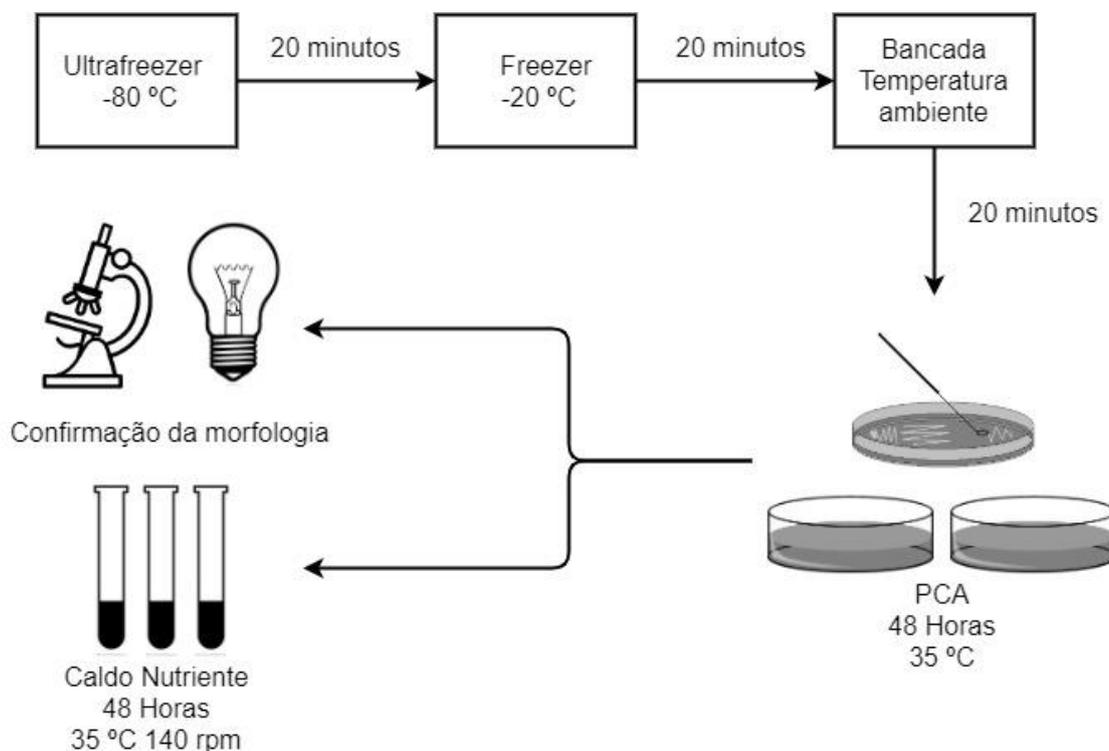
### 3.2.2 Reativação e confirmação da pureza dos microrganismos

O procedimento de reativação e confirmação da pureza dos microrganismos é ilustrado na Figura 14 e foi realizado apenas para as cepas de *P. aeruginosa* e *S. algae*.

As cepas originais estavam conservadas em tubos de 2,0 mL no ultrafreezer a -80 °C. Essas foram submetidas a um descongelamento escalonado para sua reativação. Transferiu-se cada frasco contendo as culturas de *P. aeruginosa* ou *S. algae* para um recipiente contendo propanol, armazenando-os em um freezer comum a -20° C. Após 20 minutos os tubos foram retirados dos recipientes e colocados em temperatura ambiente para descongelamento. Em seguida, com uma alça estéril, procedeu-se ao estriamento dos microrganismos em três placas de Petri, contendo 15 mL de Ágar Plate Count, seguido de incubação em estufa a 35° C, por 48 horas.

Realizaram-se os testes de coloração de Gram e visualização e confirmação da morfologia e pureza das cepas em microscópio ótico. Após a confirmação da morfologia, repicou-se uma colônia para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio Caldo Nutriente, incubou-se em estufa a 35°C, em mesa rotatória a 140 rpm por 48 horas.

Figura 14- Procedimento de reativação e confirmação da pureza dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella algae*.



Fonte: O autor, 2022.

### 3.2.3 Meios de cultivo utilizados

As curvas de crescimento para avaliação da cinética de crescimento dos microrganismos foram levantadas utilizando os meios Bushnell-Haas com lactato como fonte de carbono (BHL), Bushnell-Haas com glicose como fonte de carbono (BHG), Bushnell-Haas isento de fonte de carbono (BH) e no meio Caldo Nutriente (CN).

O meio Bushnell-Haas é recomendado para microrganismos que são capazes de degradar hidrocarbonetos. Esse meio de cultivo contém todos os nutrientes exceto a fonte de carbono, necessária para o crescimento de bactérias. Sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto férrico são proporcionados como oligoelementos. O nitrato de amônio é uma fonte de

nitrogênio enquanto fosfato monopotássico e fosfato dipotássico tamponam o meio (HIMEDIA, 2011).

Para avaliação da cinética de crescimento dos microrganismos utilizou-se os meios Caldo Nutriente, Bushnell-Haas com Lactato e Bushnell-Haas com glicose. E para os experimentos envolvendo as amostras de aditivos como fonte de substrato para os microrganismos, foram preparados meios de cultivo formulados a partir da composição base do meio Bushnell-Haas conforme apresentado na Etapa 4 da metodologia.

Por fim, os testes envolvendo as Bactérias Redutoras de Sulfato foram executados em meio de cultura Postgate C e suas adaptações.

Todas as composições e procedimentos para o preparo dos meios de cultivos utilizados na tese estão descritos no ANEXO A.

#### 3.2.4 Preparo do inóculo para os testes de degradação dos aditivos

Para o preparo do inóculo para os testes de degradação dos aditivos, utilizou-se uma proporção de 1/300 (v/v) de suspensão de microrganismos reativados por volume de meio testado como Green et al. (2012) sugerem.

Inicialmente, transferiu-se 100 µL de Caldo Nutriente com microrganismo ativado para um tubo contendo 9,0 mL de meio Caldo Nutriente e incubou overnight em shaker a 30° C sobre rotação de 140 rpm.

A partir dessa solução, transferiu-se 333,3 µL de suspensão de microrganismo crescido em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 1,0 mL de solução salina 3,5% de NaCl. Como forma de eliminar resíduos do meio Caldo Nutriente foi realizada uma extensiva lavagem das cepas. Para esse procedimento, centrifugou-se o conteúdo do tubo do tipo Eppendorf por 5 minutos a 5000 rcf (força centrífuga relativa), retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 1,0 mL da solução salina 3,5% de NaCl. Esse processo foi realizado três vezes. Com isso, a proporção de 1/3 (v/v) de suspensão de microrganismos reativados por volume de meio foi obtida. Durante os experimentos, inoculou-se a solução com as cepas lavadas com volume de tal forma que fosse obtida a proporção de 1/300 (v/v) desejada.

### 3.2.5 Curvas de crescimento dos microrganismos nos meios selecionados

O crescimento dos microrganismos foi monitorado em uma leitora de microplacas (Biotec – Synergy 2) utilizando microplacas de 96 poços. Em cada poço, adicionou-se 100 µL de meio de cultura com inóculo.

Para os meios Bushnell-Haas com Glicose e Bushnell-Haas com Lactato foi realizado o teste com quatro réplicas e testaram-se diluições diferentes. O inóculo inicial foi preparado com a concentração de inóculo/meio de 1/300 (v/v) e realizaram-se diluições sucessivas até a concentração de inóculo/meio de  $1/3 \cdot 10^8$ .

Os testes com os meios Caldo Nutriente e Bushnell-Haas foram realizados com cinco réplicas com a concentração de inóculo/meio de 1/300 (v/v). O equipamento foi configurado para realizar a leitura com comprimento de onda de 600 nm na temperatura ideal de crescimento de cada cepa. Monitorou-se o experimento até observar a fase de decaimento, com intervalos de leitura de 40 minutos. O esquema da Figura 14 exemplifica como o experimento foi estruturado.

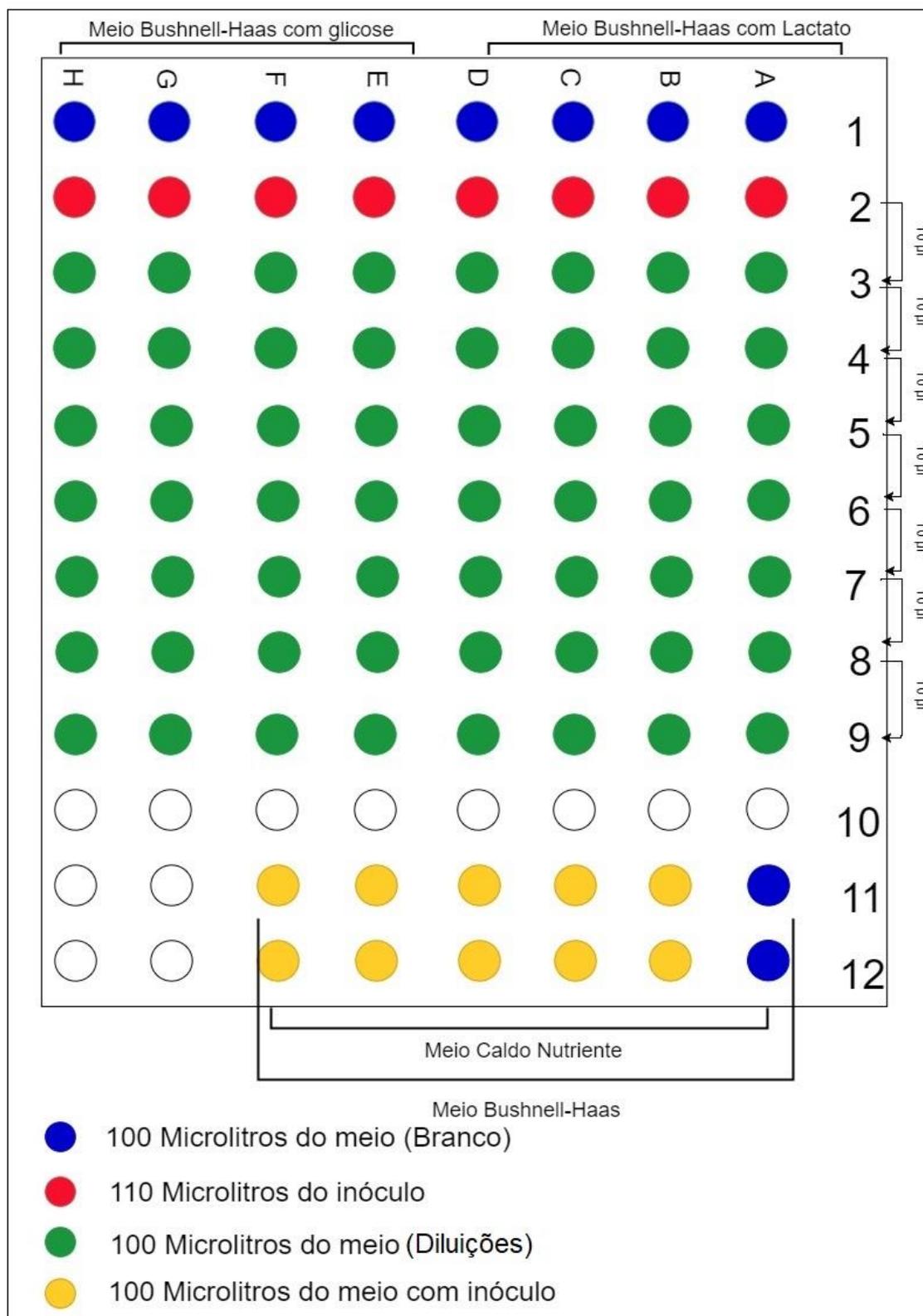
Testou-se, nas fileiras de 1 a 9, o crescimento dos microrganismos nos meios Bushnell-Haas com Lactato (colunas A, B, C e D) e Bushnell-Haas com Glicose (colunas E, F, G e H), num total de quatro réplicas de cada meio.

Os poços da fileira 1 foram preenchidos com 100 µL dos respectivos meios. Essa fileira representa o branco do experimento. Na fileira 2, foram adicionados 110 µL dos inóculos preparados conforme descrito no item anterior. Nos poços das fileiras 3 a 9 adicionou-se 100 µL de cada meio. Com uma pipeta automática de 10 µL, realizou-se a homogeneização dos poços da fileira 2. Após a homogeneização 10 µL desse poço foram transferidos para o poço seguinte (fileira 3). Com isso, realizou-se uma diluição de dez vezes em relação ao poço anterior. Esse processo foi repetido por todas as fileiras até a fileira 9. Após a homogeneização da fileira 9, descartou-se os 10 µL finais. Dessa forma, ao final da montagem da microplaca todos os poços ficaram com um volume total de 100 µL.

Os experimentos com os meios Bushnell-Haas isento de fonte de carbono e Caldo Nutriente foram realizados nas fileiras 11 e 12

respectivamente. Os poços 11A e 12A foram preenchidos com 100  $\mu$ L dos meios (branco do experimento). Os poços das colunas B a F dessas fileiras foram ocupados com 100  $\mu$ L dos meios com inóculos, já preparados anteriormente.

Figura 15- Diagrama montagem da microplaca para a escolha do meio e da concentração de inóculo

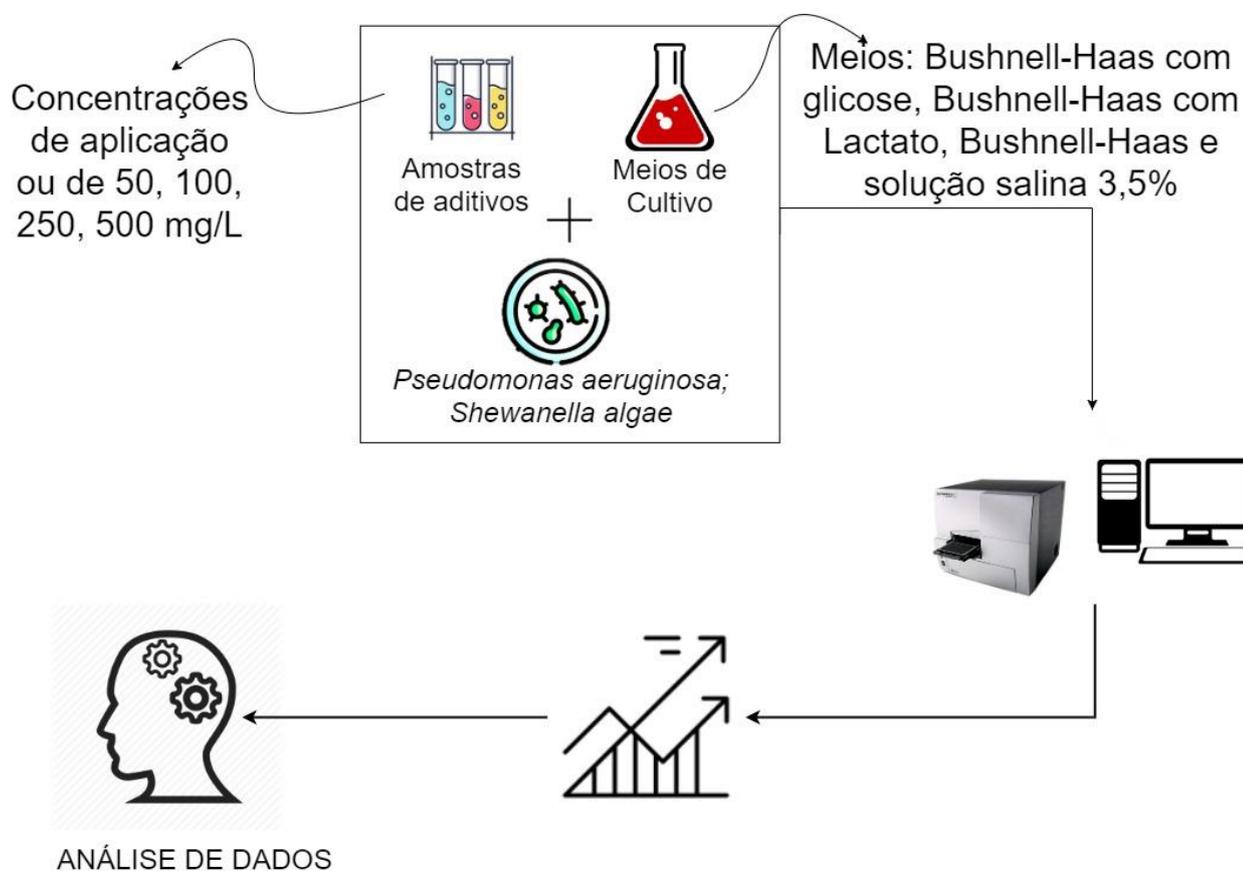


Fonte: O autor, 2022.

### 3.3 Etapa 3 – Análise do crescimento dos microrganismos na presença dos aditivos e determinação da concentração de amostra a ser utilizada nos testes

Nessa etapa da metodologia foi avaliado o efeito da adição dos aditivos sobre o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella algae*. As dosagens de aplicação em campo dos produtos foram utilizadas para a condução dos testes. No entanto, nem sempre a informação foi obtida e para a condução do experimento, utilizou-se as concentrações de 50, 100, 250 e 500 mg/L. Um esquema do procedimento é ilustrado na Figura 16.

Figura 16- Fluxograma ilustrando os procedimentos realizados na etapa 3



Fonte: O autor, 2022.

Com uma leitora de microplaca (Biotec – Synergy 2) e uma microplaca de 96 poços, acompanhou-se o crescimento dos microrganismos na presença

das Amostras e dos meios Bushnell-Haas com Glicose, Bushnell-Haas com Lactato, Bushnell-Haas e uma solução salina 3,5% de NaCl.

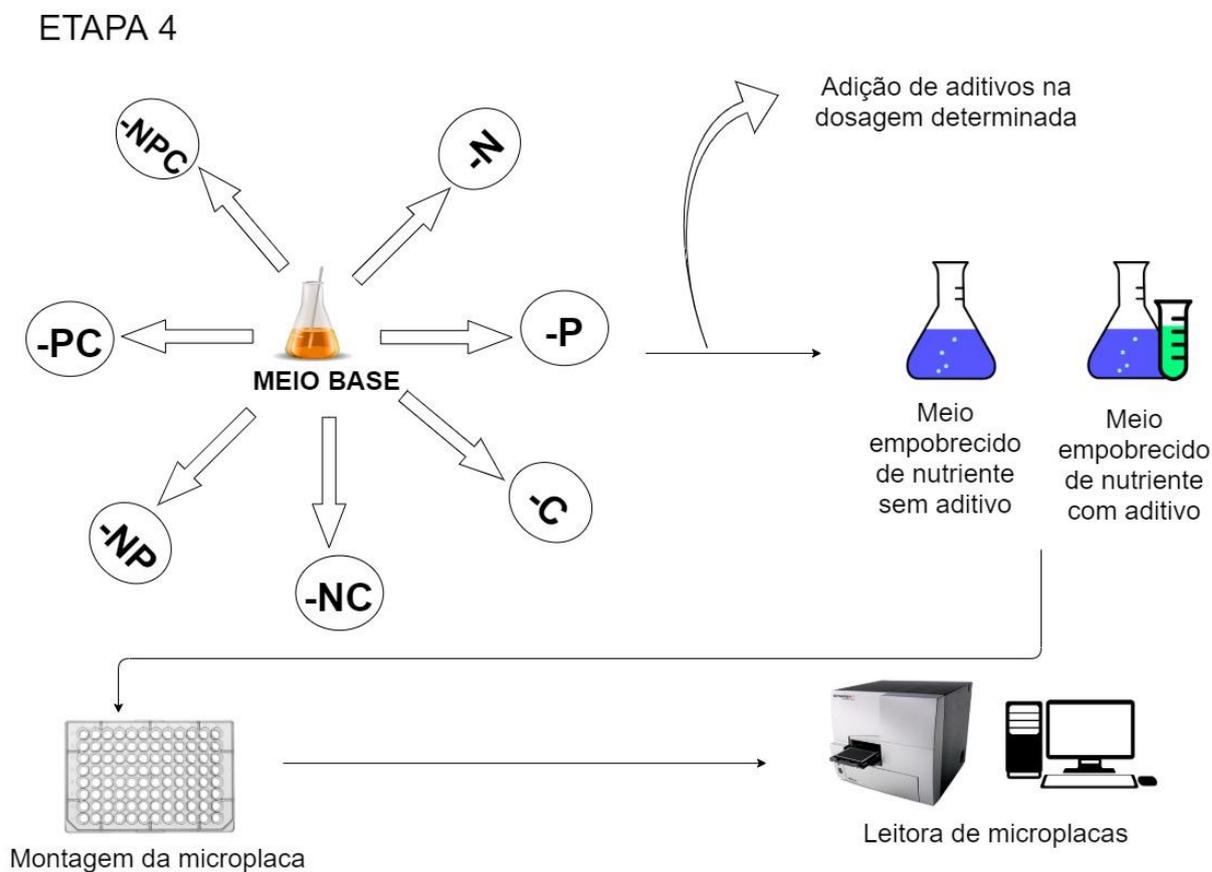
Realizou-se uma combinação de cada uma das amostras com os meios acima listados, sendo que os aditivos foram adicionados de acordo com as concentrações de aplicação nas operações ou com as concentrações pré-definidas (Figura 16). Além disso, montou-se na microplaca os controles de crescimento para cada meio. Nos controles foram adicionados apenas os meios e os microrganismos.

A concentração do inóculo foi determinada pelo teste anterior. O experimento foi realizado em triplicata e o equipamento foi configurado para realizar a leitura com comprimento de onda de 600 nm na temperatura ideal de crescimento de cada cepa. Monitorou-se o experimento até observar a fase de decaimento, com intervalos de leitura de 30 minutos.

#### **3.4 Etapa 4 - Testes da utilização dos aditivos como fonte de nutrientes**

A quarta parte da metodologia se refere aos testes de biodegradabilidade das amostras. O esquema apresentado na Figura 17 exemplifica o procedimento realizado nessa etapa.

Figura 17- Esquema ilustrando os procedimentos realizados na Etapa 4. -N refere-se a retirada de nitrogênio da composição; -C refere-se à retirada de carbono da composição; -P refere-se à retirada de fósforo da composição; e, NC, NP, PC e NPC as retiradas simultâneas desses elementos.



Fonte: O autor, 2022.

### 3.4.1 Preparo dos meios de cultivo definidos completos e com composição nutricional parcial

Para testar se os microrganismos são capazes de metabolizar as amostras, ou seja, utilizá-lo como fonte de nutriente, excluiu-se o elemento a ser testado da composição base do meio, substituindo-o por alíquotas dos aditivos determinadas por testes anteriores. Sendo assim, para avaliar a

capacidade de utilização das amostras como fonte de nutriente os seguintes meios foram preparados (Tabela 10). Dois meios de cada tipo foram preparados sendo que em um deles foi adicionado o aditivo (controle positivo – índice 1) e no outro não (controle negativo - índice 2). Na tabela, C refere-se à carbono, N à nitrogênio, P à fósforo, NC à nitrogênio e carbono, NP à nitrogênio e fósforo, CP à carbono e fósforo e NPC à nitrogênio, carbono e fósforo.

Tabela 10- Composição dos meios de cultivo em que se substituiu o elemento a ser testado como nutriente pelo aditivo

	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> .NO <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Lactato/Glicose	Aditivo
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	% (v/v)
Control e 1	0,02	0,2	1	1	1	0,05	10	C*
Control e 2	0,02	0,2	1	1	1	0,05	10	-
Meio s/ C 1	0,02	0,2	1	1	1	0,05	-	C*
Meio s/ C 2	0,02	0,2	1	1	1	0,05	-	-
Meio s/ P 1	0,02	0,2	-	-	1	0,05	10	C*
Meio s/ P 2	0,02	0,2	-	-	1	0,05	10	-
Meio s/ N 1	0,02	0,2	1	1	-	0,05	10	C*
Meio s/ N 2	0,02	0,2	1	1	-	0,05	10	-
Meio s/ CP 1	0,02	0,2	-	-	1	0,05	-	C*
Meio s/ CP 2	0,02	0,2	-	-	1	0,05	-	-
Meio s/ NC 1	0,02	0,2	1	1	-	0,05	-	C*
Meio s/ NC 2	0,02	0,2	1	1	-	0,05	-	-
Meio s/ NP 1	0,02	0,2	-	-	-	0,05	10	C*
Meio s/ NP 2	0,02	0,2	-	-	-	0,05	10	-
Meio s/ NPC 1	0,02	0,2	-	-	-	0,05	-	C*
Meio s/ NPC 2	0,02	0,2	-	-	-	0,05	-	-

C\*: concentração de amostra determinada pelos testes anteriores

Fonte: O autor, 2022.

### 3.4.2 Testes de utilização dos aditivos como fonte de nutriente

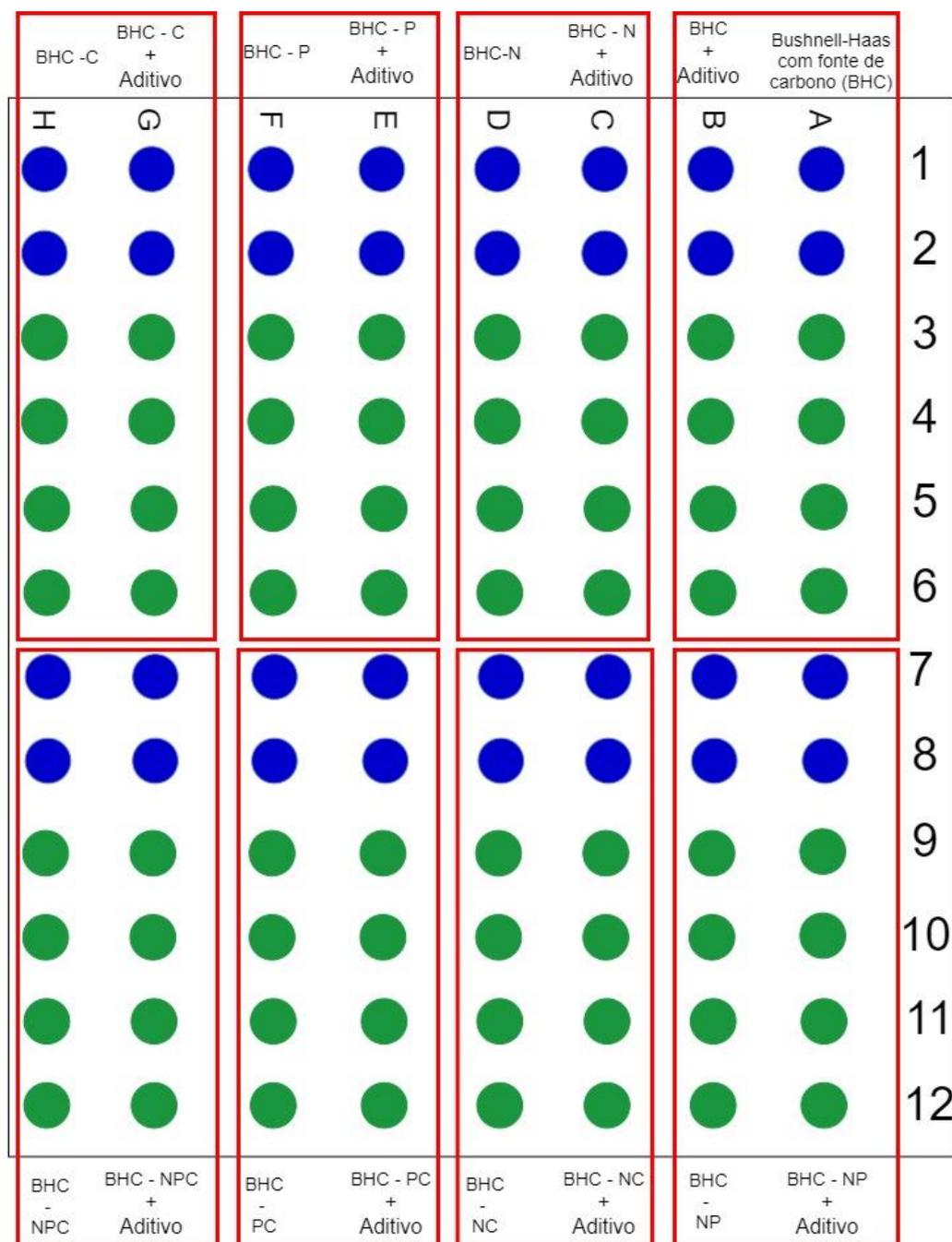
O esquema a seguir (Figura 12) ilustra a montagem dos testes na microplaca. Nas fileiras A e B foram adicionados 100  $\mu$ L dos meios Bushnell-Haas com fonte de carbono (BHC) e Bushnell-Haas com fonte de carbono e amostra. Os dois primeiros poços de cada fileira (1A, 1B, 2A e 2B) foram separados para os brancos (condição em que não há adição de microrganismos). Os quatro poços seguintes foram preenchidos com 100  $\mu$ L de meio (com aditivo ou não) mais o inóculo. Assim, o experimento foi realizado com quatro repetições.

Nos poços adjacentes (fileiras C e D) foram adicionados 100  $\mu$ L dos meios BHC sem nitrogênio com amostra e meio BHC sem nitrogênio. Os dois primeiros poços de todas as fileiras foram preenchidos com os brancos e os quatro poços seguintes com 100  $\mu$ L dos meios (com aditivo ou não) mais o inóculo. Esse procedimento se repetiu para as fileiras E, F, G e H, onde foram testados a retirada de fósforo e carbono respectivamente.

Na outra metade da microplaca (a partir da coluna 7) foram adicionados da mesma forma os meios em que foram retiradas as combinações dos nutrientes (NP, NC, PC e NPC). Dessa forma, aos poços das colunas 7 e 8 foram adicionados 100  $\mu$ L dos brancos e aos quatro poços seguintes, 100  $\mu$ L dos meios (com aditivo ou não) mais o inóculo.

Para a condução do experimento o equipamento foi configurado para realizar a leitura com comprimento de onda de 600 nm à temperatura ideal de crescimento do microrganismo até observar a fase de decaimento, com intervalos de leitura de 40 minutos. O esquema representativo dessa fase está representado na Figura 17.

Figura 18- Esquema da montagem da microplaca para o teste com os meios empobrecidos



- 100 Microlitros do meio (Branco)
- 100 Microlitros do meio com inóculo

### **3.5 Etapa 5 - Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com as amostras biodegradadas**

Como as bactérias heterotróficas podem gerar ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC) na presença de uma fonte de nutrientes, foram realizadas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para investigar se as amostras poderiam ser fontes de carbono ou de algum outro nutriente para essas bactérias, o que iria contribuir para o metabolismo de bactérias redutoras de sulfato. Assim, diferentes amostras, com composição variadas dos meios de cultura e adição de aditivos, foram preparadas e analisadas por CLAE, visando a identificação de ACCC nos produtos após degradação bacteriana identificada pelos testes anteriores.

Para tal, prosseguiu-se assim com o scale-up das condições selecionadas. Em um frasco de penicilina de 50 mL, estéril, adicionou-se 5mL de meio de cultivo (BHG, BHL ou BHC- nutriente) e alíquotas de aditivo e inóculo nas concentrações pré-estabelecidas nos experimentos anteriores. O meio foi homogeneizado e respeitou-se todos os parâmetros físicos de crescimento (temperatura, duração e agitação) das etapas anteriores. Em seguida, filtrou-se o experimento com membrana de acetato de celulose, porosidade de 0,45 µm, Millipore. O filtrado foi transferido para frascos limpos e estéreis e enviadas para as análises. Quando não era possível análise no mesmo dia, o experimento era acondicionado na geladeira à 4°C. Procedeu-se com as análises de cromatografia líquida de Alta eficiência conforme descrito a seguir.

#### **3.5.1 Análise dos ácidos carboxílicos de cadeia curta – ACCC**

As determinações analíticas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o equipamento Infinity Agilent Corporation, USA. Todas as análises foram executadas, segundo metodologia desenvolvida por Mesquita et al. (2013), com a coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x

7,8 mm), a 55°C. A fase móvel empregada foi uma solução de ácido sulfúrico, 0,01 mol/L, mantida no modo isocrático com uma vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL. Os ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC), de 1 a 5 carbonos, foram analisados no comprimento de onda de 210 nm com detector de MWD (Multiple Wavelength Detector) em um tempo total de análises de 35 minutos.

Os padrões de ACCC analisados foram: ácido fórmico (C1), ácido acético (C2), ácido propiônico (C3), ácido butírico (C4), ácido isobutírico (IsoC4), ácido valérico (C5) e ácido isovalérico (IsoC5). Todos os padrões analíticos dos ácidos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com alto grau de pureza (98-100%). Para cada ácido, foi preparada uma solução de 2 µL em 1mL de água MilliQ (ultrapura). Uma mistura desses ácidos também foi preparada, usando 2 µL de cada ácido em 1 mL de água MilliQ para posteriores análises.

### 3.5.2 Análise dos meios de cultura com ou sem adição dos aditivos anti-incrustantes

Foram preparadas amostras com as variações dos meios de cultura combinados com os aditivos químicos ou com os ACCC. Estas amostras foram analisadas por CLAE nas mesmas condições estabelecidas para os ACCC (item 3.5.1), com o objetivo de avaliar se ocorrerá alguma sobreposição aos sinais do ACCC.

Para a identificação dos ACCC nas amostras, uma análise individual foi feita com base nos tempos de retenção de cada ácido, comparando o perfil cromatográfico qualitativo aos padrões. Também foram analisadas por CLAE as amostras após o cultivo com microrganismos (conforme descrito em 3.5), com o objetivo de se avaliar o aparecimento de ACCC devido à uma possível degradação microbiana dos aditivos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos com os experimentos descritos pela metodologia. O tempo de duração de cada experimento foi ajustado de acordo com a taxa de crescimento de cada microrganismo testado e especificidade de cada teste. De acordo com Madigan et al. (2016), durante o crescimento exponencial, todos os componentes celulares aumentam proporcionalmente ao aumento do número de células. Um desses componentes é a própria massa celular que, com a passagem de um feixe de luz a dispersa. Com isso, a turbidez de uma solução de microrganismo é proporcional à concentração de células. Neste estudo, os resultados de crescimento microbiano, quando não especificados de forma diferente, serão apresentados com base na opacidade do meio. Esse será o princípio envolvido na medida de quase todos os ensaios microbiológicos, excetuando-se as quantificações de bactérias redutoras de sulfato.

### 4.1 Etapa 1

#### 4.1.1 Testes de contaminação das amostras fornecidas

A Tabela 11 ilustra o resultado do teste de contaminação das amostras processadas.

Tabela 11- Resultado teste de contaminação das amostras

<b>Amostra/Aditivo</b>	<b>Composição</b>	<b>PCA</b>	<b>Sabouraud</b>
Amostra 1	Etilenoglicol (30-60%) + Aminoetanol (0,1-1,0%)	(-)	(-)
Amostra 2	Copolímero de ácido orgânico	(-)	(-)
Amostra 3	Mistura de ácidos policarboxílicos modificados em água	(+)	(+)
Amostra 4	Pentafosfonato (DTPMP)	(-)	(-)

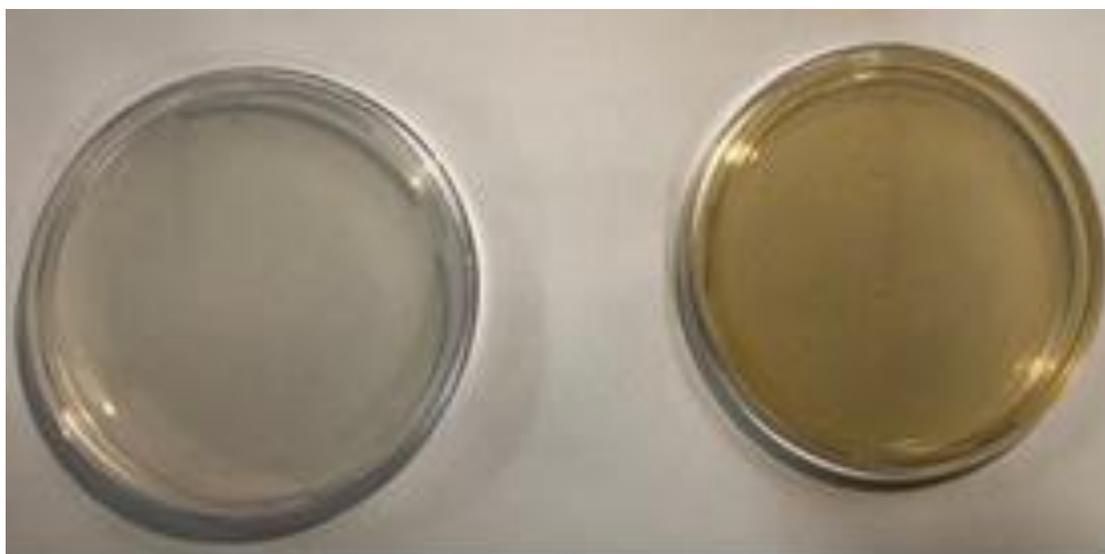
(-) ausência de crescimento celular. (+) Crescimento celular.

Fonte: O autor, 2022.

Como exposto pela Tabela 11 os aditivos 1, 2 e 4 não apresentaram contaminações uma vez que as placas de cultivo contendo os meios PCA e Sabouraud não apresentaram crescimento de microrganismos. Através da

Figura 19 pode-se verificar o resultado obtido. Como não há microrganismos contaminantes continuou-se com a metodologia sem qualquer intervenção no aditivo.

Figura 19- Imagem ilustrando o resultado do teste de contaminação microbiológica das Amostra 1, 2 e 4 em meio PCA (à esquerda) e meio Sabouraud (à direita).

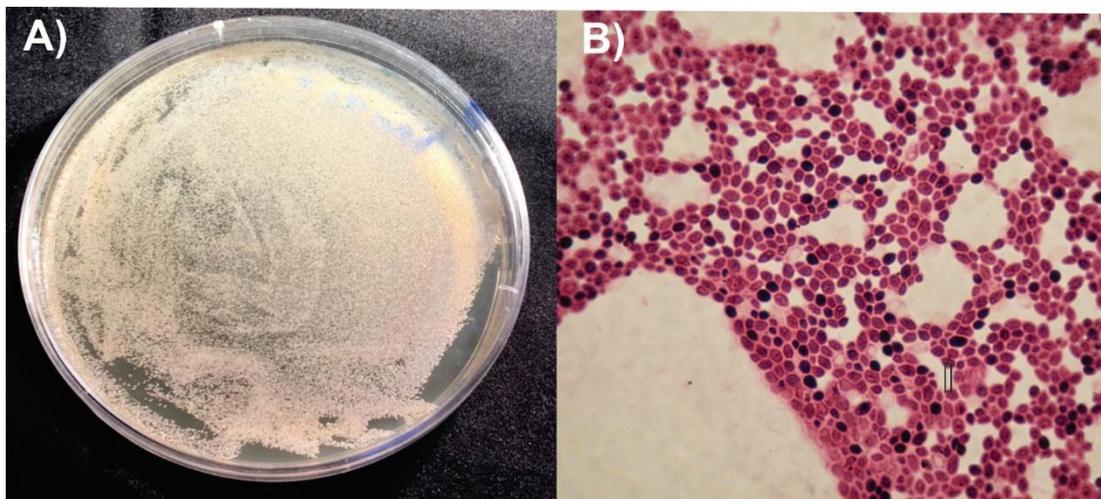


Fonte: O autor, 2022.

No entanto, o Aditivo 3 apresentou crescimento microbiológico nos dois meios de cultivo (PCA e Sabouraud). Para obtenção de mais informações sobre a contaminação um teste de coloração de Gram foi realizado. A Figura 20 ilustra esse resultado. Após a análise da morfologia das colônias pela visualização das placas de Petri e por microscopia ótica (em aumento de 400x) do teste de Gram há indicação que o microrganismo seja uma levedura.

Para dar continuidade aos experimentos, a amostra de Aditivo 3 foi filtrada em filtro Millipore® 0,45 µm. Em seguida, um novo teste de contaminação (em meio Sabouraud, PCA e Caldo Nutriente) foi realizado e não apresentou crescimento celular. Com isso, continuou-se os experimentos com o Aditivo 3 filtrado.

Figura 20- A) Imagem ilustrando o resultado do teste de contaminação microbiológica da Amostra 3 em meio PCA. B) Resultado do teste da coloração de Gram.



Fonte: O autor, 2022.

#### 4.1.2 Testes preliminares de biodegradação dos aditivos por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Esse procedimento mostrou-se necessário para verificar se o grupo de Bactérias Redutoras de Sulfato é capaz de utilizar os aditivos como fonte de

nutrientes direta. Além disso, conseguimos assim informações sobre a toxicidade das amostras perante a esse grupo. Os resultados do teste após 28 dias de incubação estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12- Resultado do crescimento de cultura pura de BRS e cultura mista de BRS em diferentes tipos de meio na presença das amostras. (+) crescimento positivo e (-) ausência de crescimento.

<b>Meio de Crescimento</b>	<b>Aditivo 1</b>	<b>Aditivo 2</b>	<b>Aditivo 3</b>	<b>Aditivo 4</b>
Meio C com lactato + Aditivo	Cultura	Cultura	Cultura	Cultura
	Mista (+) e	Mista (+) e	Mista (+) e	Mista (+) e
	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)
Meio C isento de fonte de Carbono + Aditivo	Cultura	Cultura	Cultura	Cultura
	Mista (+) e	Mista (-) e	Mista (+) e	Mista (-) e
	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (-)
Água do Mar + Aditivo	Cultura	Cultura	Cultura	Cultura
	Mista (+) e	Mista (-) e	Mista (+) e	Mista (-) e
	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (+)	Cultura Pura (-)

Fonte: O autor, 2022.

Esses resultados estão ilustrados no Quadro 2

Quadro 2- Resultados dos testes preliminares com BRS

		Cultura Mista	Cultura Pura
Aditiv o 1	Meio C com Lactato e aditivo		

	Meio C sem Lactato e aditivo		
	Água do mar e aditivo		
Aditivo 2	Meio C com Lactato e aditivo		
	Meio C sem Lactato e aditivo		
	Água do mar e aditivo		
Aditivo 3	Meio C com Lactato e aditivo		
	Meio C sem Lactato e aditivo		
	Água do mar e aditivo		

Aditivo 4	Meio C com Lactato e aditivo		
	Meio C sem Lactato e aditivo		
	Água do mar e aditivo		

Fonte: O autor, 2022.

As cepas da cultura mista e pura de BRS apresentaram crescimento no Meio C com lactato com adição dos Aditivos 1, 2, 3 e 4, mostrando assim, que todos os aditivos não são tóxicos para as cepas analisadas e não atuaram como biocidas quando presentes em um meio rico em nutrientes.

Nos testes em que a fonte de carbono (lactato) foi suprimida, houve crescimento de ambas as culturas quando na presença dos Aditivos 1 e 3, conforme demonstrado no Quadro 2. Esse resultado mostra a capacidade de utilização desses aditivos como fonte de carbono pelas culturas de bactérias redutoras de sulfato.

No entanto, apenas a cultura pura apresentou crescimento em meio C sem lactato com Aditivo 2, o que demonstra a utilização dessa substância como fonte de carbono. Porém a cultura mista de BRS não apresentou crescimento nessa condição. Como a cultura mista apresenta uma maior variedade de microrganismos, vide Tabela 8, era esperado um resultado oposto. Sendo assim, o experimento foi repetido e os resultados permaneceram os mesmos. Portanto, fica claro que a degradação do aditivo se deve à espécie *Desulfovibrio desulfuricans* que está presente apenas na cultura pura.

Quando as fontes de carbono foram substituídas pelo Aditivo 4 as culturas estudadas não apresentaram crescimento (Meio C sem Lactato e Aditivo 4). Fato que mostra que o aditivo não pode ser utilizado como fonte de carbono por ambas as culturas de BRS estudadas. O resultado vai de encontro ao apresentado por Nowack (2003), que relata em seu trabalho que diversos testes de biodegradação envolvendo polifosfonatos (incluindo o DTPMP) falharam em comprovar a quebra dessas moléculas e sua utilização como fonte de nutriente por microrganismos.

Conforme descrito pela metodologia, a identificação do crescimento das culturas de BRS em meios contendo água do mar sintética e aditivos foi realizada após os repiques dos experimentos para fracos contendo Meio C. Como constatado pelo Quadro 2, as culturas mista e pura apresentaram crescimento celular na presença dos Aditivos 1 e 3. Conclui-se então que esses aditivos são capazes de sustentar o crescimento das cepas de BRS testadas em condições com poucas fontes de nutrientes. O Aditivo 2 em água do mar, apenas promoveu crescimento da cultura pura, resultado esperado, uma vez que, em meio mais completo, também não promoveu o crescimento da cultura mista.

Em concordância com a utilização do Aditivo 2, pela cultura pura, como fonte de nutriente por BRS, no trabalho desenvolvido por JIA et al. (2018), é apresentado a utilização de um polímero como fonte de nutriente por um consórcio de bactérias produtoras de biofilme, isolada de campo de petróleo. O polímero estudado é utilizado como aditivo na CEOR e promoveu o crescimento de espécies de bactérias redutoras de sulfato. Além disso, LI et al. (2016) mostrou que um polímero utilizado para aumentar a viscosidade da água de injeção, em poços que utilizam a recuperação avançada de óleo, serviu de fonte de nitrogênio e carbono para uma cultura mista de bactérias em que continha BRS em sua composição.

As culturas estudadas não apresentaram crescimento em água do mar enriquecida com Aditivo 4, resultado esperado, já que, o crescimento em meios de cultivo mais ricos não aconteceu. Sendo assim, fica evidente que o Aditivo 4 não é metabolizável pelas culturas de BRS.

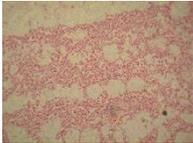
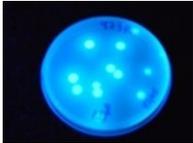
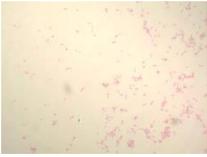
#### 4.2 Etapa 2 – Avaliação do crescimento dos microrganismos em a) Caldo Nutriente, (b) Bushnell-Haas isento de fonte de carbono, (c) Bushnell-Haas com glicose e (d) Bushnell-Haas com Lactato

Essa etapa do trabalho visa compreender a cinética de crescimento dos microrganismos nos meios selecionados para os experimentos.

##### 4.2.1 Reativação e confirmação da pureza dos microrganismos

As características esperadas para as colônias puras dos microrganismos utilizados nesse trabalho, para ensaios com aditivos, são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13- Confirmação da pureza das colônias testadas

Microrganismo	Apresentação em placa	Teste de coloração de Gram	Teste de emissão em U.V.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Shewanella algae</i>			Não apresenta emissão de fluorescência

Os resultados de observação microscópica e emissão de fluorescência indicaram que as duas linhagens escolhidas para trabalhos com os aditivos estavam realmente puras, sem qualquer evidência de contaminação por outras espécies.

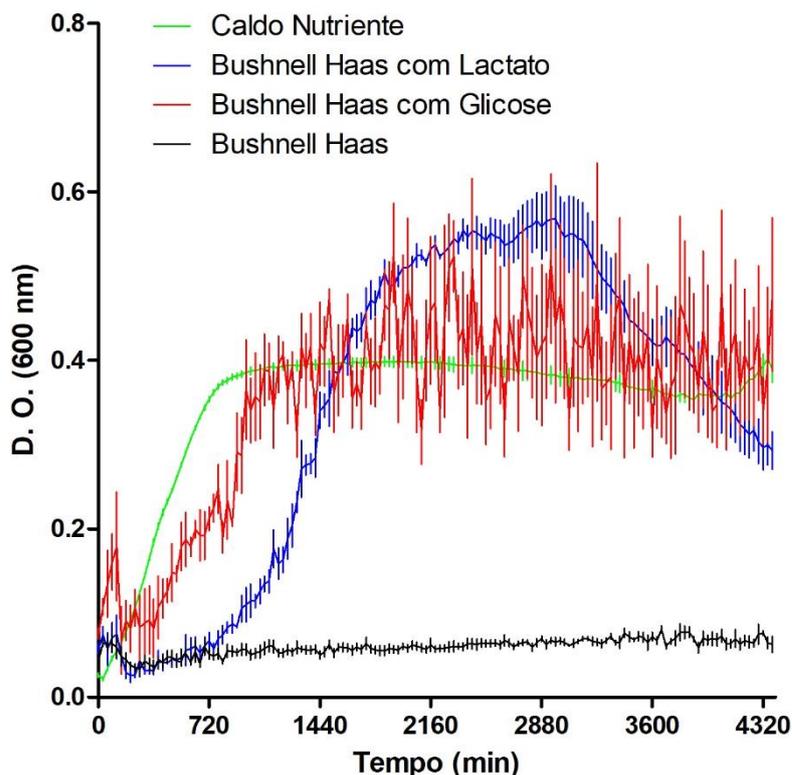
#### 4.2.2 Curvas de crescimento dos microrganismos nos meios selecionados

Nos testes realizados os microrganismos foram cultivados em meios de cultura modificados contendo os aditivos químicos como substitutos de algumas fontes de nutrientes. Logo, não se tem a garantia de que acontecerá crescimento dos microrganismos. No entanto, a análise de que os microrganismos não se desenvolveram por serem incapazes de metabolizar os aditivos pode ficar comprometida caso não se tenha a certeza de que o meio de cultura suporte, de maneira satisfatória, o crescimento dos microrganismos.

O meio Caldo Nutriente foi utilizado como um controle positivo do experimento. Essa condição é de extrema importância, pois com essa fonte nutricional é garantido que as cepas de *P. aeruginosa* e *S. algae* irão crescer e a comparação com outros meios de cultivo (outras fontes de nutriente), que estão sendo testadas, poderá ser realizada.

A Figura 21 mostra o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* *ambiental* nos meios Bushnell-Haas com lactato, Bushnell-Haas com glicose, Bushnell-Haas e meio Caldo Nutriente. Para essa cepa de bactéria, iniciou-se os testes com proporções de inóculo/meio de 1:3 (v/v), com intuito de diminuir a fase de adaptação do microrganismo. Logo, os resultados mostrados para essa cepa serão com base nessa proporção de inóculo.

Figura 21- Crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em meio de cultura CN, BHG, BHL e BH. Inóculo de 1:3 (v/v), 35° C e tempo de 73 h



Fonte: O autor, 2022.

De acordo com o resultado do teste apresentado pelo gráfico da Figura 21, constata-se que o meio que proporciona um melhor crescimento para essa cepa é o Bushnell-Haas com Lactato. Nesse meio, o crescimento máximo de aproximadamente 0,57 unidades de D.O<sub>600</sub> (densidade ótica a 600 nm) num intervalo de tempo de 49 horas. Porém, essa é a condição que apresenta a maior fase Lag da bactéria. O microrganismo apresenta a menor fase de adaptação em Caldo Nutriente e nessa condição de cultivo, alcança 70,7% do crescimento máximo em Bushnell-Haas com lactato.

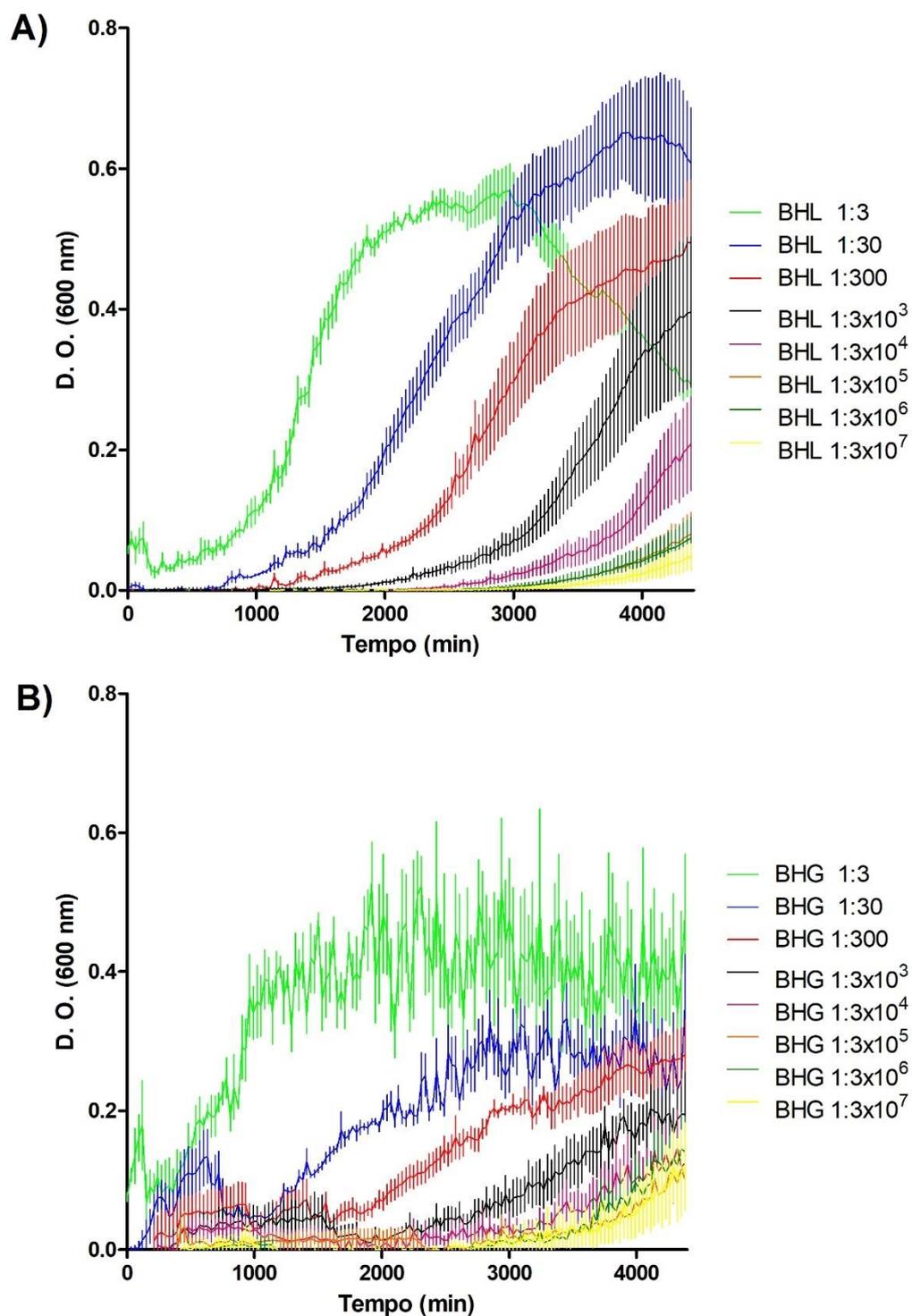
Após realizar o teste Two-Way-Anova pelo programa Graphpad® pode-se afirmar que as curvas de crescimento para a *P. aeruginosa* ambiental nos meios Bushnell-Haas com glicose e Caldo Nutriente não apresentam diferença estatística em um nível de confiança de 95%. Essas duas curvas mostram que apesar da fase de adaptação do microrganismo em meio Bushnell-Haas com

glicose ser um pouco maior, ambas as condições promovem o crescimento de forma igual.

A cepa da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental não apresentou crescimento em meio Bushnell-Haas sem fonte de carbono adicionado conforme já esperado.

A Figura 22 mostra o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental com diferentes concentrações de inóculo no meio Bushnell-Haas com lactato e com glicose. Pode-se observar que em ambos os meios de crescimento (com lactato ou glicose) as curvas de crescimento apresentam similaridade em sua tendência, apenas defasadas temporalmente uma em relação à outra. Esse comportamento obtido condiz com o esperado, já que os experimentos apenas diferenciam na diluição do inóculo. Como forma de facilitar a montagem do experimento e reduzir o tempo de adaptação da cepa, escolheu-se a proporção de inóculo/meio de 1:30 (v/v) para avançar com os experimentos com essa cepa de bactéria.

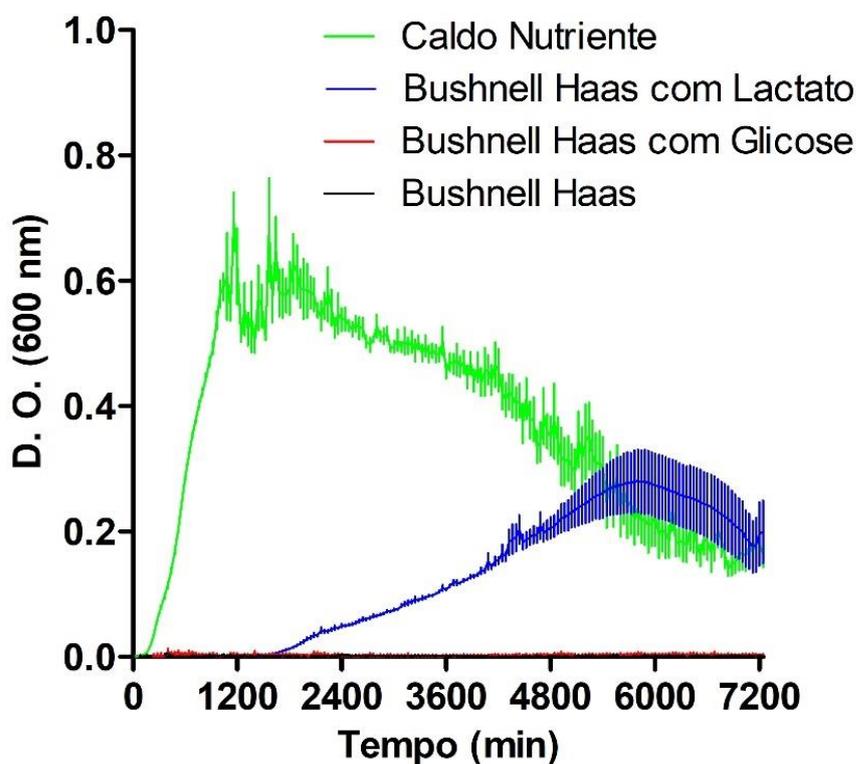
Figura 22- Crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental: (A) BHL e (B) BHG e com proporções de inóculos/meio de 1:3, 1:30, 1:300, 1:3.10<sup>3</sup>, 1:3.10<sup>4</sup>, 1:3.10<sup>5</sup>, 1:3.10<sup>6</sup>, 1:3.10<sup>7</sup>(v/v). 35° C e tempo de 73 h



Fonte: O autor, 2022.

Os resultados do crescimento da *Shewanella algae* em meios Caldo Nutriente, Bushneel- Haas, Bushnell-Haas com glicose e meio Bushnell-Haas com lactato é mostrado na Figura 23.

Figura 23- Curva de crescimento da *Shewanella algae* ambiental em meio de cultura Caldo Nutriente e Bushnell-Haas com glicose, com lactato e isento de fonte de carbono. Inóculo de 1:300, temperatura do experimento de 30° C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 h)



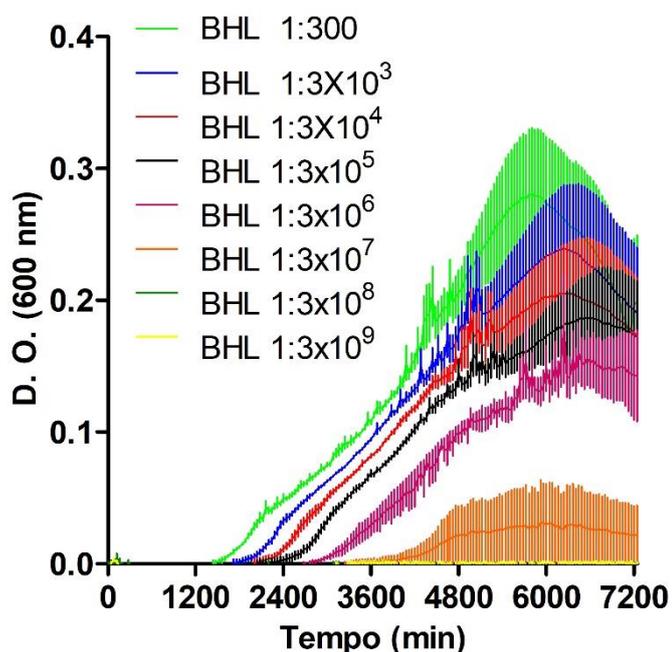
Fonte: O autor, 2022.

O crescimento máximo da *Shewanella algae* ambiental ocorreu em meio Caldo Nutriente e apresentou uma medida média de 0,69 D.O<sub>600</sub> no tempo de 1160 minutos (19 horas e 33 minutos) com uma fase lag de 240 minutos (4 horas). Para o meio Bushneel-Haas com Lactato essa cepa apresentou uma medida máxima de 0,28 D.O<sub>600</sub> o que representa 40% do crescimento máximo (em Caldo Nutriente). Além disso, a fase lag dessa bactéria no meio BHL foi de 1600 minutos (26 horas e 40 minutos).

Nos meios Bushnell-Haas com glicose e Bushnell-Haas a *Shewanella algae* ambiental não apresentou crescimento. Esse resultado é importante, pois caso o aditivo químico iniba o crescimento da cepa, essa observação não poderá ser avaliada perante a condução dos experimentos nesse meio de cultivo. Além do mais, o estudo de Satomi (2014) confirma o resultado obtido mostrando que algumas espécies de *Shewanella* não conseguem metabolizar a glicose como fonte de carbono.

Na Figura 24 são mostrados os resultados para o crescimento da *Shewanella algae* ambiental com diferentes concentrações de inóculos no meio Bushnell-Haas com lactato.

Figura 24- Curva de crescimento da *Shewanella algae* ambiental no meio Bushnell-Haas com Lactato e com proporções de inóculos/meio de 1:300, 1:3.10<sup>3</sup>, 1:3.10<sup>4</sup>, 1:3.10<sup>5</sup>, 1:3.10<sup>6</sup>, 1:3.10<sup>7</sup>, 1:3.10<sup>8</sup> e 1:3.10<sup>9</sup>. Temperatura do experimento de 30° C e tempo de experimento



Fonte: O autor, 2022.

Assim como ocorrido com a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ambiental, as curvas de crescimento apresentam similaridade em sua tendência e são apenas defasadas temporalmente uma em relação à outra. Esse resultado vai de acordo com o esperado pois, a diferenciação entre as

curvas estudadas se encontra apenas nas concentrações (diluições) do inóculo. Sendo assim, como forma de facilitar a montagem do experimento e reduzir o tempo de adaptação da cepa, selecionou-se a proporção de meio/inóculo de 1:300 (v/v) para dar continuidade com os experimentos.

#### **4.3 Etapa 3 – Análise do crescimento dos microrganismos na presença dos aditivos e determinação da concentração de amostra a ser utilizada nos testes.**

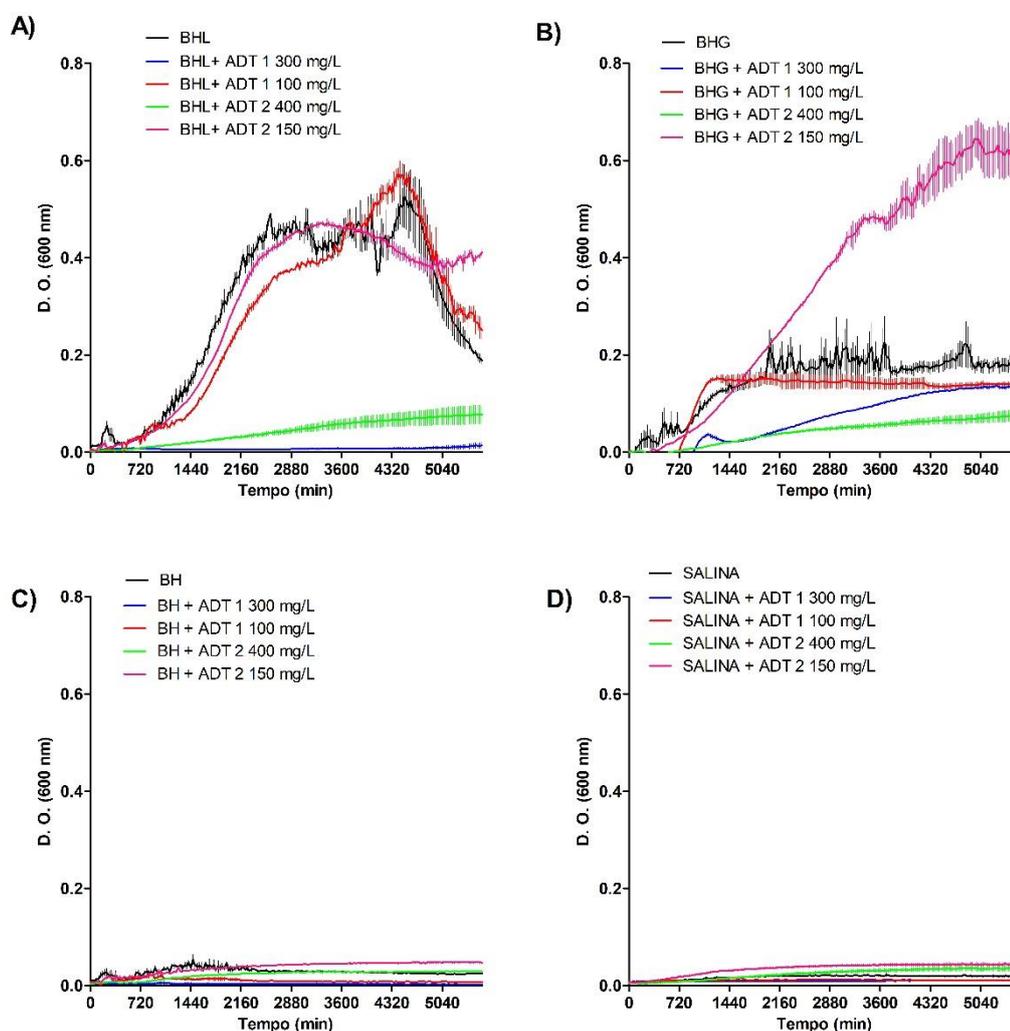
Uma vez que não se tem informações precisas acerca da composição ou concentração das amostras (aditivos), não se sabe se estas poderiam interagir quimicamente com o meio ou se apresentariam efeito biocida ou estimulador do crescimento dos microrganismos. Além disso, não é possível quantificar a concentração de aditivo com base nas concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo de modo a avaliar se seriam suficientes para permitir o crescimento do microrganismo como sugere Sunde et al. (1990). Por isso, foram realizados os testes para analisar o comportamento do microrganismo na presença do aditivo e dos meios de cultivo selecionados.

Como forma de aproximar o experimento da realidade de utilização dos aditivos, as Amostras foram testadas nas concentrações de aplicação em campo fornecidas pela Petrobras e descrita na Tabela 7, ou de acordo com informações do fabricante.

##### **4.3.1 Resultado para o Aditivo 1 e Aditivo 2.**

A Figura 25 evidencia o comportamento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental na presença dos Aditivos 1 e 2 nos meios Bushnell-Haas com lactato, com glicose, Bushnell-Haas isento de fonte de carbono e solução salina 3,5% de NaCl. Para esses aditivos as concentrações de aplicação em campo foram fornecidas e essas foram utilizadas para a condução dos experimentos.

Figura 25- Curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 1 e 2. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 h)



Fonte: O autor, 2022.

Fazendo uma discussão global dos resultados dessa fase, pela interpretação do gráfico A da Figura 25 e da análise estatística realizada (teste TWO-WAY-ANOVA) podemos afirmar que as concentrações de 300 mg/L de Aditivo 1 (ADT1) e de 400 mg/L de Aditivo 2 (ADT2) inibem o crescimento da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em meio Bushnell-Haas com lactato.

No entanto, em concentrações menores de Aditivos 1 e 2 (100 mg/L e 150 mg/L respectivamente) as curvas de cinética de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa ambiental* não apresentam diferença estatísticas em relação ao controle do experimento (curva de crescimento Bushnell-Haas com Lactato), de acordo com o teste TWO-WAY ANOVA com 95% de confiabilidade.

Os resultados do crescimento com a *P. aeruginosa ambiental* com os Aditivos 1 e 2 e meio Bushnell-Haas com glicose estão representados no gráfico B da Figura 25. Assim como nos testes com Bushnell-Haas com Lactato, a concentração de ADT2 de 400 mg/L inibiu o crescimento da cepa de *Pseudomonas aeruginosa ambiental* em meio Bushnell-Haas com Glicose. A condição que representa o ADT2 na concentração de 300 mg/L aumentou a fase de adaptação do microrganismo, porém, ao final do experimento, essa condição e a condição controle (Bushnell-Haas com Glicose- BHG) são estatisticamente iguais de acordo com o teste ANOVA.

A condição de crescimento dessa bactéria com Aditivo 1 na concentração de 100 mg/L apresenta comportamento similar ao controle positivo, curva BHG. Após o teste estatístico ANOVA confirmou-se que essas curvas de crescimento são estatisticamente iguais e mostra que a condição não influenciou no crescimento do microrganismo.

O Aditivo 1 apresenta majoritariamente etilenoglicol em sua composição e alguns trabalhos na literatura estudaram a biodegradabilidade de glicóis. Haines e Alexander (1975) conseguiram isolar de amostras de solo uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* capaz de degradar mono-, di-, tri-, tetraetileno glicol e polietileno glicóis com pesos moleculares de até 20.000 u . Bernhard et al. (2008) estudaram a capacidade de microrganismos marinhos biodegradar polietileno glicóis e concluiu que moléculas com pesos moleculares de até 7400 u são totalmente biodegradáveis enquanto moléculas com pesos moleculares maiores são apenas parcialmente biodegradáveis e são persistentes aos ataques microbianos. Além disso, o estudo mostrou que nas condições marinhas ocorre o aumento da fase de adaptação e a diminuição do nível de biodegradação com o aumento do peso molecular. Obradors e Aguilar (2015) mostraram que uma cultura pura de *Pseudomonas stutzeri*, isolada de água de rio, degradou totalmente amostras de polietileno

glicóis. Todos esses estudos corroboram a hipótese que em determinadas condições, moléculas de glicerol podem ser metabolizadas por microrganismos, especialmente da espécie das *Pseudomonas*.

Resultados interessantes ocorrem com a curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa ambiental* em meio Bushnell-Haas com glicose e Aditivo 2 na concentração de 150 mg/L. O gráfico e o teste estático Two-Way-Anova com 95% de confiabilidade mostra claramente que essa concentração de aditivo estimula o crescimento da cepa do microrganismo a partir de 2370 minutos. A condição testada alcança 285% do crescimento máximo ocorrido no controle positivo do experimento (curva BHG). Esse resultado destaca-se pela baixa concentração de aditivo desencadear uma alta estimulação do crescimento bacteriológico.

Ao encontro do observado, Wang e Zhuge (2014) concluíram que polímeros de alto peso molecular foram efetivamente degradados por bactérias e a taxa de biodegradação foi relacionada inversamente ao peso molecular do composto e à concentração do mesmo na solução. Além disso, Jeirani et al. (2014b) mostra que a goma de xantana, um biopolímero frequentemente utilizado na EOR é bastante suscetível a biodegradação. Sendo assim, compostos poliméricos empregados na extração de petróleo podem promover ou estimular o crescimento de microrganismos, como observado nesse resultado envolvendo a ADT2.

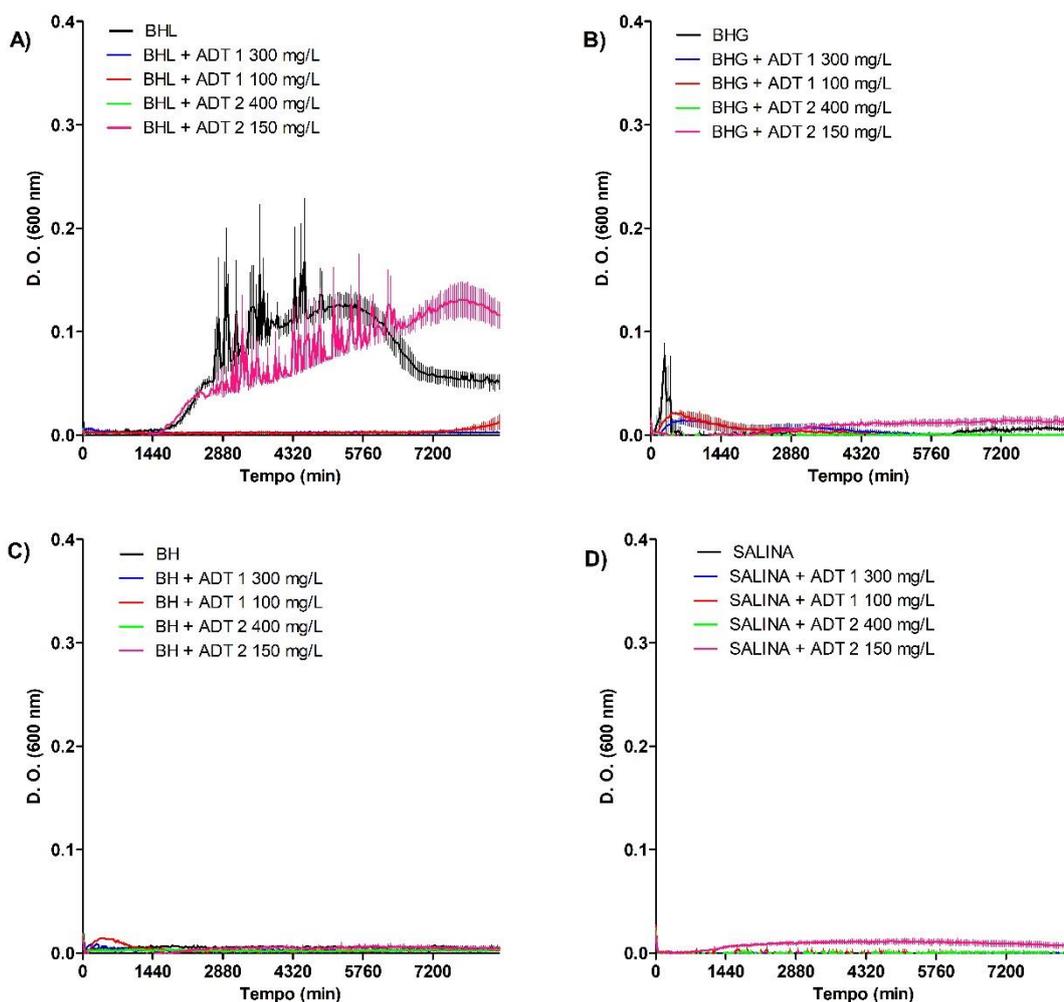
As curvas de crescimento da cepa ambiental em meio Bushnell-Haas isento de fonte de carbono e solução salina com e sem Aditivos 1 e 2 (Figura 25 C e D, respectivamente), são constantes e próximas de zero ao longo do experimento. Esse comportamento não caracteriza uma curva de crescimento microbiológico e podemos afirmar que apenas a essas condições, com ADT1 e ADT2 na sua composição, não são capazes de sustentar o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa ambiental*.

Com base nesses resultados, selecionou-se o meio Bushnell-Haas com Glicose e 100 mg/L de Aditivo 1 ou 150 mg/L de Aditivo 2 para realizar os experimentos em que os aditivos serão testados como fonte de nutrientes.

O comportamento da *Shewanella algae ambiental* na presença de Aditivos 1 e 2 nos meios Bushnell-Haas com lactato, com glicose, Bushnell-

Haas isento de fonte de carbono e solução salina 3,5% de NaCl é ilustrado na Figura 26.

Figura 26- Curva de crescimento da *Shewanella algae* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 1 e 2. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 8560 minutos (142 h).



Fonte: O autor, 2022.

Após análise dos gráficos A, B, C e D da Figura 26, constata-se que as medidas de D.O.<sub>600</sub> das condições que houve adição de Aditivo 1, se mantiveram constantes e próximas de zero ao longo de todo experimento. O aditivo estudado inibiu o crescimento da *Shewanella algae* ambiental mesmo

em meio rico em nutrientes. Ressalta-se ainda que a inibição da cepa pelo ADT1 ocorreu também em meio BHL, meio de cultivo em que o microrganismo apresentou crescimento celular positivo. Esse resultado chama atenção para uma possível ação biocida da substância para a cepa analisada. Diante desse fato, os estudos com a Aditivo 1 e a *S. algae* foram interrompidos nessa etapa. Pois, uma mistura com elevada toxicidade para o microrganismo, não será utilizada como fonte de nutriente pelo mesmo.

As curvas de crescimento em que a Aditivo 2 foi adicionada ao meio Bushnell-Haas apresentam duas tendências bastante distintas. A concentração de 400 mg/L de ADT2 também inibiu o crescimento da *Shewanella algae* ambiental. Porém a concentração de 150 mg/L desse aditivo estimulou o crescimento da cepa em meio BHL (gráfico A, Figura 26). Durante os 6880 minutos iniciais do teste, a curva de controle de crescimento positivo (curva preta -BHL) e a curva da condição BHL+ ADT2 com 150 mg/L não apresentam diferenciação estatística com um nível de confiança de 95% de acordo com o teste Two-Way-Anova. Após esse período, a condição com o Aditivo 2 conseguiu estimular e prolongar o crescimento da cepa. Com isso, definiu a concentração de 150 mg/L de ADT2 para dar continuidade aos experimentos.

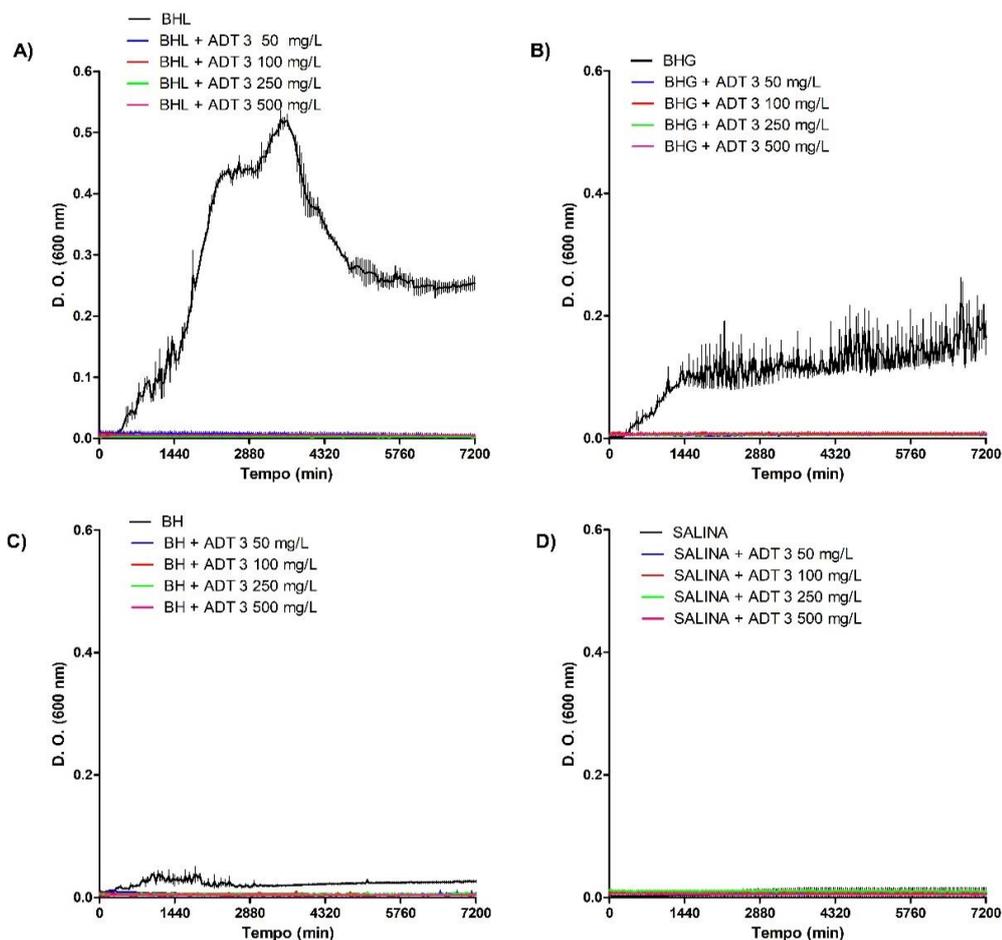
O gráfico B da Figura 26 ilustra o comportamento da *S. algae* ambiental no meio BHG. Coerentemente com o resultado obtido na seleção dos meios de crescimento, a curva BHG, se manteve constante e próxima de zero ao longo do experimento, não caracterizando crescimento do microrganismo. Além disso, a adição de Aditivos 1 e 2 ao meio não estimulou a cepa. Resultado que reafirma que para a condução dos experimentos com a *Shewanella algae* ambiental é essencial a utilização do meio suplementado com Lactato.

Além do mais, conforme os dados apresentados na Figura 26 C e D, conclui-se que não houve crescimento da cepa de *Shewanella algae* ambiental na presença de BH e solução salina de 3,5% de NaCl e ADT1 ou ADT2. Ao longo de todo o experimento as medidas da D.O<sub>600</sub> se manteve constante e próxima de zero. As composições desses meios foram insuficientes para promover o crescimento microbiológico.

### 4.3.2 Resultado para o Aditivo 3.

Como já mencionado na metodologia, não se sabe a concentração de aplicação do Aditivo 3 em campo. Sendo assim, utilizou uma faixa de possíveis concentrações para avaliar a toxicidade da amostra perante os microrganismos. Os gráficos da expõe Figura 26 o resultado da toxicidade do ADT3 frente a *P. aeruginosa*.

Figura 27- Curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 3. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 h)



Fonte: O autor, 2022.

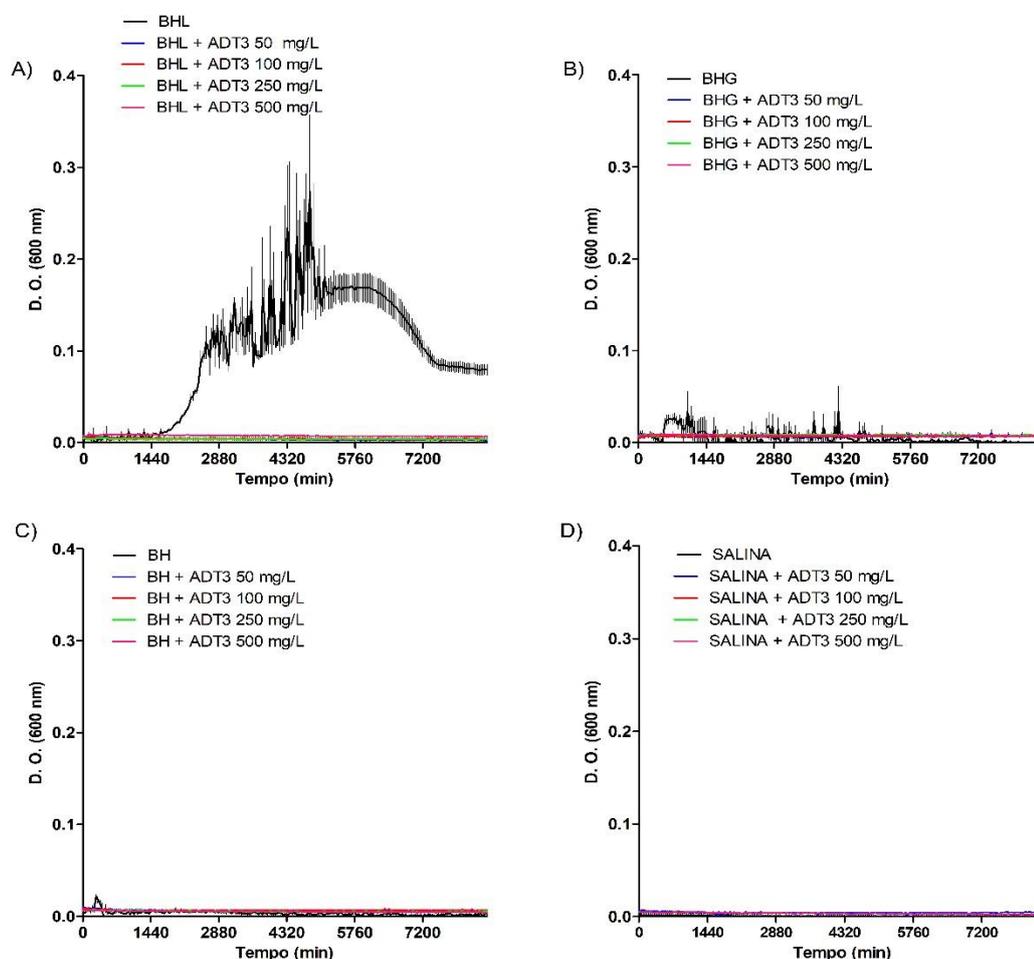
A partir da análise dos gráficos da Figura 27, conclui-se que o ADT3 inibiu o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em todos os meios e concentrações analisadas. Em todos os experimentos, gráficos A, B C e D, as condições de crescimento que contêm o Aditivo 3 na formulação obtiveram D.O<sub>600</sub> constantes e próximas de zero ao longo do experimento o que indica ausência de multiplicação celular.

É importante ressaltar que a cepa estudada apresentou cinética de crescimento nos controles positivos (meios BHL e BHG – gráficos A e B). Portanto, a ausência de crescimento bacteriológico nas demais condições se deve apenas à toxicidade do aditivo.

A única fonte de carbono presente na composição dos meios de cultivo dos resultados apresentados no gráfico C e D da Figura 27 é a o Aditivo 3. Conforme esperado, não houve crescimento celular na condição em que não há adição de ADT3, pois não há a presença de fonte de carbono em sua composição. E, coerentemente com resultado obtidos nos meios contendo lactato de sódio ou glicose (gráficos A e B) o ADT3 não foi utilizado como fonte de carbono em nenhuma concentração testada.

Os resultados obtidos do crescimento da *Shewanella algae* ambiental, nos meios de cultivo contendo o Aditivo 3 foram semelhantes aos alcançados com a *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. Esses resultados estão expostos na Figura 28.

Figura 28- Curva de crescimento da *Shewanella Algae* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 3. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell- Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 8640 minutos (360 h)



Fonte: O autor, 2022.

Observa-se que o Aditivo 3 atuou como biocida, em todas as concentrações analisadas, para a *S. algae* ambiental. Em todas as variações de meio de cultivo, gráficos A, B C e D, as condições de crescimento que contêm ADT3 na formulação, apresentaram D.O<sub>600</sub> constantes e próximas de zero ao longo do experimento o que indica ausência de crescimento bacteriológico.

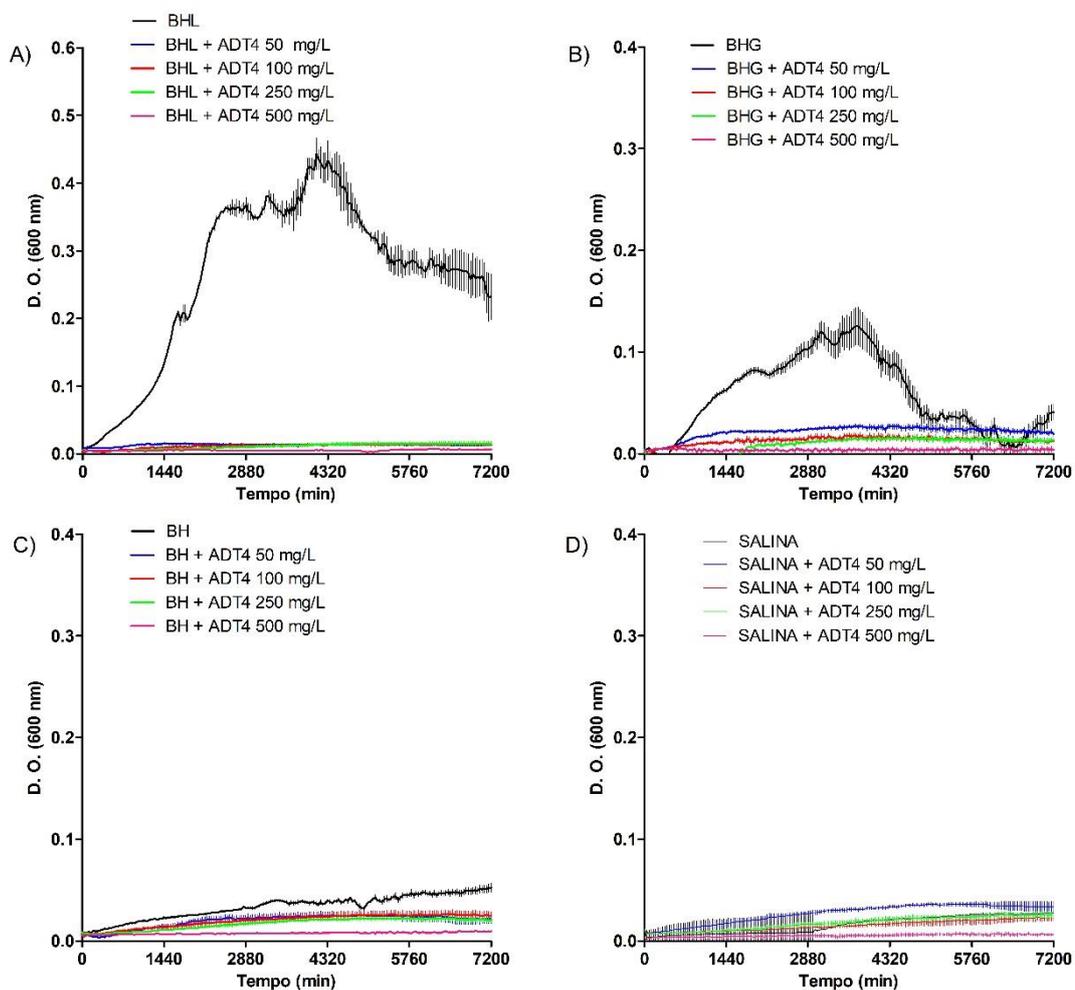
Como O Aditivo 3 inibiu o crescimento de ambas as cepas estudadas, os estudos com esse aditivo foram interrompidos nessa etapa. Pois, uma mistura com elevada toxicidade para as cepas, não será utilizada como fonte de nutriente pela mesma.

Vale ressaltar que para o processo de produção de petróleo, um aditivo inibidor de incrustações que apresenta uma toxicidade para as cepas é bastante vantajoso, uma vez que, esta substância pode ajudar a controlar outros inconvenientes como o crescimento microbiológico e consequentemente a formação de biofilmes e aceleração da taxa de corrosão.

#### 4.3.3 Resultado para o Aditivo 4.

A Figura 29 evidencia o comportamento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental na presença do Aditivo 4 nos meios Bushnell-Haas com lactato, com glicose, Bushnell-Haas isento de fonte de carbono e solução salina 3,5% de NaCl. Como a concentração exata de aplicação não foi informada, realizou-se o teste para avaliar o comportamento tóxico do aditivo com quatro concentrações diferentes. Dessa forma, os resultados mostram a influência desde baixas a altas concentrações de Aditivo 4.

Figura 29- Curva de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 4. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:30 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 7200 minutos (120 horas)



Fonte: O autor, 2022.

Conforme a análise dos gráficos da Figura 29, observa-se que o Aditivo 4 inibiu o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em todos os meios e concentrações analisadas. Assim como o aditivo anterior (Aditivo 3) em todos os experimentos, gráficos A, B C e D, as condições de crescimento que contêm ADT4 na formulação obtiveram D.O<sub>600</sub> constantes e próximas de zero ao longo do experimento o que implica ausência de crescimento microbiológico.

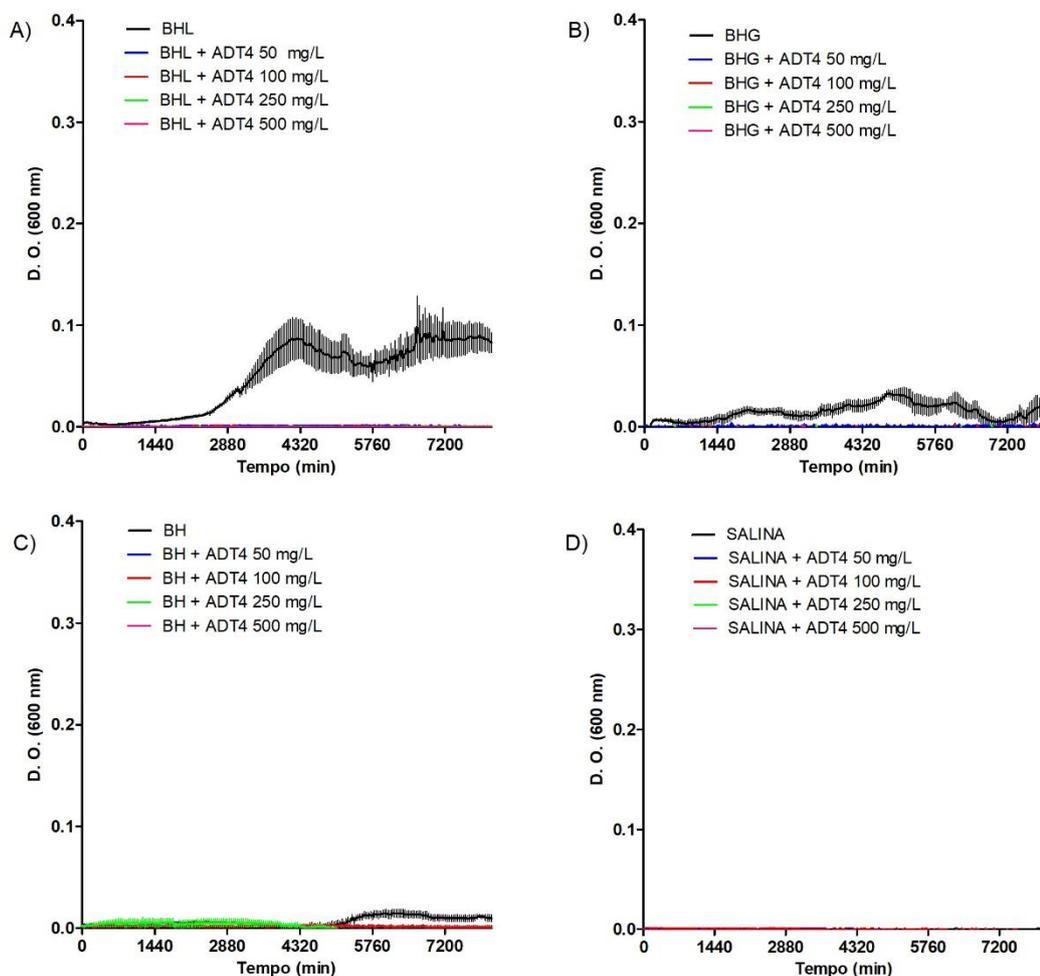
O crescimento celular ocorreu apenas nos controles positivos dos gráficos A e B (curvas BHL e BHG respectivamente). Nessas condições, não há adição do aditivo, o que nos leva a constatar que a inibição do crescimento nas demais curvas realmente se deve ao aditivo analisado. Sendo assim, podemos afirmar que para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ambiental o Aditivo 4 é tóxico.

Nos controles positivos dos gráficos C e D da Figura 29, curvas BH e SALINA, não houve crescimento celular, pois nessas condições não há fontes de carbono em suas composições. Para as demais condições dos gráficos C e D, a adição de ADT4 representa a adição de uma fonte de carbono e a ausência de crescimento celular nesses experimentos revela que o aditivo não pode ser utilizado como fonte de carbono. Esse resultado é compreensível, uma vez que o aditivo apresenta um efeito tóxico para a cepa mesmo quando em presença de um meio de cultivo rico em nutrientes.

O estudo de Fox e Mendz (2006) mostra que os genes que codificam as enzimas responsáveis pela biodegradação dos fosfonatos foram identificados em vários microrganismos incluindo a *Pseudomonas* spp. Porém no presente trabalho, a amostra contendo o fosfonato DTPMP (Aditivo 4) inibiu o crescimento dessa cepa. Como fosfonatos é uma classe química com uma extensa variedade de substâncias e conseqüentemente moléculas diferentes, o que inclui números de grupos fosfônicos diferentes e geometrias moleculares distintas, infere-se que as características individuais de cada substância interfiram na metabolização pelo microrganismo, mesmo havendo a capacidade de produção das enzimas responsáveis pela catálise pela cepa estuda.

Os resultados obtidos do crescimento da *Shewanella algae* ambiental, nos meios de cultivo contendo o Aditivo 4 estão expostos na Figura 30.

Figura 30- Curva de crescimento da *Shewanella Algae* ambiental em meios diferentes composições de meios de cultivo contendo Aditivo 4. A) Meio Bushnell-Haas com Lactato; B) Meio Bushnell-Haas com Glicose; C) Meio Bushnell-Haas e D) Solução salina 3,5% NaCl. Inóculo de 1:300 (v/v) inoculo/meio. Temperatura do experimento de 30°C e tempo de experimento de 8120 minutos (135 horas).



Fonte: O autor, 2022.

Observa-se que os resultados do crescimento da *Shewanella algae* ambiental, nos meios de cultivo contendo o Aditivo 4 apresentaram similaridade com os resultados apresentados para a cepa da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. Sendo assim, as mesmas ponderações feitas acima são válidas nesse contexto.

Em todas as variações de meio de cultivo, gráficos A, B C e D, as condições de crescimento que contêm ADT4 na formulação, apresentaram

D.O<sub>600</sub> constantes e próximas de zero ao longo do experimento o que indica ausência de crescimento bacteriológico.

Conclui-se então que o Aditivo 4 também atuou como biocida, em todas as concentrações analisadas, para a *Shewanella algae* ambiental.

Em seu trabalho, Nowack (2003) evidencia que apesar de algumas classes de fosfonatos serem susceptíveis à biodegradação, estudos mostram a dificuldade de encontrar cepas capazes de metabolizar o DTPMP, assim como encontrado nesse trabalho. O autor afirma que devido à sua semelhança estrutural com os ésteres de fosfato, os fosfonatos geralmente atuam como inibidores de enzimas devido, em parte, à alta estabilidade da ligação C-P.

Rott, Steinmetz e Metzger (2018) mostraram em seu estudo que os fosfonatos são bem estáveis quanto à degradação biológica. Os autores ainda mostram, que normalmente a utilização dessas substâncias ocorre em paralelo à liberação de fosfato por mecanismos de degradação abióticos, em particular, fotólise catalisada por metal. Assim, microrganismos desprovidos de enzimas capazes de clivar ligações C-P podem utilizar fosfato formado abioticamente e, assim, assimilar indiretamente fosfonatos e seus produtos de degradação.

Além do mais, os fosfonatos, como o DTPMP, são produtos químicos industriais e não são formados naturalmente. Do ponto de vista histórico da Terra, os microrganismos foram confrontados com esses compostos apenas por um tempo muito curto e, portanto, o repertório enzimático para degradar eficientemente essas substâncias está amplamente ausente (ROTT; STEINMETZ; METZGER, 2018).

Como o Aditivo 4 inibiu o crescimento de ambas as cepas estudadas, os estudos com esse aditivo foram interrompidos nessa etapa. Pois, uma mistura com elevada toxicidade para as cepas, não será utilizada como fonte de nutriente pela mesma.

#### **4.4 Etapa 4 - Utilização dos aditivos como fonte de nutrientes.**

Como forma de facilitar a compreensão do leitor a Tabela 14 ilustra um resumo dos resultados dos experimentos da Etapa 4. Nos tópicos seguintes

serão apresentados, na forma gráfica, os dados experimentais e a discussão dos resultados. Vale enfatizar, conforme mostrado nos resultados do tópico anterior, que a concentração dos aditivos utilizadas nessa etapa foram: Aditivo 1 a 100 mg/L; Aditivo 2 a 150 mg/L, e; os Aditivos 3 e 4 não foram processados nessa etapa

Tabela 14- Resumo dos resultados de todos os experimentos em que os aditivos foram testados como fonte de C, P e N, isoladamente e em combinação.

		MEIO - C + ADT	MEIO - P + ADT	MEIO - N + ADT	MEIO - NP + ADT	MEIO - NC + ADT	MEIO - PC + ADT	MEIO - NPC + ADT
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>Aditivo 1</b>	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Aditivo 2</b>	-	+	-	-	-	-	-
	<b>Aditivo 3</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	<b>Aditivo 4</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b><i>Shewanella algae</i></b>	<b>Aditivo 1</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	<b>Aditivo 2</b>	-	+	-	-	+	-	-
	<b>Aditivo 3</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	<b>Aditivo 4</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

(+) a cepa utilizou o aditivo como fonte de nutriente; (-) a cepa não utilizou o aditivo como fonte de nutriente; N/A – não se aplica, pois o teste não foi conduzido pois a amostra se mostrou tóxica à cepa.

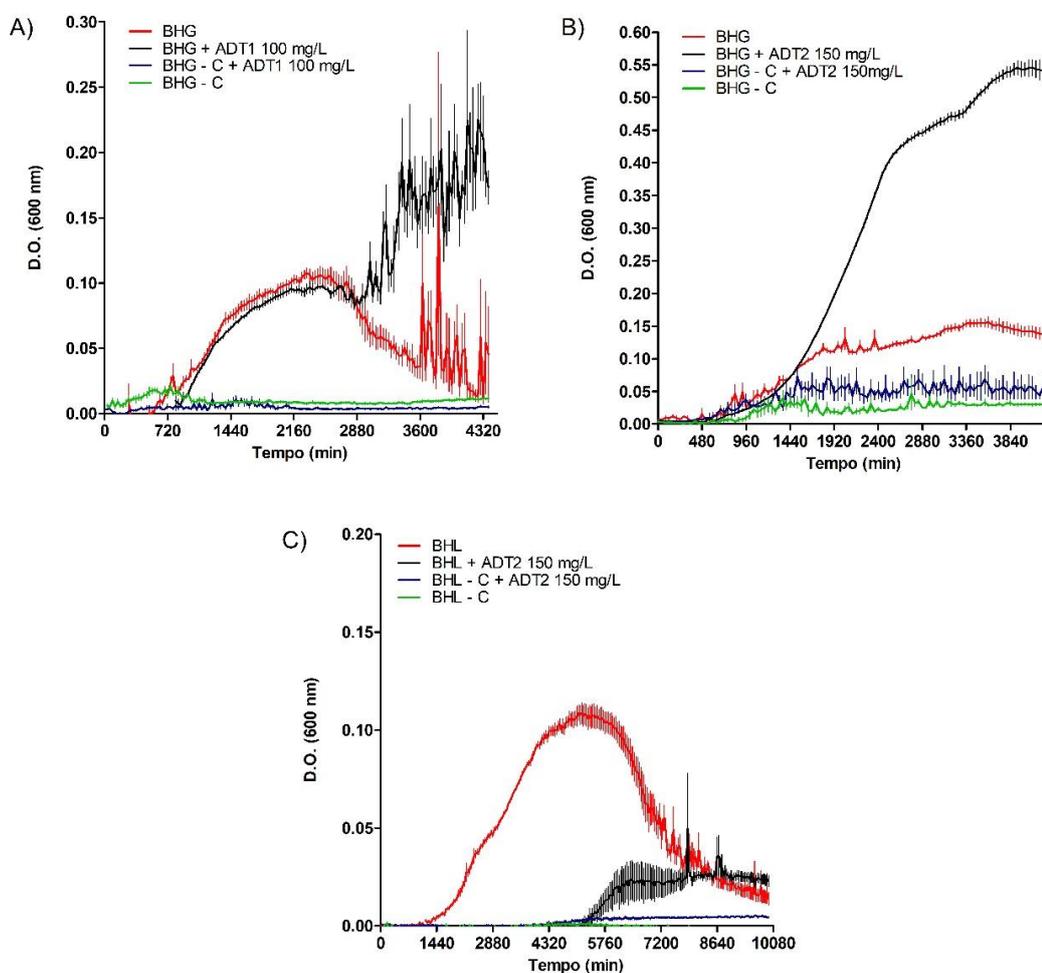
Fonte: O autor, 2022.

#### 4.4.1 Aditivos como fonte de Carbono

O gráfico da

Figura 31 mostra o resultado do teste em que os microrganismos foram colocados em meios formulados para testar a utilização dos aditivos como fonte de carbono.

Figura 31- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de carbono. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

No gráfico A da Figura 31 é exposto o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa ambiental* na presença do Aditivo 1. Podemos constatar que a partir de 3270 minutos (54 horas e 30 minutos) as curvas do controle positivo do experimento (BHG e BHG + ADT1) apresentaram diferenciação estatística conforme o teste Two-Way-Anova. O resultado mostra que os componentes do aditivo podem promover o crescimento do microrganismo em determinadas condições.

Esse comportamento apresentado pela cepa da *Pseudomonas aeruginosa* na presença do Aditivo 1 e do meio Bushnell-Haas com glicose completo, parece sugerir a ocorrência de um fenômeno bioquimicamente conhecido como Repressão Catabólica.

De acordo com Madigan et al. (2016), o fenômeno trata da possibilidade de células microbianas crescerem às expensas de várias fontes de carbono. Células de *Escherichia coli* utilizam variados açúcares, preferencialmente utilizando inicialmente a glicose, quando presente no meio. Isso porque as células microbianas normalmente têm as enzimas necessárias para metabolizar esse açúcar, não sendo necessário induzir a síntese de outras enzimas para outras fontes. Isso explica o motivo pelo qual células microbianas multiplicam-se rapidamente utilizando glicose, em comparação com qualquer outra fonte de carbono. Dessa forma, um mecanismo de repressão do uso de outras fontes de carbono parece atuar quando há duas fontes, permitindo o uso da glicose enquanto ela estiver presente no meio.

Assim, observa-se o crescimento microbiano com duas fases exponenciais, mediadas por uma nova fase lag que envolve a adaptação para síntese de enzimas que permitirão o uso da segunda fase, após o esgotamento da glicose. Isso parece ser exatamente o que aconteceu nos ensaios de substituição dos componentes do meio BHG por etilenoglicol e aminoetanol. Nesse caso, a *Pseudomonas aeruginosa* parece ter utilizado a glicose do meio BHG e, ao término da utilização dessa fonte nutricional, passou por uma nova fase lag e produziu as enzimas necessárias à metabolização do etilenoglicol (crescimento diáuxico).

No entanto, em ausência de glicose e presença do etilenoglicol como única fonte nutricional, não houve estímulo à produção de enzimas para a biodegradação do etilenoglicol. Talvez, após procedimentos de adaptação das

células a concentrações crescentes de etilenoglicol como única fonte de carbono, as células sejam capazes de utilizar o etilenoglicol. Assim, o que vemos na

Figura 31-A, nas composições sem glicose, mas com adição da Aditivo 1 seja apenas uma longa fase lag, que após adaptação adequada, possa levar à multiplicação celular e biodegradação deste aditivo.

No entanto, analisando as curvas de crescimento da *P. aeruginosa* ambiental nos meios Bushnell-Haas sem fonte de Carbono com e sem ADT1 (curvas BHG – C + ADT1 e BHG –C, linha azul e verde respectivamente) constatamos que as medidas de D.O<sub>600</sub> permaneceram constantes e próximas de zero ao longo do experimento. Logo esse microrganismo não é capaz de utilizar o Aditivo 1 como única fonte de carbono. Esse resultado contrasta com o obtido por Cui et al. (2017b) que demonstraram que uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de produzir biossurfactante com glicerol como única fonte de carbono. Porém, Mouafo Tamnou et al. (2021) observaram o aumento da biodegradação de fragmentos de polietileno com o aumento do período e temperatura de incubação. Os autores ainda relatam que esse processo é fortemente influenciado por outras condições ambientais como o pH. Veethahavya et al. (2016) relataram em seu trabalho que a biodegradação de polietilenos de baixa peso molecular por culturas mistas de bactérias (contendo espécies de *Pseudomonas*) é acelerada pela presença de polímeros naturais como o amido. Resultado que pode indicar que a presença de uma fonte de carbono alternativa seja realmente necessária para a biodegradação desse composto.

Sendo assim, esses diferentes resultados podem ser explicados por diferenças na concentração das substâncias utilizadas, pelo aditivo ter outras substâncias em sua composição, por fatores físico-químicos diferentes ou simplesmente pela necessidade de uma fonte nutricional complementar.

Assim, como nos testes anteriores, o Aditivo 2 estimulou o crescimento da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ambiental (

Figura 31 B). A condição que representa o meio Bushnell-Haas com glicose e Aditivo 2 (curva em preto) alcançou um valor de D.O<sub>600</sub> 326% maior em que a condição controle de crescimento positivo (curva Bushnell-Haas com glicose - curva em vermelho). Porém, a condição em que o aditivo é testado

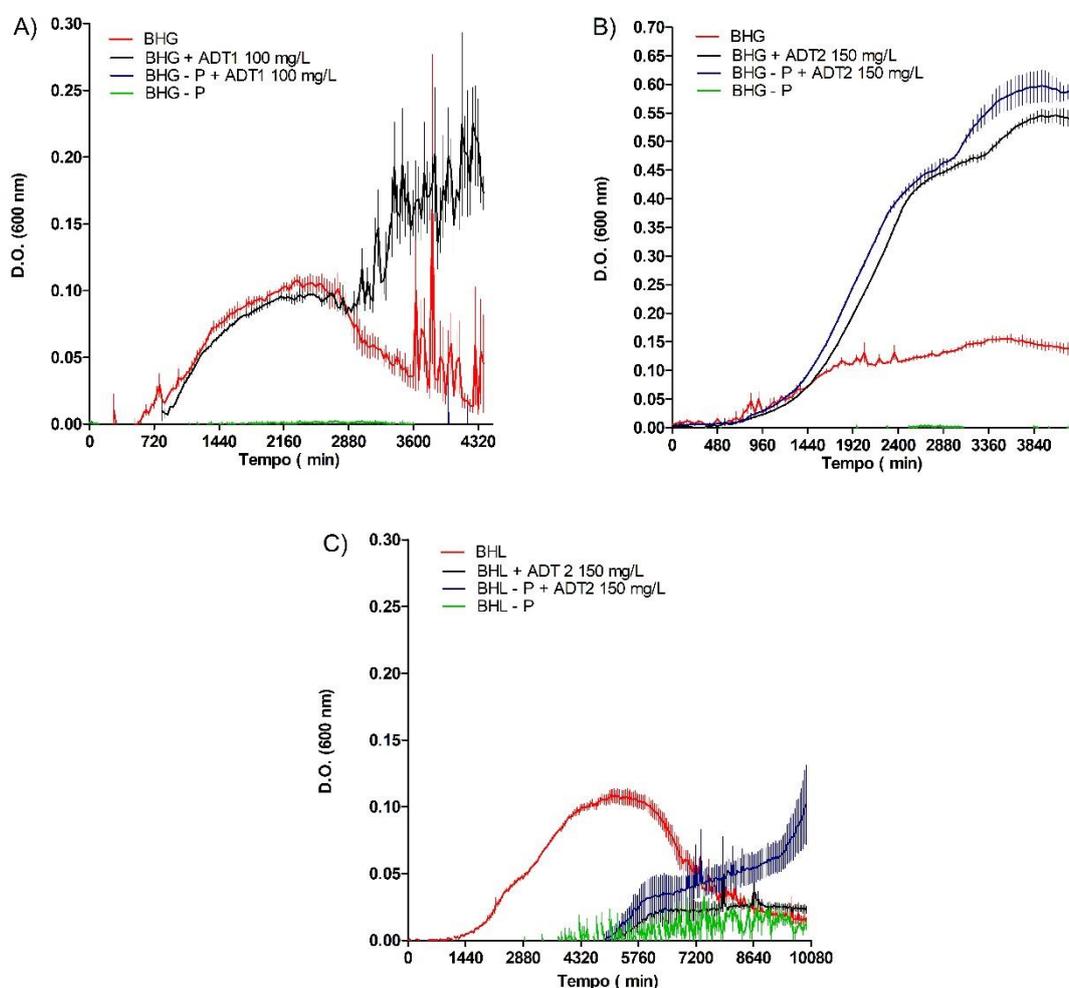
como fonte de carbono (curva BHG-C + ADT2) não apresentou crescimento microbiológico e estatisticamente não apresenta diferenciação em relação a curva de controle negativo (curva BHG- C). Dessa forma, a cepa não utilizou a amostra como fonte de carbono.

O resultado obtido com a cepa da *Shewanella algae* ambiental é ilustrado no gráfico C. Observa-se que a curva de crescimento BHG-C + ADT2 apresentou medidas de D.O<sub>600</sub> constante e próxima de zero ao longo do experimento. Esse comportamento mostra que a *Shewanella algae* não utilizou esse aditivo como fonte de carbono.

#### 4.4.2 Aditivos como fonte de Fósforo

Os gráficos da Figura 32 ilustram os resultados dos experimentos que testaram os aditivos como fonte de fósforo.

Figura 32- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de fósforo. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

Analisando as curvas de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em que os componentes do meio Bushnell-Haas com Glicose que contém fósforo foram substituído por alíquota do Aditivo 1, constatamos que a medida de D.O.<sub>600</sub> se manteve constante e próxima de zero ao longo do experimento, mostrando que não houve crescimento da cepa e consequentemente o microrganismo não foi capaz de metabolizar o aditivo e utilizá-lo como fonte de fósforo (Figura 32 A).

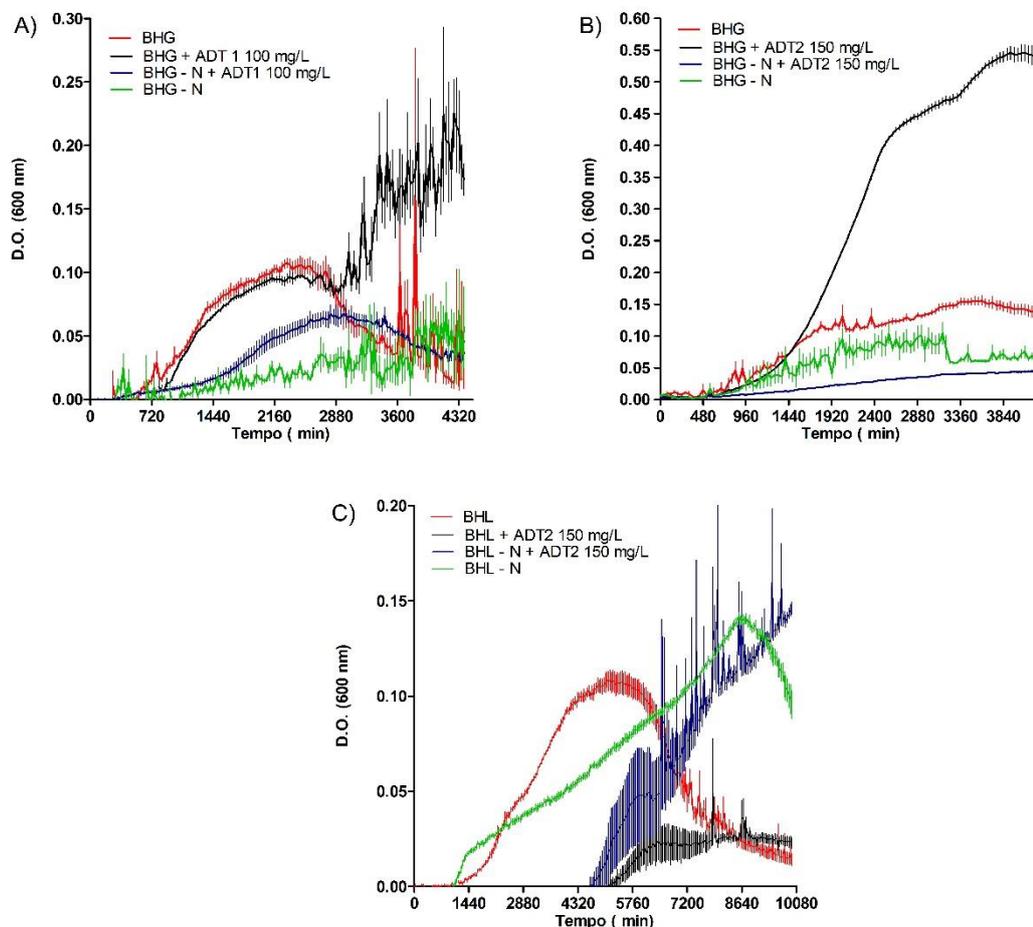
Contudo, quando observamos o gráfico B, podemos afirmar que as condições em que o Aditivo 2 foi adicionada meios (curva BHG-P + ADT2 e curva BHG +AMT2) apresentaram crescimento microbiológico superiores a quaisquer outras condições testadas. Ademais, o crescimento da cepa nas curvas contendo o Aditivo 2 foi similar nas duas condições e o teste estatístico Two-Way-Anova apresenta diferenciação apenas no intervalo de 3280 a 3600 min. Ao final do experimento as curvas se igualam novamente. Fato, que além de, reafirmar a estimulação do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental por esse aditivo mostra que esse pode ser utilizado como fonte de fósforo.

A curva de crescimento em que a *Shewanella algae* ambiental utilizou o Aditivo 2 como fonte de fósforo é exibida no gráfico C da Figura 32. Constatou-se que a fase de adaptação da cepa na curva BHL-P + ADT2 é maior do que a ocorrida na condição Bushnell- Haas com Lactato. A fase lag terminou aos 4960 minutos (82 horas e 40 minutos) de experimento. No entanto, a cepa foi capaz de utilizar a composição do meio de cultivo e do Aditivo 2 para seu crescimento e ao final do experimento esta condição alcançou 93% do crescimento máximo no controle positivo, curva Bushnell-Haas com Lactato. Como a única fonte de fósforo presente nessa condição é proveniente do aditivo, conclui-se que a o microrganismo foi capaz de utilizar o Aditivo 2 como fonte de fósforo.

#### 4.4.3 Aditivos como fonte de Nitrogênio

Os resultados do teste da utilização dos Aditivos 1 e 2 como fonte de nitrogênio são apresentados na Figura 33.

Figura 33- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

No gráfico A da Figura 33 está exposto o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental na presença do Aditivo 1. Ao analisar a curva de

crescimento em que a fonte de nitrogênio do meio BHG foi substituída pelo aditivo podemos verificar que após 1440 minutos a curva apresenta característica de uma curva de crescimento de um microrganismo. No entanto, após a análise dos dados, verificou-se que estatisticamente os dados dessa condição experimental são idênticos aos dados do controle negativo (curva BHG – N) e não podemos afirmar que o microrganismo utilizou o ADT1 como fonte de nutriente. Com base nesse resultado, as análises químicas da composição dos meios nessas condições serão fundamentais para conclusões mais assertivas e serão apresentadas na próxima sessão.

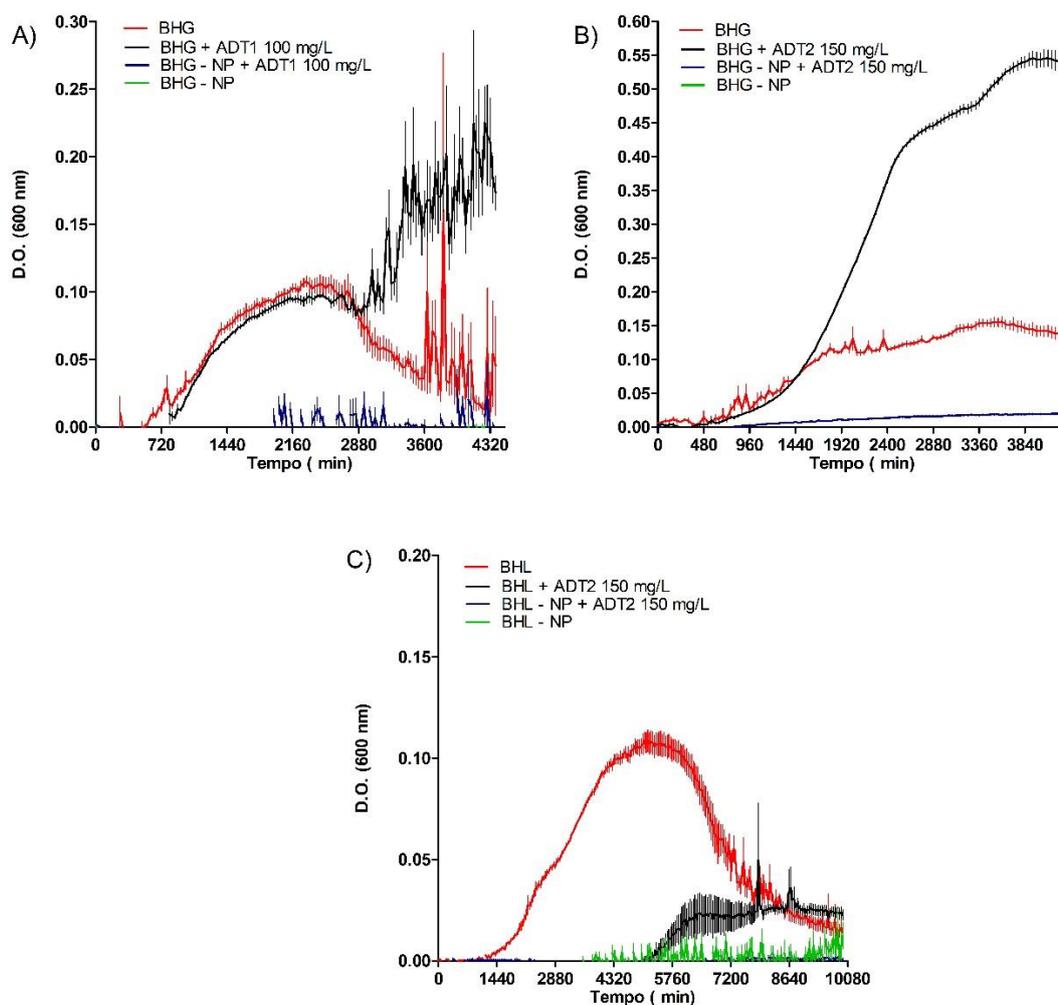
A Figura 33 B ilustra a utilização do Aditivo 2 como fonte de nitrogênio pela *P. aeruginosa* ambiental. A curva de crescimento da condição BHG-N + ADT2 apresentou variação insignificativa ao longo do experimento. Além do mais, as medidas de D.O<sub>600</sub> desta condição ficaram menores que o controle negativo, possivelmente, por uma formação de bolhas ou grumos nas réplicas do controle negativo. Sendo assim, a cepa não utilizou o ADT2 como fonte de nitrogênio.

No gráfico C da mesma figura está representado a curva de crescimento da *Shewanella algae* ambiental na condição em que a fonte de nitrogênio do meio foi substituída pelo Aditivo 2. Curiosamente a cepa apresentou crescimento nos meios sem fonte de nitrogênio e no meio em que a fonte de nitrogênio foi substituída pela amostra. Fato que chamou atenção, uma vez que, nitrogênio é um elemento essencial para a multiplicação celular. O experimento foi repetido por quatro vezes e em todos os ensaios o resultado obtido foi o mesmo. Como forma de averiguar o ocorrido, foi realizado um repique dessas condições para tubos contendo 10 mL de Caldo Nutriente e incubado a 30° C. O procedimento foi realizado em triplicatas. Após 48 horas, verificou-se a ausência de crescimento celular no experimento. Sendo assim, fica claro que o aumento das medidas de D.O<sub>600</sub> ao longo do experimento foi devido à formação de alguma deposição na condição estudada e não ao crescimento celular. No entanto, as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram realizadas e os resultados serão apresentados no item 4.5.2.2.

#### 4.4.4 Aditivos como fonte de Nitrogênio e Fósforo

Os gráficos da Figura 34 ilustram os resultados dos experimentos que testaram as amostras como fonte simultânea de nitrogênio e fósforo.

Figura 34- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio e fósforo simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

Os resultados dos experimentos que testaram o Aditivo 1 como fonte de nitrogênio e fósforo simultaneamente pela *P. aeruginosa* ambiental é representado na Figura 34 A. Como mencionado anteriormente, os testes indicaram que esse aditivo não foi utilizado como fonte individual de fósforo e possivelmente também não foi utilizado como fonte individual de nitrogênio pela *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. E coerentemente com esses resultados, o ADT1 não foi utilizado como fonte de nitrogênio e fósforo simultaneamente. As medidas das D.O<sub>600</sub> nos testes com o meio Bushnell-Haas com glicose em que as fontes de nitrogênio e fósforo foram substituídas pelo aditivo foram constantes e próximas de zero ao longo do experimento não caracterizando uma curva de crescimento.

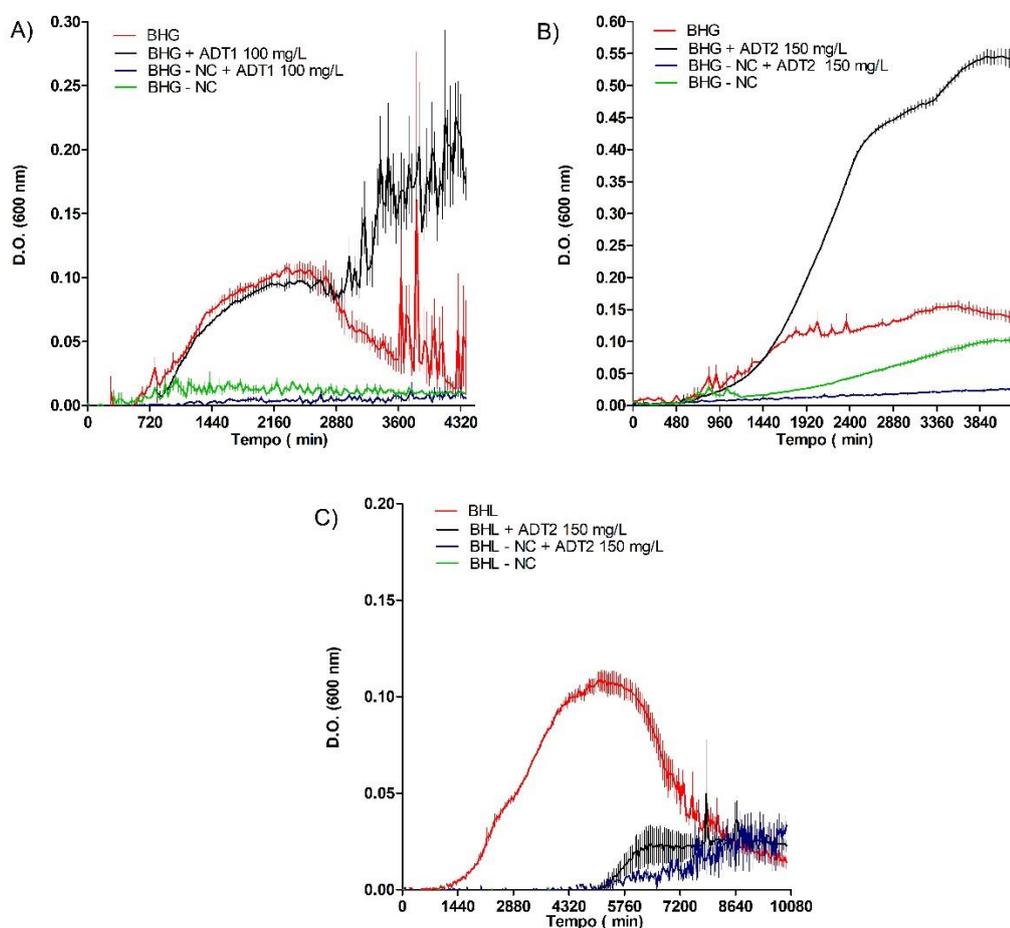
Pela análise dos dados apresentados na Figura 34 B, conclui-se que a *Pseudomonas aeruginosa* ambiental não utilizou o Aditivo 2 como fonte de fósforo e nitrogênio simultaneamente. Assim como com o ADT1, as medidas de D.O<sub>600</sub> ao longo do experimento foi constante e próxima de zero o que não caracteriza uma curva de crescimento microbiológico. Além disso, os testes anteriores mostraram que a cepa foi capaz de utilizar o aditivo apenas como fonte de fósforo o que condiz com o resultado obtido nesse teste. Como não se tem conhecimento de toda a composição química do aditivo, pode ser que em sua formulação não há a presença de compostos nitrogenados e esse elemento pode ser um fator limitante para o crescimento das cepas nesse teste.

A Figura 34 C representa o resultado do teste de crescimento da *Shewanella algae* ambiental com o Aditivo 2 como fonte de nitrogênio e fósforo simultaneamente. Conforme observado, as medidas de D.O<sub>600</sub> da curva BHL-NP + AMT4 foram constantes e próximas de zero ao longo de todo experimento e podemos concluir que não houve crescimento bacteriano. Logo, o ADT2 não foi utilizado como fonte de desses elementos simultaneamente.

#### 4.4.5 Aditivos como fonte de Nitrogênio e Carbono

Os gráficos da Figura 35 ilustram os resultados dos experimentos que testaram os aditivos como fonte de nitrogênio e carbono simultaneamente.

Figura 35- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio e carbono simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

Os gráficos A e B da Figura 35 ilustram o comportamento da *Pseudomonas aeruginosa* ambiental em condições que as fontes de nitrogênio

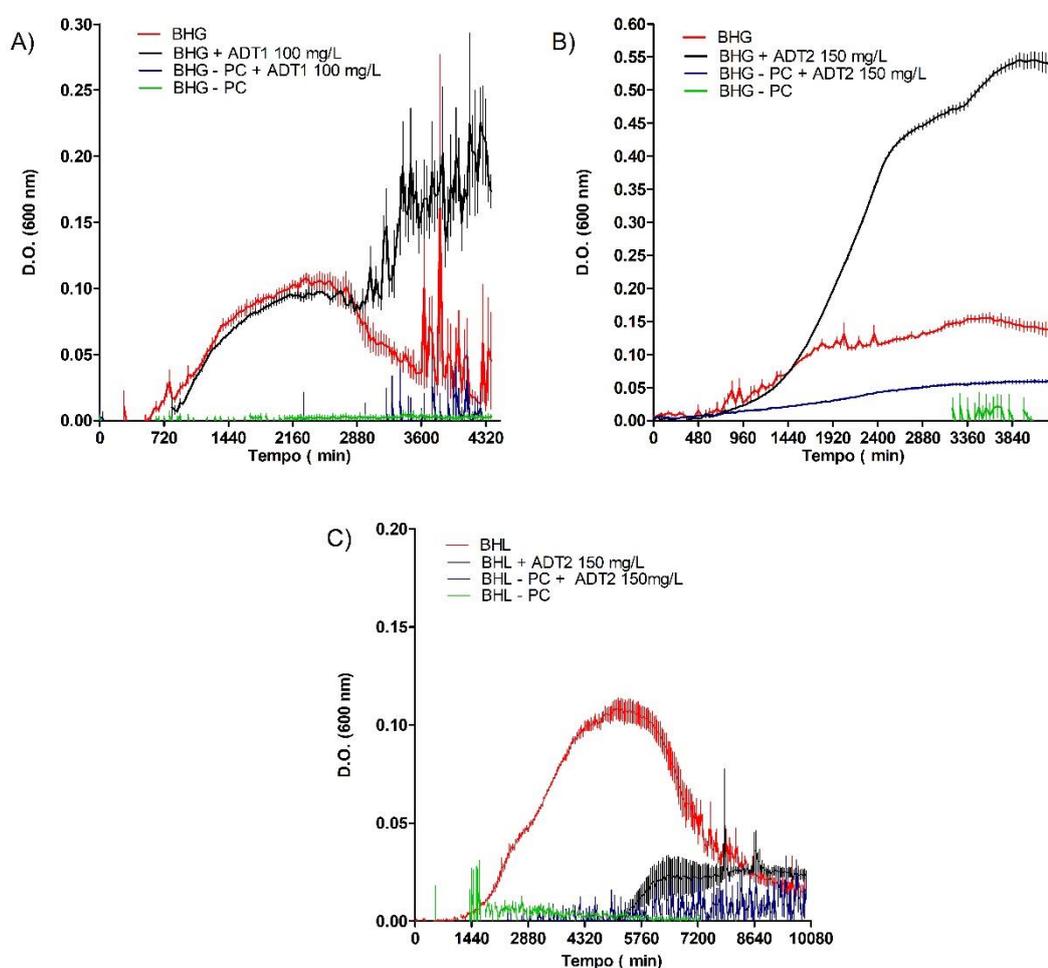
e carbono do meio Bushnell-Haas com Glicose foram substituídas pelos Aditivo 1 e Aditivo 2 respectivamente. As medidas da D.O.<sub>600</sub>, para essa condição (curvas BHG – NC + AMT) se mantiveram constantes e próximas de zero ao longo do experimento mostrando que não houve crescimento da cepa e consequentemente o microrganismo não foi capaz de metabolizar os aditivos e utilizá-los como fonte simultânea de nitrogênio e carbono.

O gráfico da Figura 35 C ilustra o resultado do teste em que o Aditivo 2 foi testado como fonte simultânea de nitrogênio e carbono pela *Shewanella algae* ambiental. Constatou-se que a curva de crescimento BHL-NC + ADT2 apresentou cinética de crescimento muito similar à curva de controle positivo, curva BHL. Porém, ambas as curvas contendo o ADT2 apresentaram aumento da fase de adaptação e a condição BHL-NC + ADT2 apresentou um crescimento de apenas 32% do crescimento máximo ocorrido com o meio isento do aditivo. Concluiu-se então, que apesar do crescimento mínimo ocorrido a cepa foi capaz de metabolizar esse aditivo.

#### 4.4.6 Aditivos como fonte de Fósforo e Carbono

Na Figura 36 temos os resultados dos experimentos que testou a utilização dos aditivos como fonte de fósforo e carbono simultaneamente pelos microrganismos.

Figura 36- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de fósforo e carbono simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

Os resultados dos testes em que a *Pseudomonas aeruginosa* ambiental é exposta ao Aditivo 1 como fonte simultânea de fósforo e carbono são apresentados na Figura 36 A. Observa-se que as medidas de D.O<sub>600</sub> da condição BHG-PC+ AMT3 são constantes e próximas de zero ao longo do experimento. Conclui-se então, que esse aditivo não foi utilizado como fonte de fósforo e carbono simultaneamente.

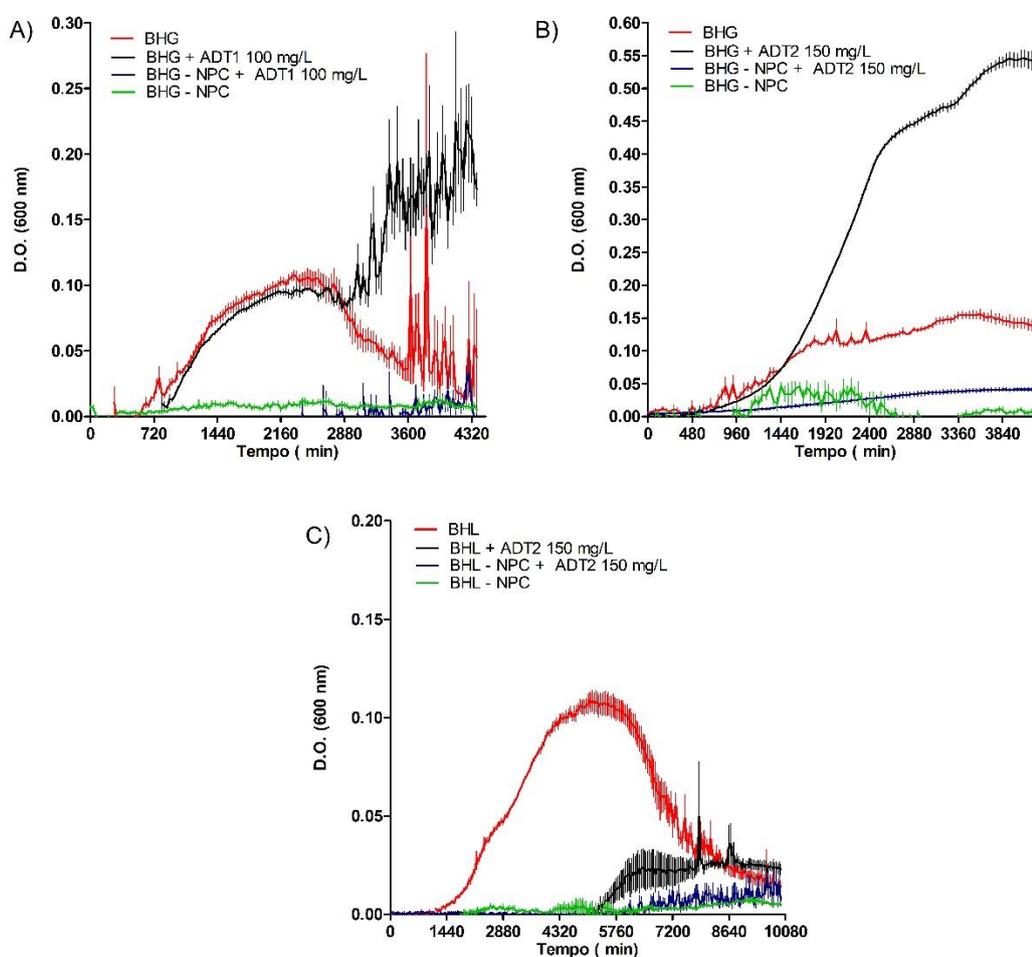
O gráfico da Figura 36 B ilustra os resultados obtidos com a *Pseudomonas aeruginosa* ambiental e Aditivo 2. Apesar da condição em que o ADT2 é a única fonte de fósforo e carbono, curva BHG-PC ADT2, apresentar aumento nas medidas de D.O<sub>600</sub> ao longo do experimento, quando comparamos estatisticamente com a curva de controle negativo, curva BHG-PC, não há diferenciação entre elas, principalmente ao final do experimento de acordo com o teste Two-Way-Anova. Com isso, constatamos que a cepa não utilizou o aditivo como fonte simultânea de fósforo e carbono.

A Figura 36 C expõe o resultado da curva de crescimento da *Shewanella algae* ambiental no meio em que o Aditivo 2 foi testado como fonte de fósforo e carbono simultaneamente. Ao decorrer do experimento, observa-se oscilações na curva de crescimento BHL-PC +AMT4. Porém a análise do teste TWO-WAY-ANOVA entre as curvas BHL-PC+AMT4 e BHL-PC (controle negativo de crescimento) mostra que essas duas curvas não apresentam diferenciação estatística com um grau de confiança de 95%. Com isso, conclui-se que o aditivo não foi utilizado como fonte de fósforo e carbono simultaneamente pelo microrganismo.

#### 4.4.7 Aditivos como fonte de Nitrogênio, Fósforo e Carbono.

O gráfico da Figura 37 ilustra os resultados dos experimentos que testaram os aditivos como fonte de nitrogênio, fósforo e carbono simultaneamente.

Figura 37- Gráfico ilustrando o resultado do teste em que os Aditivos 1 e 2 foram testados como fonte de nitrogênio, fósforo e carbono simultaneamente. A) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT1 100 mg/L e meio BHG; B) Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:30 e ADT2 150 mg/L e meio BHG. C) Cepa *Shewanella algae* ambiental. 30°C. Inóculo de 1:300 e ADT2 150 mg/L e meio BHL.



Fonte: O autor, 2022.

Os resultados dos experimentos em que o Aditivo 1 e o Aditivo 2 foram testados como fonte de nitrogênio, fósforo e carbono simultaneamente pela *Pseudomonas aeruginosa* ambiental são exibidos nos gráficos da Figura 37 A e B respectivamente.

Para os resultados envolvendo o ADT1 como fonte de nutriente, constata-se que as medidas de D.O.<sub>600</sub> se mantiveram constante e próxima de zero ao longo do experimento, o que não caracteriza uma curva de crescimento microbiológica. Conclui-se então, que a bactéria não é capaz de utilizar o aditivo como fonte de N, P e C simultaneamente.

Para o ADT2, a curva da condição em que o Aditivo 2 foi a única fonte desses elementos (curva BHG-NPC + ADT2) não apresenta diferenciação estatística da curva de controle de crescimento negativo (curva BHG-NPC). Logo, a cepa também não utilizou esse aditivo como fonte simultânea de carbono, fósforo e nitrogênio.

Os dados experimentais do cultivo da *Shewanella algae* ambiental no meio em que o Aditivo 2 foi testado como fonte de nitrogênio, fósforo e carbono simultaneamente estão ilustrados na Figura 37 C. Após a comparação estatística dos dados, pelo teste Two-Way- Anova, conclui-se que a curva de crescimento BHL-NPC + ADT2 e o controle negativo de crescimento (curva BHL-NPC) não apresentam diferenciação com um nível de confiança de 95%. Logo, o microrganismo não utilizou esse aditivo como fonte simultânea de carbono, fósforo e nitrogênio.

#### 4.5 Etapa 5 - Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

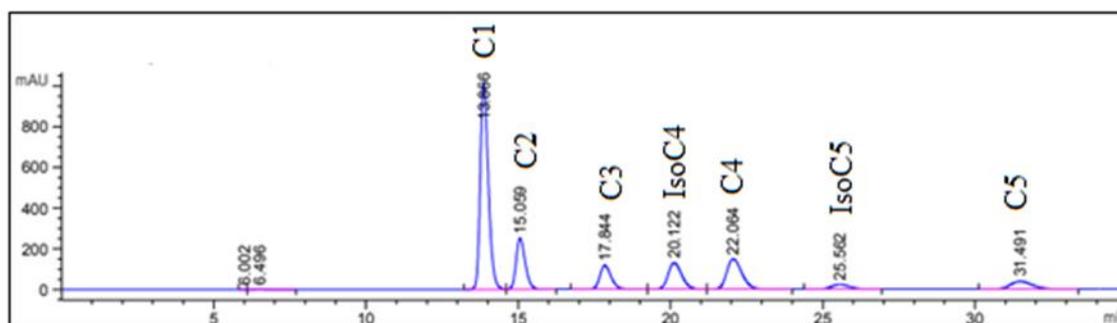
Essa etapa da metodologia objetivou-se confirmar os resultados dos testes de biodegradação. Sendo assim, apenas as amostras que apresentaram biodegradação dos compostos, estímulo no crescimento celular ou com resultados indefinidos foram submetidos a essa fase da metodologia.

##### 4.5.1 Análise dos ácidos carboxílicos de cadeia curta – ACCC

Para comparação dos cromatogramas, o tempo de retenção de cada ácido orgânico foi determinado a partir de uma solução padrão de cada ácido individualmente, nas condições cromatográficas descritas por Mesquita et al. (2013). Em seguida, uma mistura destes ácidos foi injetada para verificar a eficiência de sua separação.

Na Figura 38, é apresentado o cromatograma da mistura dos padrões de ácidos graxos de cadeia curta (C1 a C5) no comprimento de onda de 210 nm: (C1) ácido fórmico, (C2) ácido acético, (C3) ácido propiônico, (IsoC4) ácido isobutírico, (C4) ácido butírico, (IsoC5) ácido isovalérico e (C5) ácido valérico. A ordem de eluição dos ACCC foi obtida pela análise dos ácidos separadamente nas mesmas condições, esse resultado é exibido no APÊNDICE A.

Figura 38- Cromatograma da mistura de todos os padrões dos ácidos carboxílicos de cadeia curta: (C1) ácido fórmico, (C2) ácido acético, (C3) ácido propiônico, (IsoC4) ácido isobutírico, (C4) ácido butírico, (IsoC5) ácido isovalérico e (C5) ácido valérico. Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. \*6.0 e \*6.4: impureza do solvente



Fonte: O autor, 2022.

O tempo de retenção é o tempo que o composto leva para ser eluído através da coluna cromatográfica e este tempo é dependente do número de carbonos de cada composto. Assim, verifica-se que o ácido fórmico (C1), ácido de menor peso molecular é o primeiro a eluir, em seguida o ácido acético (C2), ácido propiônico (C3), ácido isobutírico (IsoC4), ácido butírico (C4), ácido isovalérico (IsoC5) e o valérico (C5) (Tabela 15). Os sinais em 6 minutos em todos os cromatogramas é impureza do solvente e não interfere na amostra.

Tabela 15- Tempos de retenção para cada ácido carboxílico de cadeia curta presente na mistura.

Padrão	Tempo de Retenção (min)
Ácido fórmico (C1)	13.8
Ácido acético (C2)	15.0
Ácido propiônico (C3)	17.8
Ácido isobutírico (IsoC4)	20.1
Ácido butírico (C4)	22.0
Ácido isovalérico (IsoC5)	25.5

---

Ácido valérico (C5)	31.4
---------------------	------

---

Fonte: O autor, 2022.

#### 4.5.2 Análise dos meios de cultura com ou sem adição dos inibidores de incrustações.

A condução dos testes de biodegradação foi realizada em meios de cultivo contendo fontes de carbono diferentes para a *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella algae*. Portanto, para facilitar a execução dos experimentos e análises os resultados serão apresentados e discutidos em tópicos separado por microrganismos.

##### 4.5.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

###### 4.5.2.1.1 Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo sem aditivo

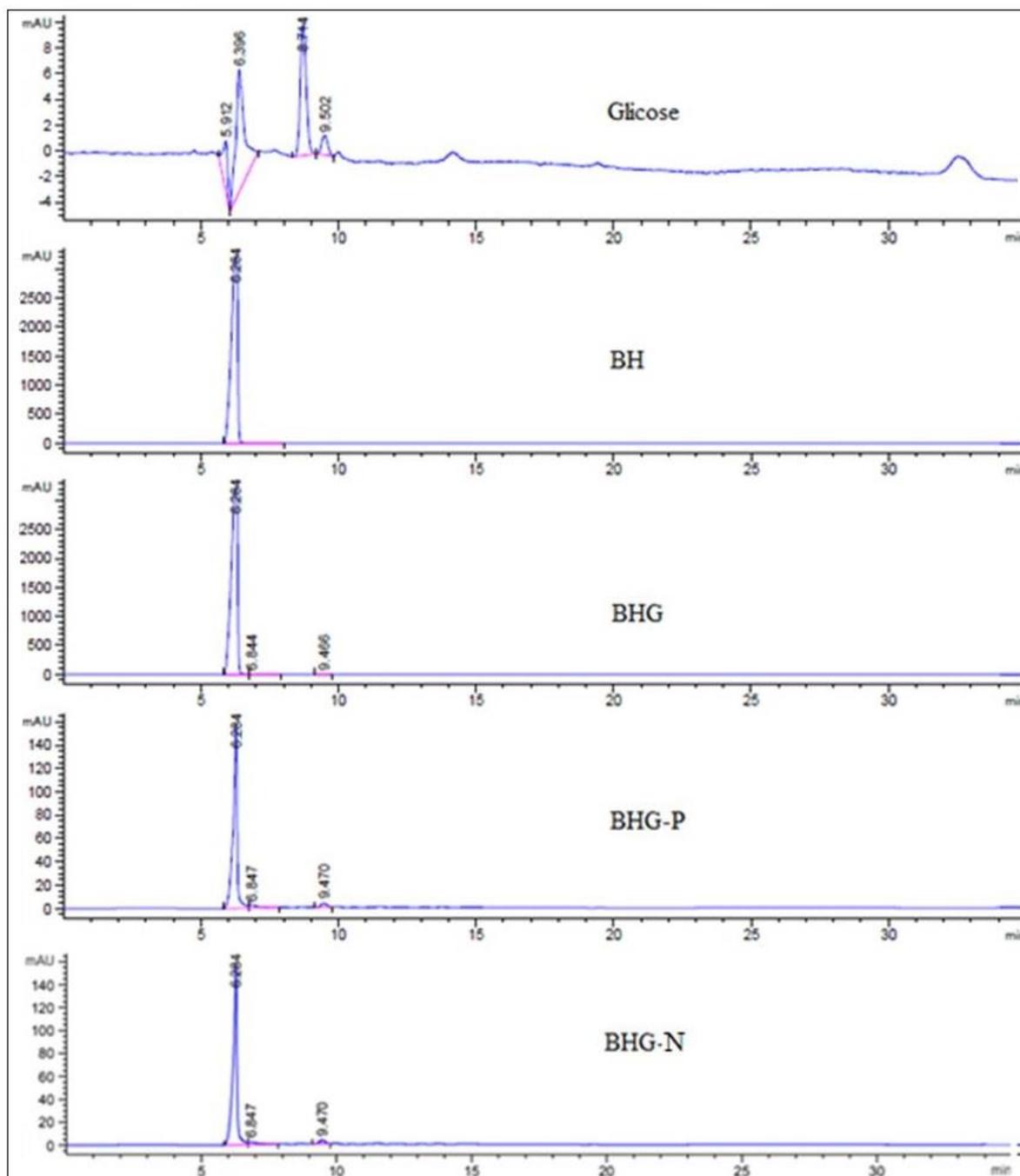
Todos os componentes presentes no meio de cultura, também foram analisados por CLAE, separadamente com o objetivo de verificar se algum componente do meio apresenta tempos de retenção próximos aos ACCC, que pudesse prejudicar a sua determinação (Figura 39). Neste trabalho, a fonte de carbono usado para a avaliação do crescimento da *P. aeruginosa* foi a glicose. Mais especificamente, confirmou-se a biodegradação nas condições mostradas na Tabela 16.

Tabela 16- Tabela resumo das condições selecionadas para a confirmação dos resultados obtidos nos testes de biodegradação com a *P. aeruginosa*.

<b>Meio de cultivo</b>	<b>Amostra/Aditivo</b>
Bushnell-Haas com Glicose (BHG)	1
Bushnell-Haas com Glicose (BHG)	2
Bushnell-Haas com Glicose sem nitrogênio (BHG-N)	1
Bushnell-Haas com Glicose sem nitrogênio (BHG-N)	2
Bushnell-Haas com Glicose sem fósforo (BHG-P)	2

Fonte: O autor, 2022.

Figura 39- Cromatogramas de todos os componentes do meio de cultivo: Bushnell-Hass com glicose (BHG), Bushnell-Hass com glicose sem adição de fosforo (BHG-P), Bushnell-Hass com glicose sem adição de nitrogênio (BHG-N) e Bushnell-Hass com glicose sem adição de fósforo e carbono (BHG-PC). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. 6.2 e 6.8\*: impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

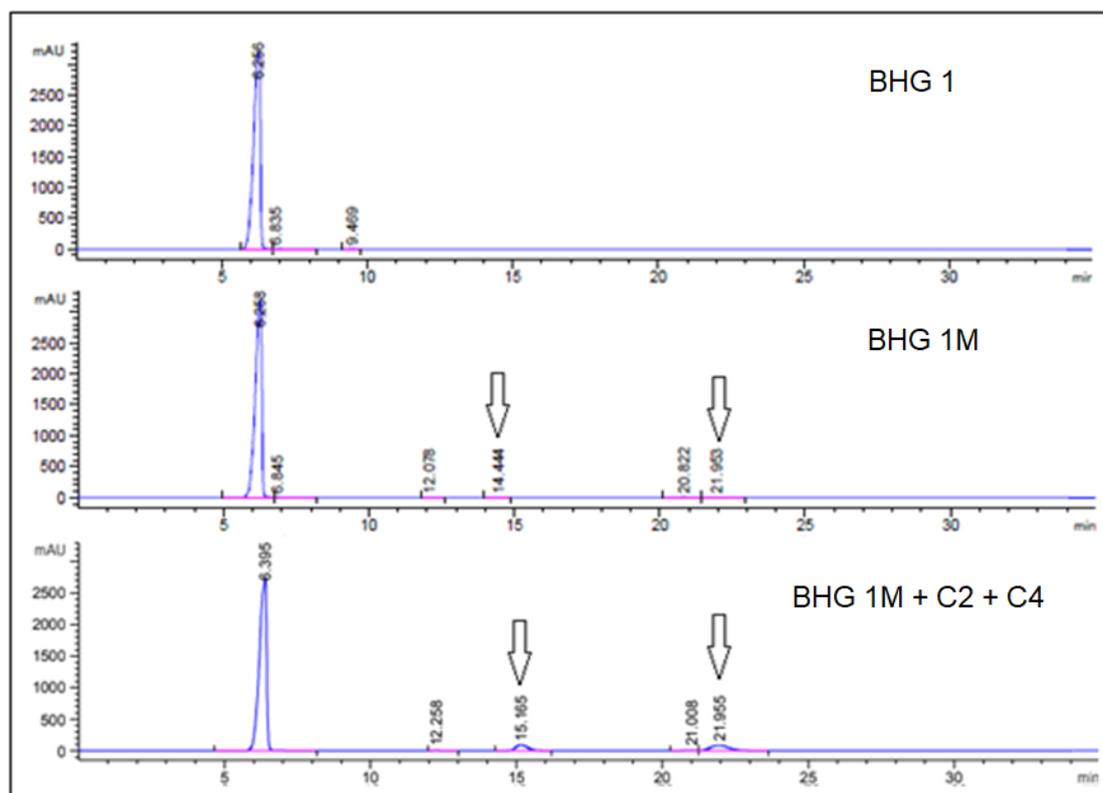
Nos cromatogramas da Figura 39 observa-se alguns sinais no início do cromatograma (até 10 min) que como não irão interferir na análise dos ACCC foram ignorados. Com exceção da glicose, todos os cromatogramas acima estão em 210 nm a glicose apresentou melhor perfil para identificação do seu sinal ( $t_r=5$  minutos) em 200 nm. Assim, foi definido o comprimento de 210 nm para todas as amostras.

#### 4.5.2.1.2 Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo com aditivos e *Pseudomonas aeruginosa*

Os aditivos, identificados como Aditivo 1 e Aditivo 2, foram adicionados nos meios de cultivo, anteriormente analisados, e os cromatogramas dessas amostras, antes e depois da adição do microrganismo *P. aeruginosa*, foram obtidos nas mesmas condições estabelecidas para o ACCC.

Na Figura 40 estão apresentados os cromatogramas da amostra BHG 1 (meio de cultivo e Aditivo 1), a amostra BHG 1M (meio de cultivo com a Aditivo 1 após degradação microbiológica) e amostra BHG 1M + C2 + C4 (meio de cultivo com a Aditivo 1 após degradação microbiológica fortificado com ácido acético e ácido butírico). As setas nos cromatogramas indicam o tempo de retenção próximo ao C2 e C4.

Figura 40- Cromatograma da amostra BHG 1 (meio de cultivo com Aditivo 1), BHG 1M (meio de cultivo com Aditivo 1 após degradação microbiológica) e amostra BHG 1M + C2 + C4 (meio de cultivo com Aditivo 1 e microrganismo fortificado com ácido acético e ácido butírico). M= *P. aeruginosa*. Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

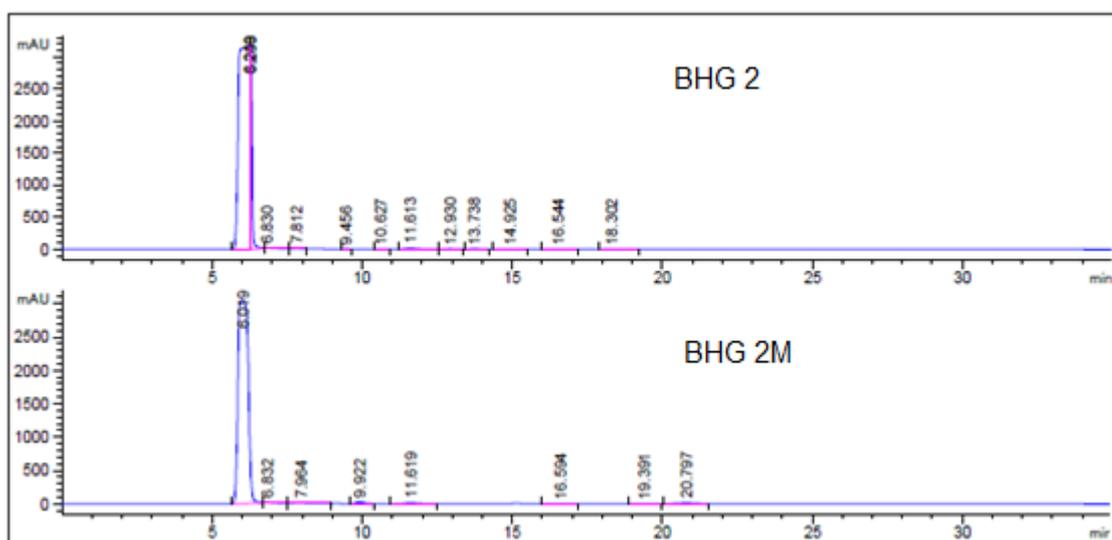
Comparando os cromatogramas das amostras do meio de cultura com a adição do Aditivo 1, antes e após o cultivo microbiano, observa-se a presença dos sinais em 14.4 e 21.9 minutos. Esses sinais, ausente no cromatograma da amostra sem adição do microrganismo, pode ser (C2) e (C4). Para a confirmação, foi adicionado 2  $\mu$ L do ácido acético e ácido butírico na amostra BHG 1M.

Com a adição desses ácidos a amostra, observa-se um aumento da área do sinal em 15.1 e 21.9 minutos (BHG 1M + C2 + C4). Este fato, sugere a formação do ácido acético, mas não podemos afirmar se houve a produção deste ácido. Neste caso, podemos ter a formação de outro produto eluindo

juntamente com o C2. Para o ácido butírico, o sinal em 21.9 minutos, confirma a formação deste ácido.

A mesma análise foi realizada com o Aditivo 2. A Figura 34, apresenta os cromatogramas de CLAE das amostras: BHG 2 (meio de cultivo com glicose mais o Aditivo 2) e a amostra BHG 2M (meio de cultivo com glicose mais o Aditivo 2 após degradação microbiana).

Figura 41- Cromatograma da amostra BHG 2 (meio de cultivo com Aditivo 2), BHG 2M (meio de cultivo com Aditivo 2 após degradação microbiológica). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente.



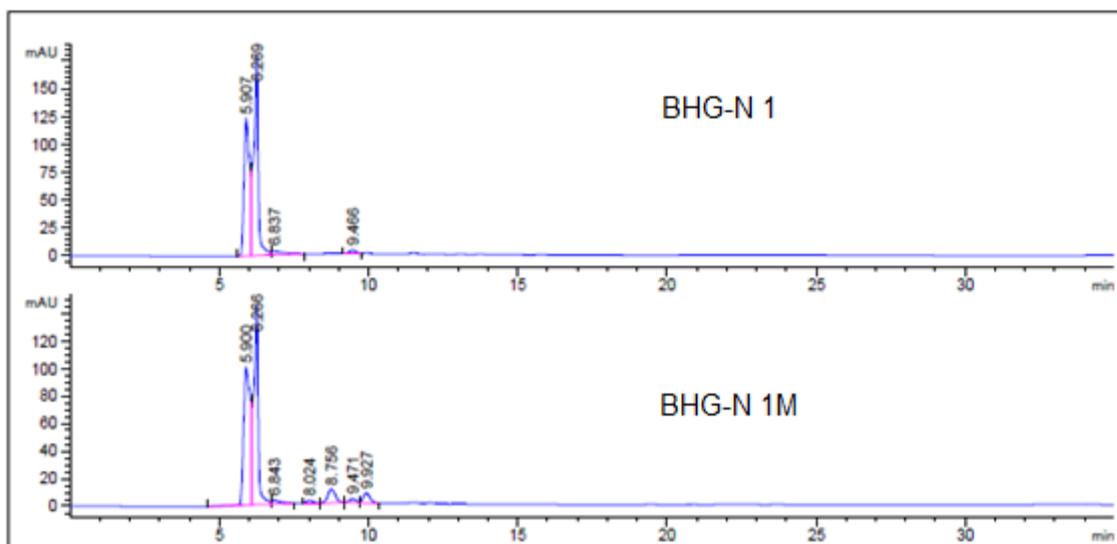
Fonte: O autor, 2022.

O cromatograma após a degradação microbiana não apresenta sinais com tempo de retenção próximos aos ACCC, indicando a não existências destes ácidos na amostra após degradação microbiana.

Na Figura 42 é mostrado o cromatograma da amostra BHG-N 1 (meio de cultivo sem nitrogênio com o Aditivo 1) e amostra BHG-N 1M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 1 e microrganismo). Para a amostra BHG-N 1M, podemos afirmar que não houve formação de ácidos carboxílicos pois

observamos no cromatograma a ausência de sinais que indiquem a formação destes ácidos.

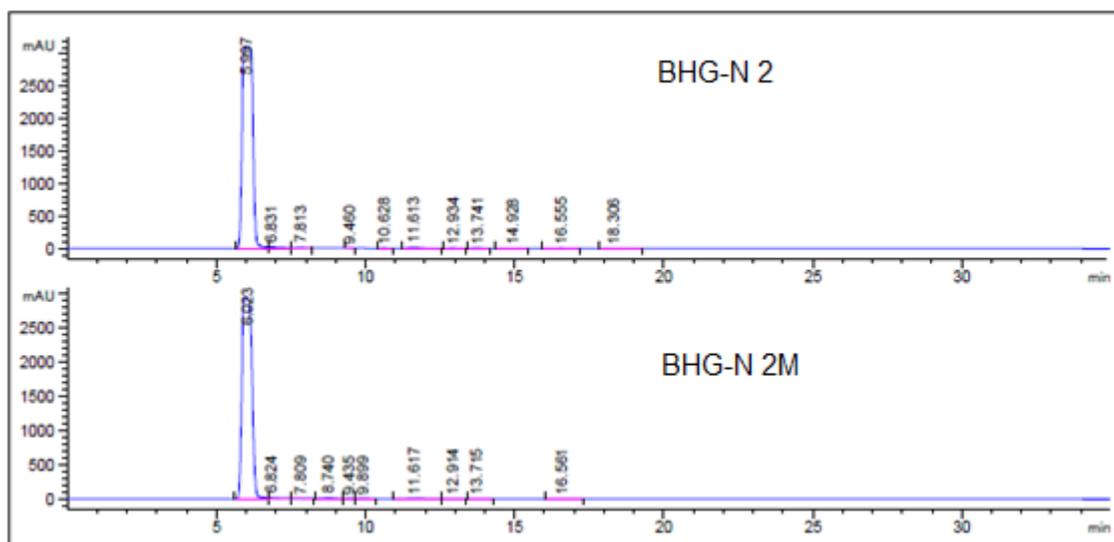
Figura 42- Cromatograma da amostra BHG-N 1 (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 1) e amostra BHG-N 1M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 1 e microrganismo). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 5.9, 6.2 e 6.8\* impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

Na Figura 43 é apresentado o cromatograma da amostra BHG-N 2 (meio de cultivo sem nitrogênio com o Aditivo 2) e amostra BHG-N 2M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2 e microrganismo).

Figura 43- Cromatograma da amostra BHG-N 2 (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2) e amostra BHG-N 2M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2 e microrganismo) Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6 e 6.8\* impureza do solvente

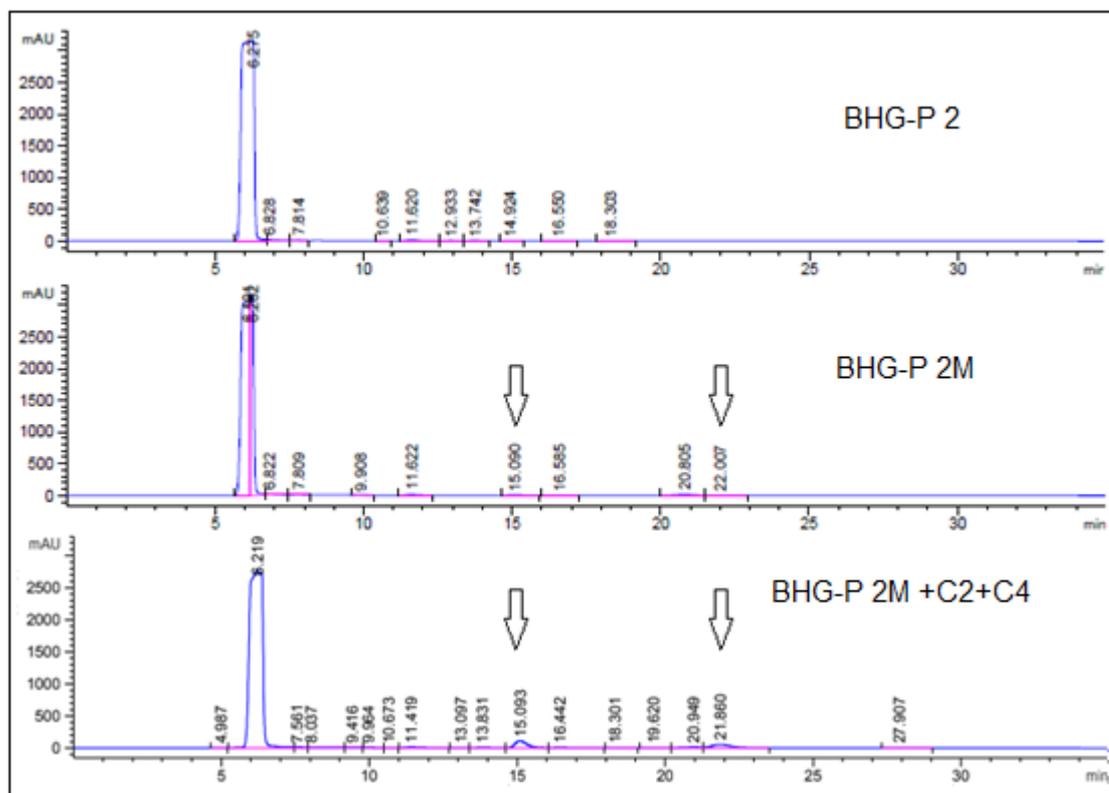


Fonte: O autor, 2022.

Observa-se no cromatograma da amostra BHG-N 2M, os mesmos sinais no cromatograma da amostra antes do cultivo microbiano (BHG-N 2). Para essa amostra, também podemos propor que não houve formação de ácidos carboxílicos como produtos de degradação.

Na Figura 44, é apresentado o cromatograma da amostra BHG-P 2 (meio de cultivo sem fósforo com o Aditivo 2), amostra BHG-P 2M (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 e microrganismo) e amostra BHG-P 2M + C2+C4 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 fortificada com ácido acético e ácido butírico).

Figura 44- Cromatograma da amostra BHG-P 2 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2), amostra BHG-P 2M (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 e microrganismo) e amostra BHG-P 2M + C2+C4 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 fortificada com ácido acético e ácido butírico). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *P. aeruginosa*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente



Fonte: O autor, 2022.

O perfil cromatográfico qualitativo, através da comparação com padrões, sugeriu a presença de ácido acético (C2) e ácido butírico (C4) na amostra BHG-P 2M. Nesta amostra, verifica-se o tempo de retenção em 15.0 minutos, indicando a formação do ácido acético. Com a adição de C2 a amostra BHG-P 2M, observa-se o aumento da área no mesmo sinal em 15.0 minutos, desta forma, pode-se afirmar que o ácido acético é um produto de degradação desta amostra.

Com a adição de C4 a amostra BHG-P 2M, observa-se o aumento da área no sinal em 21.8 minutos, pode-se sugerir que há formação deste ácido e provavelmente um outro produto coeluinto junto a este sinal.

#### 4.5.2.2 *Shewanella algae*

##### 4.5.2.2.1 Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo sem aditivo.

Assim como nos tópicos para a *P. aeruginosa* os componentes presentes no meio de cultura, foram analisados por CLAE, separadamente com o objetivo de verificar se algum componente do meio apresenta tempos de retenção próximos aos ACCC, que pudesse prejudicar a sua determinação.

A fonte de carbono usado para a avaliação do crescimento da *S. algae* foi o lactato e as condições selecionadas para confirmação dos resultados de biodegradação com essa cepa é exibida na Tabela 17.

Tabela 17- Tabela resumo das condições selecionadas para a confirmação dos resultados obtidos nos testes de biodegradação com a *S. algae*.

Meio de cultivo	Amostra
Bushnell-Haas com Lactato (BHL)	2
Bushnell-Haas com Lactato sem nitrogênio (BHL-N)	2
Bushnell-Haas com Lactato sem fósforo (BHL-P)	2
Bushnell-Haas com Lactato sem nitrogênio e carbono (BHL-NC)	2

Fonte: O autor, 2022.

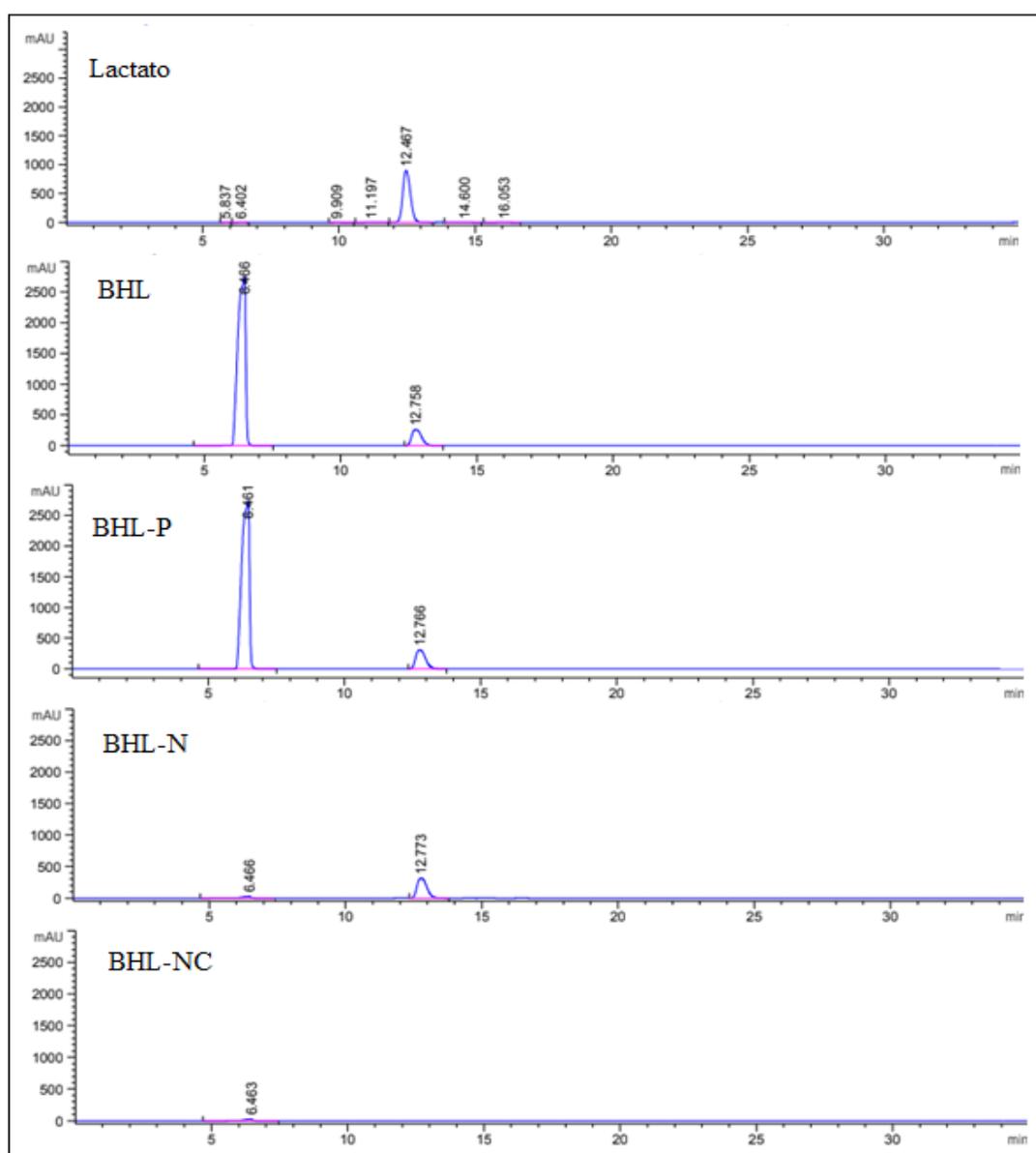
Na Figura 45 é apresentando os cromatogramas destes meios com adição de lactato. Observa-se que o sinal em 12 minutos, sinal atribuído ao lactato é ausente apenas no cromatograma da amostra BHL-NC. Como a fonte de carbono é do lactato e nesta amostra não tem a adição deste composto, já era esperado a ausência deste sinal nesta amostra.

Esse sinal também não interfere na análise dos ACCC, pois o tempo de retenção do primeiro ácido carboxílico, o ácido fórmico, ocorre a partir dos 13 minutos.

Nestes meios, apenas o Aditivo 2 foi adicionado nos meios de cultivo, anteriormente analisados, e os cromatogramas dessas amostras, antes e

depois da adição do microrganismo, foram obtidos nas mesmas condições estabelecidas para o ACCC.

Figura 45- Cromatogramas de todos os componentes do meio de cultivo com lactato: Bushnell-Hass com lactato (BHL), Bushnell-Hass com lactato sem adição de fosforo (BHL-P), Bushnell-Hass com lactato sem adição de nitrogênio (BHL-N) e Bushnell-Hass com lactato sem adição de nitrogênio e carbono (BHL-NC). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. 6.4\*impureza do solvente.

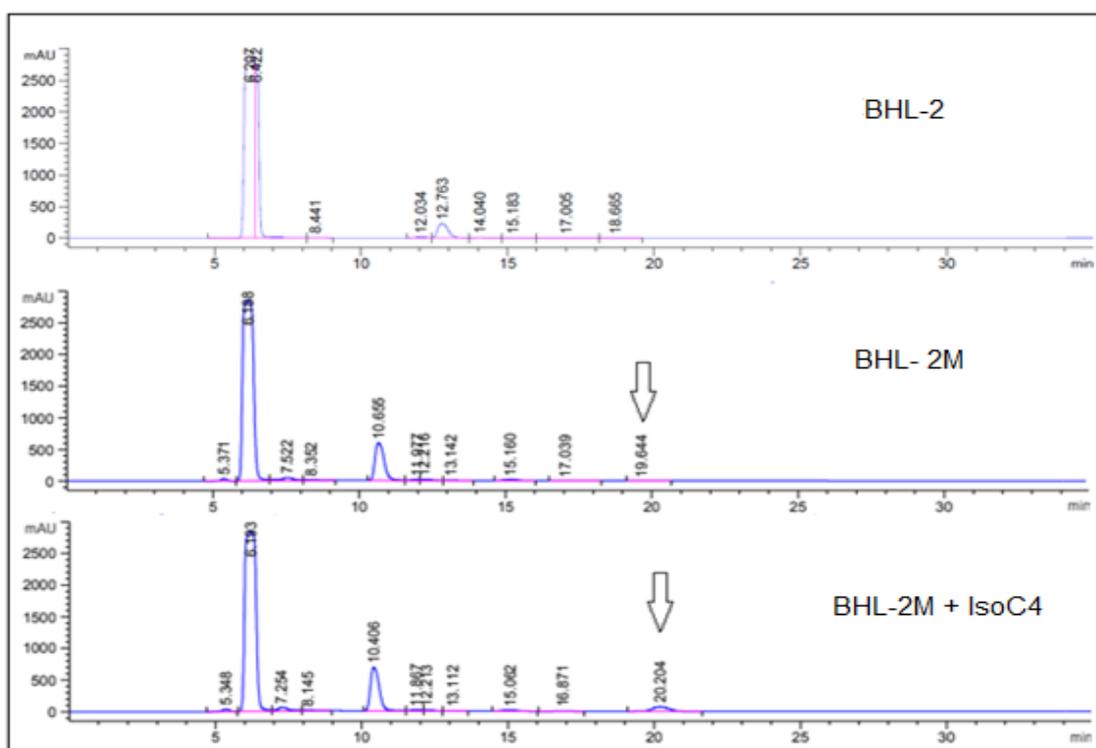


Fonte: O autor, 2022.

#### 4.5.2.2.2 Análise dos cromatogramas dos meios de cultivo com aditivos e *Shewanella algae*

Na Figura 46, estão apresentados os cromatogramas da amostra BHL 2 (meio de cultivo e Aditivo 2), a amostra BHL 2M (meio de cultivo com o Aditivo 2 após degradação microbiológica) e amostra BHL 2M + IsoC4 (meio de cultivo com o Aditivo 2 após degradação microbiológica fortificado com ácido isobutírico). As setas nos cromatogramas indicam o tempo de retenção próximo a esse ácido.

Figura 46- Cromatograma da amostra BHL 2 (meio de cultivo com Aditivo 2), BHL 2M (meio de cultivo com Aditivo 2 após degradação microbiológica) e amostra BHL 2M + IsoC4 (meio de cultivo com Aditivo 2 e fortificado com ácido Isobutírico). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente: 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *S. algae*. 5.3 e 6.2\* impureza do solvente.



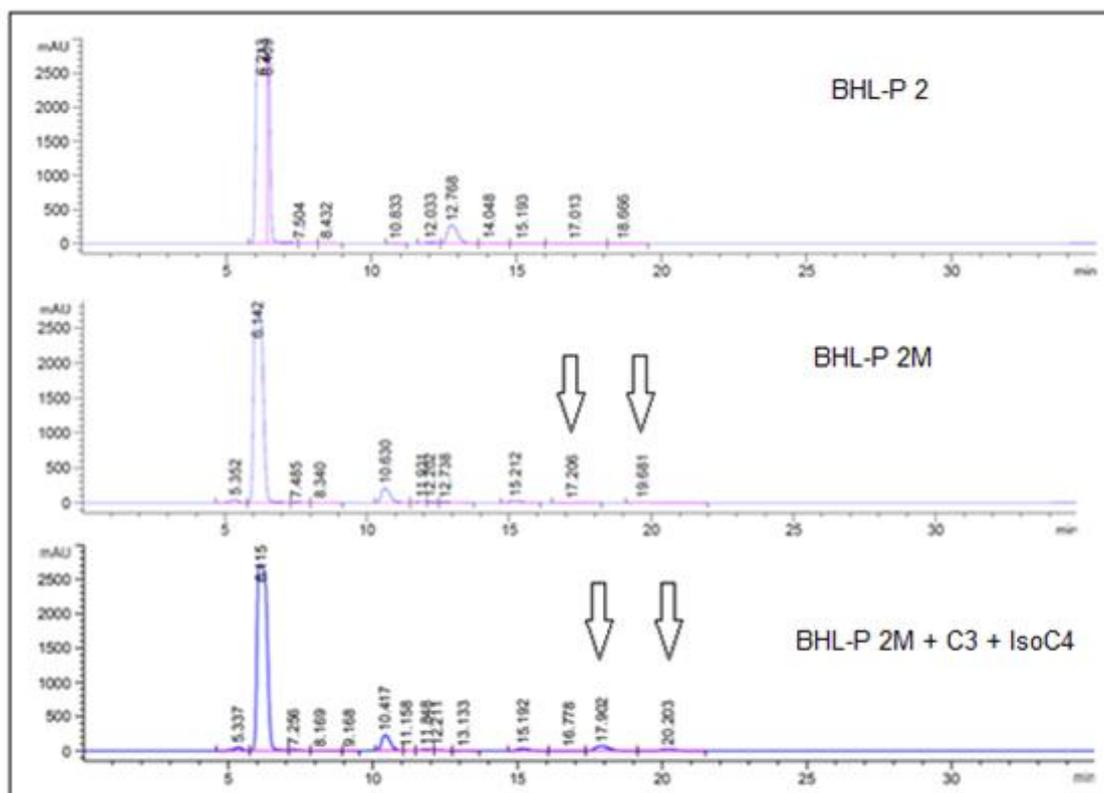
Fonte: O autor (2022)

Comparando os cromatogramas da Figura 46, observa-se a presença do sinal em 19.6 minutos no cromatograma da amostra após o cultivo microbiano (BHL 2M). Esse sinal, ausente no cromatograma da amostra sem o microrganismo, sugere a formação do IsoC4 como um produto de degradação. Para a confirmação desse sinal, foi adicionado 2 µL deste ácido na amostra BHL 2M.

Com a adição do ácido isobutírico, verifica-se um aumento da área do sinal em 20.2 minutos, indicando uma co-eluição do IsoC4 neste componente da amostra. Este fato sugere a formação do ácido, porém, não podemos afirmar se houve a produção desta substância.

Na Figura 47 estão apresentados os cromatogramas das amostras BHL-P 2 (meio de cultivo sem a adição de fósforo e Aditivo 2), a amostra BHL-P 2M (meio de cultivo sem adição de fósforo com o Aditivo 2 após degradação microbiológica) e amostra BHG-P 2M + C3 + IsoC4 (meio de cultivo sem a adição de fósforo com o Aditivo 2 após degradação microbiológica e fortificado com ácido propiônico (C3) e isobutírico (IsoC4). As setas nos cromatogramas indicam o tempo de retenção próximo a esses ácidos.

Figura 47- Cromatograma da amostra BHL-P 2 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2), BHL-P 2M (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2 após degradação microbiológica) e amostra BHL-P 2M + C3 + IsoC4 (meio de cultivo sem fósforo com Aditivo 2, microrganismo e fortificado com ácido propiônico e Isobutírico) Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente: 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *S. algae*. 5.3 e 6.1\* impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

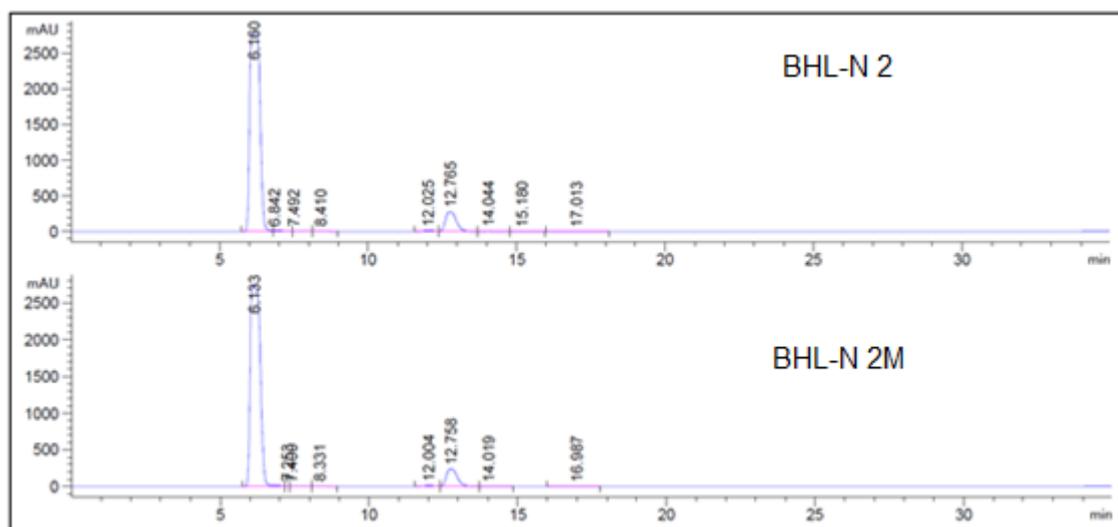
Verifica-se nos cromatogramas da Figura 47 a presença de dois sinais em 17.2 e 19.6 minutos na amostra após o cultivo microbiano. Esses sinais sugerem a formação do ácido propiônico e ácido isobutírico como produtos de degradação. Para a confirmação, foi adicionado 2  $\mu$ L de cada ácido nesta amostra.

Após a adição desses ácidos, observamos o aumento da área dos sinais em 17.9 minutos e 20.2 minutos. Com isso, podemos sugerir a formação deles, porém não podemos afirmar se houve a produção destes ácidos

Na Figura 48 estão apresentados os cromatogramas das amostras BHL-N 2, (meio de cultivo sem a adição de nitrogênio e Aditivo 2) e a amostra BHL-N 2M (meio de cultivo sem adição de nitrogênio com o Aditivo 2 após degradação microbiológica).

Como não foi observado mudança no cromatograma desta amostra após cultivo microbiano (BHL-N 2M), podemos afirmar que não houve produtos de degradação.

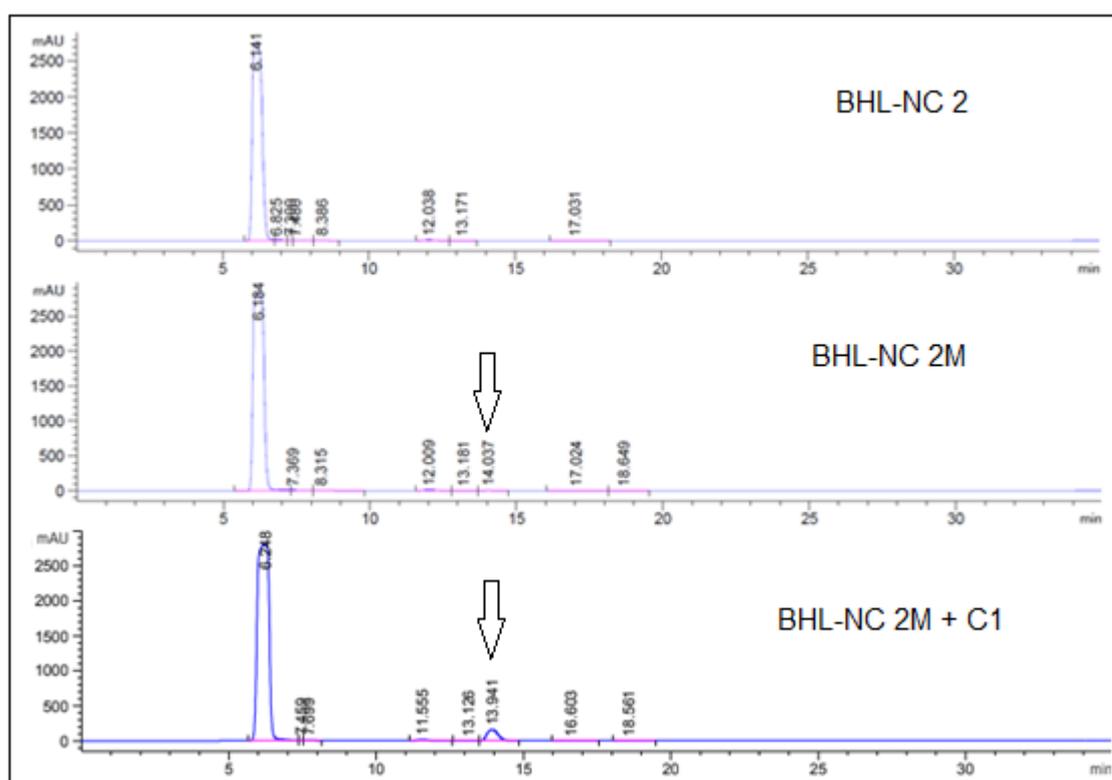
Figura 48- Cromatograma da amostra BHL-N 2 (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2) e BHL-N 2M (meio de cultivo sem nitrogênio com Aditivo 2 após degradação microbiológica). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 55°C, eluente: 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. M= *S. alga*. 6.2 e 6.8\* impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

Na Figura 49 estão apresentados os cromatogramas das amostras BHL-NC 2, (meio de cultivo sem a adição de nitrogênio e carbono mais o Aditivo 2), a amostra BHL-NC 2M (meio de cultivo sem adição de nitrogênio e carbono com o Aditivo 2 após degradação microbiológica) e BHL-NC 2M + C1 (meio de cultivo sem adição de nitrogênio e carbono com o Aditivo 2 após degradação microbiológica e ácido fórmico).

Figura 49- Cromatograma da amostra BHL-NC 2 (meio de cultivo sem nitrogênio e carbono com Aditivo 2), BHL-NC 2M (meio de cultivo sem nitrogênio e carbono com Aditivo 2 após degradação microbiológica) e BHL-NC 2M + C1 (meio de cultivo sem nitrogênio e carbono com Aditivo 2 após degradação microbiológica e ácido fórmico). Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8mm) a 55°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210nm. M= *S. algae*. 6.1\* impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

Comparando os cromatogramas da Figura 49, o BHL-NC 2 e BHL-NC 2M, observa-se a presença do sinal em 14 minutos no cromatograma da amostra após o cultivo microbiano. Esse sinal, ausente no cromatograma da amostra sem o microrganismo, sugere fortemente a formação do ácido fórmico como produto de degradação.

## 5 CONCLUSÕES

Quanto ao teste de contaminação microbiológica das amostras apenas o Aditivo 3 apresentou resultado positivo, indicando a presença de uma levedura como contaminante.

Para o teste envolvendo as culturas de Bactérias Redutoras de Sulfato temos as seguintes conclusões:

- Os Aditivos 1 e 3 permitiram o crescimento das culturas mista e pura de BRS em todas as condições testadas.

- O Aditivo 2 promoveu o crescimento em todas as condições experimentais que envolveu a cultura pura de BRS. No entanto, não se apresentou tóxico para a cultura mista de BRS e permitiu o crescimento dessa cultura no meio Postgate C com lactato e com o aditivo. Nas demais condições o ADT2 não promoveu o crescimento microbiológico para a cultura mista mostrando que não foi utilizado como fonte de nutriente.

- O Aditivo 4 não se mostrou tóxico para ambas as culturas de BRS estudadas. Todavia, não foi capaz de servir como fonte de nutriente para as culturas mista e pura.

Os resultados dos experimentos realizados com a *Pseudomonas aeruginosa ambiental* e *Shewanella algae ambiental* para a avaliação da estabilidade química das amostras de aditivos utilizados na produção do petróleo, levaram às seguintes conclusões:

- Tanto a *Pseudomonas aeruginosa* quanto a *Shewanella algae* apresentaram crescimento no meio de Cultura Caldo Nutriente.

- O meio de cultura Bushnell-Haas com lactato promoveu crescimento da *Pseudomonas aeruginosa ambiental* tão eficiente quanto o

meio Caldo Nutriente. O meio BHL foi o único meio mineral que promoveu o crescimento da *Shewanella algae ambiental* e foi o mais adequado para a condução dos experimentos com essa cepa.

- O meio de Cultura Bushnell-Haas com glicose foi o meio em que se mostrou mais adequado para a condução dos experimentos e análise dos resultados com a *Pseudomonas aeruginosa ambiental*. Porém esse meio mineral não promoveu o crescimento da *Shewanella algae*.

- Amostras de etilenoglicol (+ aminoetanol) e blend de polímeros foram utilizadas como fontes nutricionais por bactérias do gênero *Pseudomonas*, provavelmente, em condições de diauxia, onde o esgotamento da fonte primária de elementos nutricionais fez com que as mesmas servissem como fonte secundária disponível.

- Os testes de biodegradação mostraram que o Aditivo 1 (aminoetanol e etilenoglicol) na concentração de 100 mg/L e o Aditivo 2 (blend de polímeros) na concentração de 150 mg/L influencia no crescimento celular da *Pseudomonas aeruginosa ambiental*.

- Todas as concentrações de Aditivo 1 analisadas, inibiram o crescimento da *Shewanella algae* nos meios de Cultivo BHL, BHG, BH e Solução Salina.

- A concentração de 150 mg/L de Aditivo 2 influenciou no crescimento da *Shewanella algae* nos meios de Cultivo Bushnell-Haas com lactato.

- Todas as concentrações de Aditivo 3 e 4 analisadas, inibiram o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella algae* nos meios de Cultivo BHL, BHG, BH e solução salina.

- Um resumo global dos resultados obtidos indica, em termos de biodegradação: A *Pseudomonas aeruginosa ambiental* não utiliza o

etilenoglicol e aminoetanol como fonte de carbono, fósforo ou nitrogênio e usa a amostra de blend de polímeros como fonte de P. No entanto, a *Shewanella algae* usa a mistura de polímeros como fonte de P e NC.

Foram estabelecidos todos os tempos de separação cromatográfica dos ácidos carboxílicos de C1 a C5, potenciais substratos para BRS.

A análise cromatográfica dos Aditivos 1 (etilenoglicol + aminoetanol) e 2 (blend de polímeros), após biodegradação pelos microrganismos sugeriu que alguns produtos de degradação são ácidos carboxílicos de C1 a C5, mostrando que estes aditivos podem contribuir para o crescimento de BRS, após aplicação, em várias condições. Isso foi confirmado, adicionando-se os padrões nas amostras, corroborando essas conclusões pela observação do aumento dos sinais cromatográficos.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o estudo de biodegradação para outros aditivos como os inibidores de corrosão, antiespumantes, surfactantes, dentre outros. Além de utilizar outros microrganismos presentes no ambiente de produção de petróleo. O emprego de consórcios de microrganismos no estudo da biodegradação dos aditivos também seria pertinente.

- Utilizar as técnicas metagenômicas para estudar a influência da adição dos inibidores de incrustações sobre comunidades ambientais e assim, poder compreender a toxicidade das substâncias perante os microrganismos.

- Estudar o efeito da adição dos aditivos na produção de  $H_2S$  com diferentes tipos de culturas (mistas e puras) de bactérias redutoras de sulfato.

## REFERÊNCIAS

- ATILHAN, M.; APARICIO, S. Review on chemical enhanced oil recovery: Utilization of ionic liquids and deep eutectic solvents. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 205, n. 108746, p. 1–11, 2021.
- BARAKA-LOKMANE, S. et al. Can green scale inhibitors replace phosphonate scale inhibitors?: Carbonate coreflooding experiments. **Petroleum Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 427–441, 2009.
- BARAKA-LOKMANE, S.; SORBIE, K. S. Effect of pH and scale inhibitor concentration on phosphonate-carbonate interaction. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 70, n. 1–2, p. 10–27, 2010.
- BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 181–186, 2004.
- BERNHARD, M. et al. Aerobic biodegradation of polyethylene glycols of different molecular weights in wastewater and seawater. **Water Research**, v. 42, n. 19, p. 4791–4801, 2008.
- BROWN, L. R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 316–320, 2010.
- BROWNING, F. H.; FOGLER, H. S. Precipitation and Dissolution of Calcium-Phosphonates for the Enhancement of Squeeze Lifetimes. **SPE Production & Facilities**, v. 10, n. 3, p. 144–150, 1995.
- BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. **Journal of bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653–673, 1940.
- CHILINGAR, G. V.; MOURHATCH, R.; AL-QAHTANI, G. D. **The Fundamentals of Corrosion and Scaling for Petroleum and Environmental Engineers**. Elsevier, 2013.
- CUI, Q. F. et al. Emulsifying action of *Pseudomonas aeruginosa* L6-1 and its metabolite with crude oil for oil recovery enhancement. **Petroleum Science and Technology**, v. 35, n. 11, p. 1174–1179, 2017a.
- CUI, Q. F. et al. Comparison of in-situ and ex-situ microbial enhanced oil recovery by strain *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 in laboratory sand-pack columns. **Petroleum Science and Technology**, v. 35, n. 21, p. 2044–2050, 2017b.
- DEMIRBAS, A.; ALSULAMI, H. E.; HASSANEIN, W. S. Utilization of Surfactant Flooding Processes for Enhanced Oil Recovery (EOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 33, n. 12, p. 1331–1339, 2015.

DRUETTA, P.; RAFFA, P.; PICCHIONI, F. Chemical enhanced oil recovery and the role of chemical product design. **Applied Energy**, v. 252, n. 113480, p. 1–43, 2019.

DUCCINI, Y. et al. **High performance oilfield scale inhibitors**No. CONF-970332- NACE International Houston, TX, Estados Unidos, 1997.

FINK, J. K. **Petroleum Engineer's Guide to Oil Field Chemicals and Fluids**. Oxford: Gulf Professional Publishing, 2012.

FOX, E. M.; MENDZ, G. L. Phosphonate degradation in microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 145–150, 2006.

GALES, A. C. et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin.Infect.Dis.**, v. 32, n. 1058–4838, p. 146–155, 2001.

GALLEGO, M. et al. Influence of fluid flow in microbiological corrosion failures in oil field injector well tubing. **Engineering Failure Analysis**, v. 128, n. June, p. 105603, out. 2021.

GRANDCOIN, A.; PIEL, S.; BAURÈS, E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. **Water Research**, v. 117, p. 187–197, jun. 2017.

GREEN, M. R. et al. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2012.

HAINES, J. R. ALEXANDER, M. Microbial degradation of polyethylene (PE). **Appl. Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 1–4, 1975.

HEIDELBERG, J. F. et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 554–559, 2004.

HIMEDIA. **Bushnell Haas Broth**, 2011. Disponível em: <<http://himedialabs.com/TD/M350.pdf>>. Acesso em: 10 ago 2021.

HOLT, H. M.; GAHRN-HANSEN, B.; BRUUN, B. *Shewanella* algae and *Shewanella putrefaciens*: Clinical and microbiological characteristics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 5, p. 347–352, 2005.

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Lippincott Williams & Wilkins, 1974.882 p.

JAWORSKA, J. et al. Environmental risk assessment of phosphonates, used in domestic laundry and cleaning agents in the Netherlands. **Chemosphere**, v. 47, n. 6, p. 655–665, 2002.

JEIRANI, Z. et al. In situ prepared microemulsion-polymer flooding in enhanced oil recovery - A review. **Petroleum Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 240–251, 2014.

JIA, R. et al. Microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm under organic carbon starvation. **Corrosion Science**, v. 127, n. January, p. 1–9, 2017.

JIA, R. et al. An enhanced oil recovery polymer promoted microbial growth and accelerated microbiologically influenced corrosion against carbon steel. **Corrosion Science**, v. 139, n. April, p. 301–308, 2018.

KAMAL, M. S.; SULTAN, A. S.; HUSSEIN, I. A. Screening of amphoteric and anionic surfactants for cEOR applications using a novel approach. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 476, p. 17–23, 2015.

KAN, A. T.; FU, G.; TOMSON, M. B. Effect of methanol and ethylene glycol on sulfates and halite scale formation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 11, p. 2399–2408, 2003.

KEELER, S. J. et al. **Identification, characterization, and application of *Shewanella putrefaciens* (LH4:18), useful in microbially enhanced oil release.** Estados Unidos, 2010.

KELLAND, M. A. **Production Chemicals for the Oil and Gas Industry.** Boca Raton: CRC Press, 2009.

KEOGH, W. et al. Deposition of Inorganic Carbonate, Sulfate, and Sulfide Scales on Antifouling Surfaces in Multiphase Flow. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 11, p. 11838–11851, 2017.

KNAAK, J. B. et al. Toxicology of Mono-, Di-, and Triethanolamine. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 149, p. 1–86, 1997.

KO, S. et al. Growth inhibition and deposition prevention of sulfide scales using dispersants. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 197, n. November 2020, p. 108107, 2021.

LAKE, L. W.; SCHMIDT, R. L.; VENUTO, P. B. A niche for enhanced oil recovery in the 1990s. **Oilfield Review**, v. 4, n. 1, p. 55–61, 1992.

LAMBERT, P. A. Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. 41, p. 22–26, 2002.

LARESTANI, A. et al. Predicting formation damage of oil fields due to mineral scaling during water-flooding operations: Gradient boosting decision tree and cascade-forward back-propagation network. **Journal of Petroleum Science**

**and Engineering**, v. 208, n. PA, p. 109315, 2021.

LEITENMÜLLER, V.; RUPPRECHT, B. J. A multidisciplinary approach for chemical EOR screening: Understanding alkali-oil interaction by the use of petroleum geochemistry. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 180, n. February, p. 967–981, 2019.

LI, C.-Y. et al. The biofilm property and its relationship with high-molecular-weight polyacrylamide degradation in a water injection pipeline of Daqing oilfield. **Journal of Hazardous Materials**, v. 304, p. 388–399, mar. 2016.

LI, Z. et al. Accelerating effect of pyocyanin on microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Bioelectrochemistry**, v. 146, n. April, p. 108130, ago. 2022.

LUTTERBACH, M. T. S. et al. **Iron Sulfide Production By Shewanella Strain Isolated From Black Powder**. Nace International Corrosion Conference and Expo. **Anais...**2009

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. New Jersey: [s.n.], 2016.

MANDAL, A. Chemical flood enhanced oil recovery: a review. **International Journal of Oil, Gas and Coal Technology**, v. 9, n. 3, p. 241, 2015.

MESQUITA, P. DA L. et al. Validation of a liquid chromatography methodology for the analysis of seven volatile fatty acids intermediates of anaerobic digestion. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 295–302, 2013.

MOHSENATABAR FIROZJAIL, A.; SAGHAFI, H. R. Review on chemical enhanced oil recovery using polymer flooding: Fundamentals, experimental and numerical simulation. **Petroleum**, v. 6, n. 2, p. 115–122, jun. 2020.

MOUAFO TAMNOU, E. B. et al. Biodegradation of polyethylene by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in acidic aquatic microcosm and effect of the environmental temperature. **Environmental Challenges**, v. 3, n. February, p. 100056, abr. 2021.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008.

NAZAR, M. F.; SHAH, S. S.; KHOSA, M. A. Microemulsions in enhanced oil recovery: A review. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, n. 13, p. 1353–1365, 2011.

NOWACK, B. Environmental chemistry of phosphonates. **Water Research**, v. 37, n. 11, p. 2533–2546, 2003.

NÚÑEZ-LOPEZ, V.; MOSKAL, E. Potential of CO<sub>2</sub>-EOR for Near-Term Decarbonization. **Frontiers in Climate**, v. 1, n. September, p. 14, 2019.

NWIDEE, L. N. et al. EOR Processes, Opportunities and Technological Advancements. In: **Chemical Enhanced Oil Recovery (cEOR) - a Practical Overview**. [s.l: s.n.]. p. 3–52.

OBRADORS, N.; AGUILAR, J. Efficient biodegradation of high-molecular-weight polyethylene glycols by pure cultures of *Pseudomonas Stutzeri* Efficient Biodegradation of High-Molecular-Weight Polyethylene Glycols by Pure Cultures of *Pseudomonas stutzeri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2383–2388, 2015.

OLAJIRE, A. A. Review of ASP EOR (alkaline surfactant polymer enhanced oil recovery) technology in the petroleum industry: Prospects and challenges. **Energy**, v. 77, p. 963–982, dez. 2014.

ONOJAKE, M. C.; WAKA, T. A. Review of Oilfield Chemicals Used in Oil and Gas Industry. **Asian Journal of Physical and Chemical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 8–24, 29 abr. 2021.

PAGNIEZ, H.; BERCHE, P. Les infections à *Shewanella*, un pathogène opportuniste émergent. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 35, n. 4, p. 186–191, 2005.

PAPI, A.; SHARIFI, A.; ABDALI, M. R. Simulation of the effect of rock type on recovery plan of a mature carbonate oilfield in the Middle East–Part 2: EOR plan. **Petroleum Science and Technology**, v. 37, n. 11, p. 1260–1269, 2019.

PATTERSON, D. et al. Preproduction-deployed scale-inhibition treatments in deepwater West Africa. **SPE Production and Operations**, v. 32, n. 3, p. 333–342, 2017.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 106–116, 2017.

PERMEH, S.; LAU, K.; DUNCAN, M. Effect of crevice morphology on SRB activity and steel corrosion under marine foulers. **Bioelectrochemistry**, v. 142, p. 107922, 2021.

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

ROTT, E.; STEINMETZ, H.; METZGER, J. W. Organophosphonates: A review on environmental relevance, biodegradability and removal in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 1176–1191, 2018.

SANO, Y.; NAKASHIMA, D. Prevention of calcium carbonate scale using electrolyzed water. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 127, p. 1147–1156, 2018.

SATOMI, M. Shewanella. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 3p. 397–407.

SCHOWANEK, D.; VERSTRAETE, W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 895–903, 1990.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.

SENTHILMURUGAN, B. et al. Development of a new copolymer for oil field carbonate scale mitigation. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, n. 20, p. 2077–2085, 2011.

SHAO, B. et al. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. **Microbiological Research**, v. 200, p. 33–44, 2017.

SHENG, J. J. **Introduction to MEOR and Its Field Applications in China**. [s.l.] Elsevier, 2013.

SUNDE, E. et al. **Growth of Bacteria on Water Injection Additives**. SPE Annual Technical Conference and Exhibition. **Anais...**1990.

TAHERI-SHAKIB, J. et al. Using ultrasonic as a new approach for elimination of inorganic scales (NaCl): an experimental study. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 8, n. 2, p. 553–564, 2018.

TRIGGIA, A. A. **Fundamentos Engenharia Petróleo**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2001. 271 p. ISBN 85-7193-046-5

VEETHAHAVYA, K. S. et al. Biodegradation of Low Density Polyethylene in Aqueous Media. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 709–713, 2016.

VILORIA, A. et al. **Aloe Derives Scale Inhibitor**. United States, 2010.

WANG, Q. et al. Laboratory study on efficiency of three calcium carbonate scale inhibitors in the presence of EOR chemicals. **Petroleum**, v. 4, n. 4, p. 375–384, 2018.

WANG, Z. H.; ZHUGE, X. L. An environmentally-friendly method for removing polymer plugging in well boreholes. **Petroleum Science and Technology**, v. 32, n. 23, p. 2763–2769, 2014.

WU, T. et al. Stress corrosion of pipeline steel under disbonded coating in a SRB-containing environment. **Corrosion Science**, v. 157, n. May, p. 518–530, 2019.

YEOMANS, E. A. **Predicción Del Comportamiento De Hidratos De Gas Utilizando Simulación Molecular**. 2020. 55 f. Dissertação (Mestrado em

Simulação Molecular) - Universidad Internacional de Andalucía, Huelva, 2020.

YIN, B. et al. Targeted microbial control for hydrocarbon reservoir: Identify new biocide offerings for souring control using thermophile testing capabilities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 204–207, 2018.

YOUNES, A. A.; EL-MAGHRABI, H. H.; ALI, H. R. Novel polyacrylamide-based solid scale inhibitor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 334, p. 1–9, 2017.

ZHANG, J. et al. Investigation of inhibition properties of sophorolipids for X65 steel corrosion in simulated oilfield produced water saturated with carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 19, p. 5197–5203, 2015.

ZHANG, L. M. et al. Significantly enhanced resistance to SRB corrosion via Fe-based amorphous coating designed with high dose corrosion-resistant and antibacterial elements. **Corrosion Science**, v. 164, n. October 2019, p. 1–9, 2020.

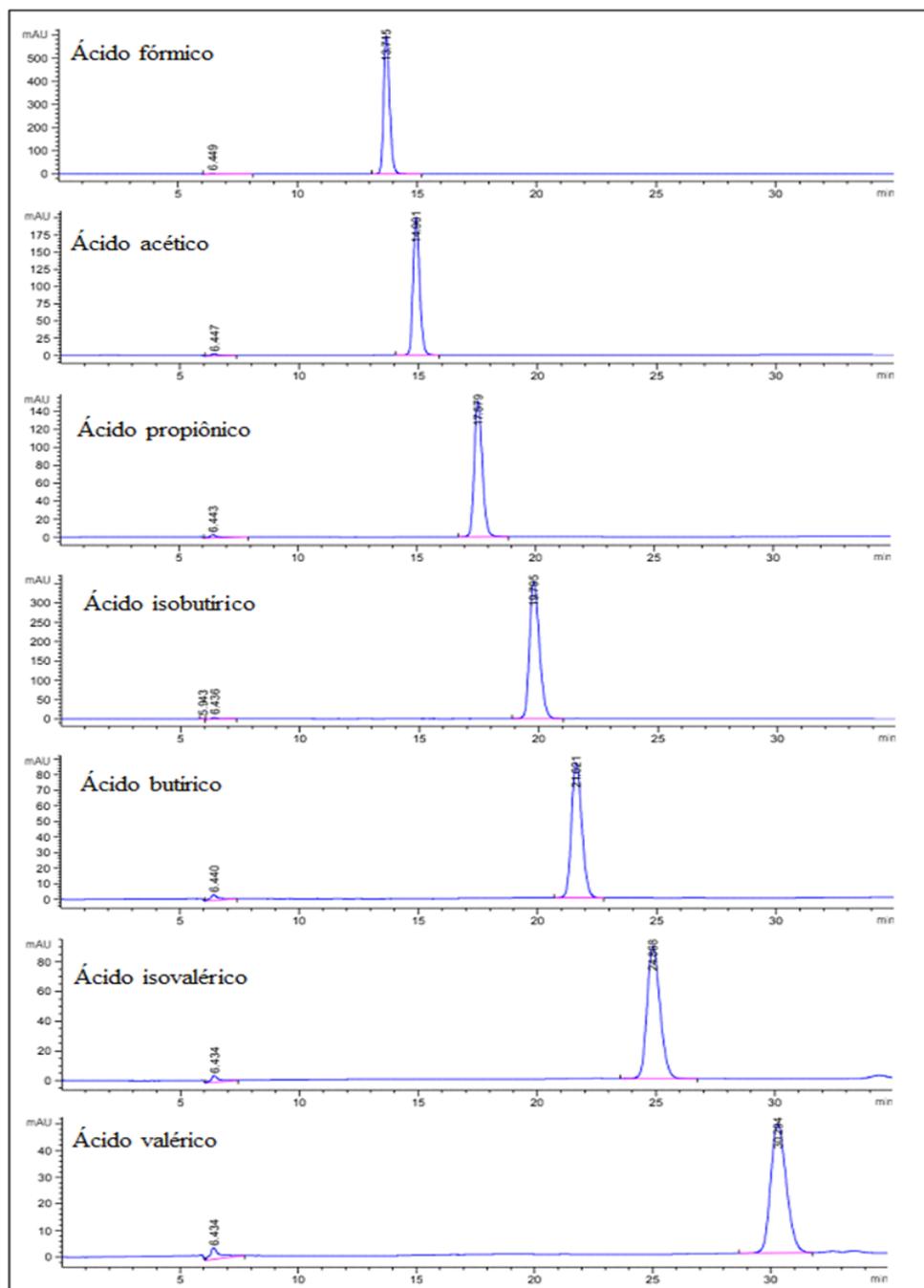
ZHANG, P. et al. Investigation of the impact of ferrous species on the performance of common oilfield scale inhibitors for mineral scale control. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 172, n. September 2018, p. 288–296, 2019.

ZHOU, E. et al. Accelerated corrosion of 2304 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 1–9, 2018.

ZHOU, J. et al. How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: Lessons from systems biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 452–466, 2011.

**APÊNDICE A - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ACCC**

Figura 50- Cromatograma dos padrões de ACCC analisados isoladamente por CLAE: Condições: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300,0 x 7,8 mm) a 5°C, eluente 0,01 mol/L de ácido sulfúrico e comprimento de onda de 210 nm. 5.9 e 6.4\*: impureza do solvente.



Fonte: O autor, 2022.

## ANEXO A – Metodologia preparo meios de cultivo

### Meios de Cultivos

#### Procedimento para preparo do meio de cultivo Bushnell-Haas e suas variações

A composição do meio Bushnell-Haas para o volume total de 1,0 L está na Tabela 15. Todos os componentes foram pesados, misturados em um Erlenmeyer e colocados sob agitação para a dissolução dos componentes. A salinidade foi ajustada para 3,5%, de acordo com a salinidade original dos cultivos bacterianos e o pH ajustado para 6,8. Por fim, a mistura foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos, à 121°C (1,1 atm).

Tabela 18 - Composição do Caldo de Bushnell-Haas

Composição	Concentração (g/L)
CaCl <sub>2</sub>	0,02
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00
NH <sub>4</sub> .NO <sub>3</sub>	1,00
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05
Glicose ou Lactato *	10,00

\*Fontes de carbono

Fonte: Adaptado de BUSHNELL; HAAS, 1940.

#### Procedimento para preparo do meio de cultivo Caldo Nutriente

A composição do meio Caldo Nutriente e as quantidades necessárias para o volume total de 1,0 L está listada na **Erro! Fonte de referência não encontrada**.16. Todos os componentes foram pesados, misturados em um Erlenmeyer e colocados sob agitação para a dissolução dos componentes. A salinidade foi ajustada para 3,5%, de acordo com a salinidade original dos

cultivos bacterianos e o pH ajustado para 6,8. Por fim, a mistura foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos, à 121°C (1,1 atm).

Tabela 19- Composição meio Caldo Nutriente

<b>Composição</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de Carne	3,00 g
Peptona	5,00 g

### **Procedimento para preparo do meio de cultivo Postgate C**

Para os testes de utilização direta dos aditivos por bactérias redutoras de sulfato (Testes preliminares de biodegradação com BRS) foi utilizado o meio Postgate C (POSTGATE, 1984).

A composição do meio e as quantidades necessárias para o volume total de 1,0 L estão listadas na Tabela 17. Todos os componentes foram pesados, misturados em um becher e colocados sob agitação e aquecimento para a dissolução dos componentes. Realizou-se a purga do oxigênio com nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>). O pH ajustado para 7,6. Por fim, a mistura foi fracionada em frascos com volume de solução de 9 mL e esterilizada em autoclave durante 15 minutos, à 121°C (1,1 atm). Todas as variações do meio Postgate C utilizadas no estudo foram preparadas de acordo com essa metodologia.

Tabela 20- - Composição do meio de cultura Postgate C.

<b>Composição</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,040 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,06 g
Lactato de sódio (50%p/v)	9,4 mL
Extrato de levedura	1,0 g
Citrato de sódio.7H <sub>2</sub> O	0,3 g

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04 g
Agar-Agar	1,9 g
Resazurina (0,025% m/v)	4,0 mL
NaCl	35 g

Fonte: Adaptado de POSTAGATE, 1984.

### Água do mar sintética

A água do mar sintética foi utilizada como solução salina adequada para o desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS). A água do mar sintética foi preparada segundo procedimento padrão adotado pela Petrobras.

A metodologia envolve o preparo separado de 5 soluções com composição descrita na Tabela 18. Em seguida, misturou-se todas elas e avolumou-se para 10 litros. Agitou-se por 20 horas e filtrou-se a 0,45µm.

Tabela 21- Composição das soluções para preparo da água do mar sintética.

<b>SOLUÇÃO 1</b>	
NaF	0,03g
SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,20g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,30g
KBr	1g
KCl	7g
Água bidestilada	1L
<b>SOLUÇÃO 2</b>	
CaCl <sub>2</sub>	11,13g
Água bidestilada	2L
<b>SOLUÇÃO 3</b>	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40g
Água bidestilada	2L

---

**SOLUÇÃO 4**

---

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	107,80g
--------------------------------------	---------

---

Água bidestilada	1L
------------------	----

---

**SOLUÇÃO 5**

---

NaCl	235,0g
------	--------

---

Água bidestilada	2L
------------------	----

---

**SOLUÇÃO 6**

---

NaSiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,20g
---------------------------------------	-------

---

Na <sub>2</sub> EDTA	0,01g
----------------------	-------

---

NaHCO <sub>3</sub>	2,00g
--------------------	-------

---

Água bidestilada	1 L
------------------	-----

---