



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola Politécnica & Escola de Química
Programa de Engenharia Ambiental

Vanessa Vólara Caminha Mota dos Santos

EFEITO DO NITRATO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO
BIOGÊNICA DE H₂S EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO

Rio de Janeiro

2018



UFRJ

Vanessa Vólaro Caminha Mota dos Santos

**EFEITO DO NITRATO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA
DE H₂S EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador (es): D.Sc. Magali Christe Cammarota

D.Sc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo

Rio de Janeiro

2018

Santos, Vanessa Vólaro Caminha Mota dos.

S237e Efeito do nitrato em função da temperatura na geração biogênica de H₂S em reservatórios de petróleo / Vanessa Vólaro Caminha Mota dos Santos. – 2018.

88 f.: 19 il. 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica e Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Magali Christe Cammarota

Coorientadora: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.

1. Exclusão biocompetitiva. 2. Nitrato. 3. Souring. 4. Bactérias redutoras de sulfato. 5. Delineamento de Doehlert. I. Cammarota, Magali Christe., orient. II. Sérvulo, Eliana Flávia Camporese, coorient. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola Politécnica e Escola de Química. IV. Título.



UFRJ

EFEITO DO NITRATO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA
DE H₂S EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO

Vanessa Vólara Caminha Mota dos Santos

Orientador (es): D.Sc. Magali Christe Cammarota

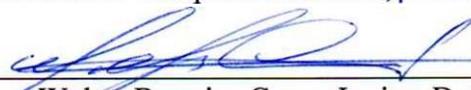
D.Sc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo

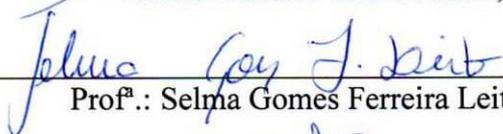
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovada pela banca:


Presidente, Prof^a.: Magali Christe Cammarota, D. Sc., UFRJ (Orientadora)


Prof^a.: Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc., UFRJ (Orientadora)


Walter Barreiro Cravo Junior, D. Sc., INT


Prof^a.: Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc., UFRJ


Prof^a.: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D. Sc., UFRJ

Rio de Janeiro

2018

Aos meus avós, Bijuca e Lourdinha, que, por mais difícil que a vida fosse, nunca desistiram de dar educação às filhas e netos. Sempre serão minha inspiração e exemplo de dignidade, honestidade e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir evoluir e me tornar uma pessoa melhor a cada dia e por saber que nunca estou só.

A minha mãe guerreira, Sandra, por sempre me incentivar, por sempre acompanhar os meus estudos... pelo amor, carinho e dedicação incondicionais e constantes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Carlos Henrique, por ser minha fonte de inspiração. Por me incentivar, torcer e vibrar com cada conquista minha.

Ao meu pai, Antônio Carlos, por sempre torcer e vibrar por mim!

Ao meu parceiro nesta vida e grande amor, Marcio. Por ser mais que marido, ser meu melhor amigo. Por estar do meu lado, por enxugar minhas lágrimas, por sorrir junto comigo. Obrigada pelo amor, pelo carinho e pelo cuidado comigo. Obrigada pelo seu entusiasmo e pela sua alegria de viver!

A minha orientadora Prof^ª Magali... por aceitar esse desafio! Obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela troca... por tudo!

A minha amável orientadora, Prof^ª Eliana... obrigada pelo carinho, pela amizade... por tratar seus alunos como se fossem filhos! Minha gratidão eterna pela sua disposição e dedicação!

A querida Prof^ª Paula Fernandes, pela amizade, paciência e carinho. Por todo o ensinamento e apoio no planejamento experimental deste trabalho.

À Gina Vazquez e Ronalt Vital, por me permitirem realizar esse grande sonho, pelo incentivo e por todo carinho ao longo deste processo.

À Dani Altomari, por sempre me incentivar a continuar estudando e por ter me apoiado por grande parte do mestrado! Você é inspiração e exemplo de dedicação!

À Maíra, por ser uma amiga querida que me cobra, me orienta e me incentiva a todo momento, minha eterna gratidão!

À Claudinha Groposo, pela amizade, pela torcida e pelas cobranças! Obrigada por me ajudar na correção deste trabalho. Você é incrível!

A todos os meus amigos queridos do meu eterno grupo de Biocorrosão e Acidulação Biogênica da Petrobras/CENPES: Claudinha Ribeiro, Rubens Akamine, Vinicius Waldow e Henrique Allan, obrigada pela parceria, dedicação e compreensão. Sou eternamente grata a vocês!

Aos meus amigos e equipe de laboratório: Léo, Renatinho, Miltinho, Amandinha, Ronaldo Uillian, Adalbérico e Yuri... minha eterna gratidão! Sem vocês, isso seria impossível! Vocês são os melhores! Muitas saudades da nossa equipe!

Ao amigo Luiz Fernando, pela atenção, pelo carinho, pela orientação, pela torcida! Suas palavras acalentavam meu coração quando a ansiedade insistia em bater.

Ao amigo Alexandre Guedes, minha referência em *souring*! Obrigada pelo carinho, pela presença sempre incentivadora e construtiva e por se prontificar em corrigir esta dissertação.

À Gerência de Química da Petrobras/CENPES, em especial à Sueli Apati, obrigada pela atenção, por todas as dúvidas esclarecidas e, claro, pelas análises químicas.

Às meninas do CENPES/AER: Melissa, Camila, Dayane e Vanessa... pela parceria, pela competência e pelo carinho! Vocês são feras mesmo! Saudades!

Aos meus amigos-irmãos Laura, Clara, Elisa, Carol e André... Obrigada pelo carinho, vocês são pra vida toda!

Aos amigos do PEA 2015.1, obrigada pela torcida, pelo carinho e incentivo. Estamos remando juntos neste barco!

Aos meus novos amigos da COPPE/LIF... está sendo incrível aprender com vocês!

A todas as pessoas que, porventura, não tenham sido aqui citadas e que tenham contribuído de alguma forma para a concretização deste trabalho, minha eterna gratidão!

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

SANTOS, Vanessa Vólara Caminha Mota dos. **Efeito do nitrato em função da temperatura na geração biogênica de H₂S em reservatórios de petróleo.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Problemas ocasionados pelo *souring* em reservatórios de petróleo têm incentivado a busca por medidas de controle e mitigação da geração biogênica de H₂S para melhorar a qualidade do óleo produzido e, conseqüentemente, à diminuição dos custos de produção. A adição de nitrato no sistema de injeção de água tem sido considerada uma maneira efetiva de controle do *souring* em reservatórios. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de injeção de nitrato em reservatórios de petróleo em função da temperatura como estratégia para o controle da biogênese de H₂S. Os experimentos foram conduzidos no laboratório em frascos âmbar hermeticamente fechados, de 250 mL de capacidade, sem agitação, meio de contato que simulava a composição da fase água em um reservatório de petróleo que já recebe o nitrato como tratamento para o controle do *souring* e 10% de inóculo oriundo do mesmo reservatório. Com a adoção do delineamento experimental de Doehlert, foi avaliado o efeito de cinco concentrações de nitrato (30, 50, 70, 90 e 110 mg/L) e 3 temperaturas (30, 55 e 80 °C). Foi observada uma tendência a redução da geração de H₂S a 30 °C nas diferentes concentrações de nitrato testadas. No entanto, houve inibição do metabolismo do sulfato estimulada pela presença do nitrato, em concentrações a partir de 70 mg/L para temperaturas de 55 e 80 °C. As reduções da biogênese de H₂S foram mais significativas na dosagem de 110 mg/L de nitrato.

Palavras-chave: exclusão biocompetitiva, nitrato, *souring*, bactérias redutoras de sulfato, Delineamento de Doehlert

ABSTRACT

SANTOS, Vanessa Vólara Caminha Mota dos. **Effect of nitrate in function of temperature on the biogenic generation of H₂S in oil reservoirs**. Rio de Janeiro, 2018. Thesis (Master's Degree) – Environmental Engineering Program, Polytechnic School and Chemistry School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Problems caused by souring in oil reservoirs have encouraged the search for control and mitigation measures over biogenic generation of H₂S to improve the quality of the oil produced and, consequently, to reduce production costs. The addition of nitrate in the water injection system has been considered an effective way to control the souring in reservoirs. The present work had as goal to evaluate the effectiveness of the injection of nitrate in oil reservoirs due the temperature as a strategy for the control of H₂S biogenesis. The experiments were conducted at laboratory using hermetically sealed amber bottles of 250 mL capacity, without agitation, a contact media that simulated the composition of the water phase in an oil reservoir that already receives the nitrate as a treatment for souring control and 10 % of inoculum from the same reservoir. The effect of five nitrate concentrations (30, 50, 70, 90 and 110 mg/L) and 3 temperatures (30, 55 and 80 °C) were evaluated with the adoption of the Doehlert experimental design. A tendency to reduce H₂S generation at 30 ° C was observed at the different nitrate concentrations tested. However, there was inhibition of sulfate metabolism stimulated by the presence of nitrate, in concentrations from 70 mg/L to temperatures of 55 and 80 °C. Reductions in H₂S biogenesis were more significant at the dose of 110 mg/L nitrate.

Keywords: biocompetitive exclusion, nitrate, souring, sulfate-reducing bacteria, Doehlert design

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) onde o carbono orgânico é o doador de elétrons na redução dos íons sulfato (VIDELA, 2003).....	27
Figura 2: Rotas assimilativa e dissimilativa do nitrato. Adaptado de (MADIGAN et al., 2016).	30
Figura 3: Impacto do nitrato ou nitrito na atividade das BRS. (a) as BRNorg competem diretamente com as BRS pelos compostos orgânicos (doadores de elétrons) resultando na exclusão biocompetitiva das BRS. (b) O H ₂ S produzido pelas BRS pode ser usado pelas BRN-OS como doador de elétrons durante a redução do nitrato. Adaptado de HUBERT; VOORDOUW; MAYER (2009).	33
Figura 4: Planejamento de Doehlert e o aproveitamento de pontos experimentais (hexágono tracejado) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).	36
Figura 5: Frascos hermeticamente fechados utilizados no experimento.	38
Figura 6: Esquema de cultivo e adaptação dos inóculos utilizados no ensaio.	40
Figura 7: Gel de agarose (1%) mostrando a presença de algumas populações bacterianas em diferentes temperaturas. Resultados obtidos a partir da amplificação do gene <i>rrs</i> (iniciadores específicos para <i>Bacteria</i>) pela técnica de <i>PCR</i>	51
Figura 8: Gel de agarose (1%) para mostrando a presença de arqueias em diferentes temperaturas. Resultados obtidos a partir da amplificação do gene <i>rrs</i> (iniciadores específicos para <i>Archaea</i>) pela técnica de <i>PCR</i>	52
Figura 9: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para as BRS.....	55
Figura 10: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para as BRNorg.....	55
Figura 11: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para as BRN-OS.....	56
Figura 12: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para a geração de Sulfeto Total.....	58
Figura 13: Quantificação da concentração de nitrato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).	60
Figura 14: Concentração de nitrato em mg/L no ensaio abiótico.....	61
Figura 15: Concentração de nitrito (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).....	63
Figura 16: Concentração de acetato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).....	67
Figura 17: Concentração de propionato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).....	68
Figura 18: Concentração de butirato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).....	69

Figura 19: Gráficos de superfície de resposta para quantificação do teor de Sulfeto Total (mg/L) gerado em função da concentração de Nitrato (mg/L) e da Temperatura (°C)..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz do delineamento de Doehlert com os valores reais e codificados das duas variáveis, com duas réplicas no ponto central.	37
Tabela 2: Composição do meio de cultura de contato.....	41
Tabela 3: Composição da solução de elementos traços (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993).	41
Tabela 4: Composição do Meio Postgate E Modificado para BRS (POSTGATE, 1984).....	42
Tabela 5: Composição da Solução 1 do meio CAPCIS Modificado (COCHRANE et al., 1988).	43
Tabela 6: Composição da Solução 2 do meio CAPCIS Modificado (COCHRANE et al., 1988).	44
Tabela 7: Composição da Solução 3 do meio CAPCIS Modificado (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993).	44
Tabela 8: Composição do caldo nitrato empregado no cultivo de bactérias redutoras de nitrato organotróficas.	45
Tabela 9: Composição do meio de cultura para BRN-OS (DAVIDOVA et al., 2001).....	45
Tabela 10: Composição Química da Solução de elementos-traço usada no meio de cultura para BRN-OS Adaptado de (WOLIN; WOLIN; WOLFE, 1963).....	46
Tabela 11: Composição da solução Reagente A para teste de redução de nitrato.....	46
Tabela 12: Composição da solução Reagente B para teste de redução de nitrato.....	46
Tabela 13: Metodologia empregada na determinação dos ânions nitrito, nitrato e ácidos carboxílicos de cadeia curta.....	48
Tabela 14: Quantificação em massa de DNA Total (ng/μL).....	50
Tabela 15: Volume em mililitro (mL) dos inóculos utilizados no ensaio.	52
Tabela 16: Resultados de BRS (mesofílicas e termofílicas) expressos em NMP/mL em diferentes condições experimentais.....	53
Tabela 17: Resultados de BRNorg (mesofílicas e termofílicas) expressos em NMP/mL em diferentes condições experimentais.....	54
Tabela 18: Resultados de BRN-OS (mesofílicas e termofílicas) expressos em NMP/mL em diferentes condições experimentais.....	54
Tabela 19: Resultados de quantificação do teor de sulfeto total gerado (mg/L) nos 5 tempos avaliados no planejamento experimental, pela técnica da titulação potenciométrica.	58
Tabela 20: Concentração de nitrato (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental.....	59
Tabela 21: Concentrações de nitrato (mg/L) determinadas para ensaios abióticos em diferentes temperaturas e tempos.	61
Tabela 22: Concentração de nitrito (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental.....	62

Tabela 23: Concentrações de nitrito (mg/L) determinadas para ensaios abióticos em diferentes temperaturas e concentrações de nitrato.	64
Tabela 24: Resultados da quantificação dos genes <i>rrs</i> e <i>dsr</i> , pela técnica de <i>qPCR</i> , para estimativa da concentração de BRS e bactérias totais no meio de contato após 1, 7 e 28 dias de ensaio.	65
Tabela 25: Concentração de acetato residual (mg/L) em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental.	66
Tabela 26: Concentração de propionato residual (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental.	68
Tabela 27: Concentração de butirato residual (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental.	69
Tabela 28: Coeficientes para a resposta Sulfeto total.	84
Tabela 29: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 1 dia.	85
Tabela 30: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 3 dias.	85
Tabela 31: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 7 dias.	86
Tabela 32: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 14 dias.	86
Tabela 33: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 28 dias.	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGV – Ácido graxo volátil

BRNorg – Bactérias redutoras de nitrato organotróficas

BRN-OS – Bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

DGGE – Denaturing gradient gel electrophoresis

DNA – Deoxyribonucleic acid

H₂S – Sulfeto de hidrogênio, gás sulfídrico

NMP – Número mais provável

PCR – Polymerase chain reaction

PRS – Procarioto redutor de sulfato

qPCR – Quantitative polymerase chain reaction

RNA – Ribonucleic acid

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	Recuperação de petróleo	22
3.2	Geração biogênica de H ₂ S (<i>souring</i>) em reservatórios de petróleo	23
3.3	Mitigação de <i>souring</i> biogênico.....	24
3.3.1	Procariotos redutores de sulfato (PRS).....	25
3.3.2	Microrganismos redutores de nitrato	29
3.4	Exclusão biocompetitiva e mecanismos de ação do nitrato.....	31
3.5	Técnicas moleculares como ferramenta para o monitoramento microbiológico	34
3.6	Planejamento Experimental	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Sistema experimental	38
4.2	Inóculos.....	39
4.3	Meios de cultura e soluções	40
4.3.1	Meio de cultura de contato	40
4.3.2	Meio de cultura para bactérias redutoras de sulfato mesofílicas (m-BRS)	42
4.3.3	Meio de cultura para bactérias redutoras de sulfato termofílicas (t-BRS)	42
4.3.4	Meio de cultura para bactérias redutoras de nitrato organotróficas (BRNorg) ..	44
4.3.5	Meio de cultura para bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto (BRN-OS)	45
4.3.6	Soluções empregadas na reação de diazotação.....	46
4.4	Análises Químicas	47
4.4.1	Determinação do teor de sulfeto gerado	47
4.4.2	Sais de ácidos orgânicos de cadeia curta, nitrato e nitrito	47
4.4.3	Análises moleculares	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Quantificação da massa de <i>DNA</i> total das culturas microbianas (BRS, BRNorg e BRN-OS) para padronização do inóculo.....	50
5.2	Crescimento microbiano através da quantificação pelo NMP	53
5.2.1	BRS, BRNorg e BRN-OS.....	53
5.3	Sulfeto Total.....	57

5.4	Nitrato	59
5.5	Nitrito.....	62
5.6	Análises moleculares – <i>qPCR</i>	64
5.7	Concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta.....	66
5.8	Análise estatística da resposta Sulfeto Total.....	70
6	CONCLUSÕES.....	73
7	SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	APÊNDICE A – Coeficientes das respostas estudadas e modelos gerados	84
	APÊNDICE B – Matrizes de previsões da análise estatística dos resultados e modelos matemáticos.....	85

1 INTRODUÇÃO

A produção de petróleo em campos *offshore* (marítimos) emprega a injeção de água do mar, muitas vezes desde o início da vida produtiva do reservatório, por conta da disponibilidade deste recurso, com o intuito de promover o deslocamento do óleo para fora dos poros da rocha e impulsioná-lo para a superfície e, deste modo, alcançar sua máxima recuperação. Contudo, se por um lado a injeção de água é uma estratégia comumente utilizada na indústria do petróleo para maximizar o fator de recuperação de seus campos petrolíferos, bem como garantir um aproveitamento eficaz e econômico das reservas (MUGGERIDGE et al., 2013), por outro lado, o conteúdo de íons sulfato na água do mar, acima de 25 mM (CUHEL; TAYLOR; JANNASCH, 1981), pode resultar em diferentes problemas devido à atividade de microrganismos presentes tanto na água do mar quanto no reservatório de petróleo. Diferentes seres procariontes como bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias organotróficas fermentativas, e bactérias e arqueias metanogênicas têm sido frequentemente isoladas de comunidades microbianas em reservatórios de petróleo (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000; REN et al., 2011), e também de água do mar (HOFFMANN; SPARK, 2012; WEINBAUER; WENDEROTH, 2002). A injeção de água do mar nos reservatórios ainda leva à redução da salinidade e da temperatura da água de formação, o que pode contribuir para o crescimento microbiano (EVANS; DUNSMORE, 2006).

Os procariontes redutores de sulfato (PRS) representam um grupo diversificado e ecologicamente interativo de organismos procariontes que, em comum, obtêm energia a partir da respiração anaeróbica utilizando sulfato comoceptor final de elétrons, com geração de sulfeto de hidrogênio como principal produto final (ODOM; SINGLETON, 1993). Também diferem quanto às propriedades metabólicas, o que permite que a redução biológica de íons sulfato ocorra em diversas condições ambientais a partir de distintas fontes de carbono. No caso dos reservatórios de petróleo, há fontes de carbono capazes de sustentar um favorável desenvolvimento de BRS. Portanto, o aporte de sulfato pela injeção de água do mar em reservatórios favorece a atividade das BRS e, por conseguinte, a geração de sulfeto. O aumento da massa de sulfeto de hidrogênio (H₂S) por unidade de massa total de fluidos produzidos devido à atividade de BRS é um fenômeno denominado acidulação biogênica, ou, em inglês, *souring* (TANJI et al., 2014). Segundo FARQUHAR (1998), a acidulação de reservatórios de petróleo pode se dar por fatores diversos, mas é principalmente devida à fatores bióticos.

A acidulação biogênica de reservatórios causada pela injeção de água de mar é um dos principais problemas ambientais e econômicos associados à produção de petróleo. Isto porque

o H₂S é um gás extremamente tóxico, reativo e corrosivo, que causa impactos tanto na qualidade do óleo gerado, quanto no meio ambiente e na integridade estrutural dos poços (como por exemplo, a obstrução de poços) e, ainda, por questões de segurança ocupacional (MOHAN et al., 2005; XUE; VOORDOUW, 2015). Sendo assim, o controle do crescimento microbiano, em especial do grupo dos PRS, bem como o controle da geração do H₂S, é de grande importância para a indústria do petróleo.

Existem diferentes estratégias para prevenção ou controle da geração biogênica de H₂S, podendo-se citar: dessulfatação da água do mar antes da injeção, supressão dos PRS pelo emprego de biocidas ou inibidores metabólicos tais como nitrito e molibdato, ou adição de nitrato à água do mar injetada, que é denominada “água de injeção” (TANJI et al., 2014). Comparativamente, a injeção de nitrato em poços é economicamente mais vantajosa e, em relação aos biocidas, é menos agressiva ao ambiente, além de ser altamente solúvel em água e compatível com outros produtos químicos. Em consequência, a injeção de nitrato tem sido praticado por empresas petrolíferas, principalmente para recuperação de petróleo em reservatórios maduros (KUMARASWAMY et al., 2011; SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO, 2010).

O controle do *souring* por injeção de nitrato tem sido extensivamente estudado em condições laboratoriais (CALLBECK; AGRAWAL; VOORDOUW, 2013; GRIGORYAN et al., 2008) e em campo (BØDTKER et al., 2009; VOORDOUW et al., 2009). Seu mecanismo envolve a tecnologia de exclusão biocompetitiva de PRS por bactérias heterotróficas redutoras de nitrato (BRN) (HUBERT; VOORDOUW, 2007; THORSTENSON et al., 2002), a inibição de PRS por nitrito como consequência da redução de nitrato (MYHR et al., 2002; O'REILLY; COLLERAN, 2005) e a oxidação direta do sulfeto com nitrato por BRN oxidantes de enxofre (GREENE et al., 2003; HUBERT et al., 2003).

A tecnologia de exclusão biocompetitiva compromete o desenvolvimento dos PRS pelo estabelecimento de condições favoráveis ao crescimento de bactérias redutoras de nitrato (BRN). As BRN, similarmente os PRS, compreendem espécies bacterianas bastante diversas metabolicamente, normalmente anaeróbias facultativas, capazes de gerar a energia necessária para suas funções vitais também pela respiração anaeróbica utilizando íon nitrato comoceptor de elétrons. Como as duas populações disputam os mesmos recursos nutricionais (HUBERT; VOORDOUW, 2007) com maior ganho energético para as BRN, o seu crescimento é estimulado, enquanto os PRS são inibidas.

Algumas espécies de BRN apresentam a capacidade de obter energia pela oxidação do sulfeto, ditas bactérias redutoras de nitrato oxidantes de enxofre (BRN-OS) e, desta forma,

tendem a diminuir a concentração de H₂S no meio (HUBERT; VOORDOUW, 2007). Contudo, algumas espécies de PRS são também capazes de utilizar o nitrato comoceptor final de elétrons. Logo, a injeção de nitrato promoverá o controle da biogênese de H₂S através da estimulação de espécies de PRS que alteram seu metabolismo para o consumo do nitrato, deixando de consumir o sulfato e, conseqüentemente, de produzir sulfeto de hidrogênio (HUBERT; VOORDOUW, 2007). No entanto, se houver interrupção da injeção de nitrato, os PRS voltarão a crescer às custas de sulfato, elevando novamente o teor de sulfeto (DINNING et al., 2005).

Segundo VOORDOUW et al.(2009), a aplicação de nitrato é bem sucedida quando a temperatura do reservatório de petróleo é alta (50–70 °C), sendo mais difícil o controle da biogênese de sulfeto em temperaturas menos elevadas (abaixo de 50 °C). Estes autores propõem que os PRS continuarão a produzir sulfeto com o excesso de sulfato, como o encontrado em um campo de petróleo, e uma temperatura favorável em zonas mais profundas. Portanto, o controle de *souring* com nitrato em reservatórios pode ser transitório em temperaturas menos elevadas.

Poucas plataformas de produção de petróleo no Brasil utilizam o nitrato para a mitigação da geração biogênica de H₂S. Contudo, tais plataformas tiveram o início da sua injeção já há alguns anos, ao longo dos quais estão sendo monitoradas e avaliadas em escala real, quanto ao potencial efeito da injeção do nitrato na mitigação da geração biogênica de H₂S frente ao modelo de previsão inicial desses reservatórios (CARDOSO, 2017).

De modo geral, em aplicações de campo, indicam-se concentrações na ordem de 100 mg/L de nitrato nos primeiros meses e posteriormente, concentrações na ordem de 50 mg/L de modo contínuo. Já estudos laboratoriais, como o de SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO (2010), em sua maioria, utilizam culturas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e amostras de água de produção de reservatórios de interesse, mas estes reservatórios não possuem a influência do nitrato. Além disso, sabe-se que as concentrações de nitrato injetadas em condições normais de campo podem sofrer variações ao longo do tempo em função de diferentes razões operacionais e de logística.

Nesse contexto, visando obter, já com maior representatividade de um cenário atual, resultados relativos à eficácia da injeção de nitrato para controle do *souring* biogênico em reservatórios de águas profundas, foram planejados experimentos laboratoriais para avaliar a influência da temperatura no efeito do nitrato na geração de H₂S a partir de culturas microbianas obtidas previamente de reservatórios com injeção de nitrato. Para tal estudo, definiu-se um delineamento experimental para avaliação estatística e otimização dos ensaios garantindo a obtenção de resultados mais confiáveis e representativos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da interação da temperatura no efeito da aplicação de nitrato no controle da geração biogênica de H₂S em sistema estático de modo a gerar dados para subsidiar a adoção de estratégias de injeção em reservatórios de petróleo.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter consórcios microbianos de BRS (bactérias redutoras de sulfato), BRNorg (bactérias redutoras de nitrato organotróficas) e BRN-OS (bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto), mesofílicas e termofílicas, a partir de sub-cultivos em meios específicos de amostra de fluido de produção de reservatório de águas profundas com temperaturas em torno de 65 a 80 °C e com histórico de injeção de nitrato;
- Avaliar o perfil do crescimento microbiano dos grupos de BRS, BRNorg e BRN-OS, mesofílicas e termofílicas, através da quantificação pela técnica do número mais provável (NMP) nas diferentes condições definidas pelo delineamento experimental: concentrações de nitrato (30, 50, 70, 90 e 110 mg/L) em distintas temperaturas (30, 55 e 80 °C) para os tempos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias;
- Avaliar o perfil da geração de sulfeto total nas diferentes condições definidas pelo delineamento experimental;
- Avaliar o perfil do consumo/produção de sais de ácidos orgânicos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), nitrato e nitrito nas diferentes condições definidas pelo delineamento experimental;
- Avaliar perfil do crescimento microbiano de bactérias redutoras de sulfato e bactérias totais através da técnica molecular de *qPCR* (*quantitative polymerase chain reaction*) nas diferentes condições definidas pelo delineamento experimental para os tempos de 1, 7 e 28 dias;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de nitrato (30, 50, 70, 90 e 110 mg/L) em distintas temperaturas (30, 55 e 80 °C), definidas pelo delineamento experimental, tendo como variável de resposta a quantificação de sulfeto total para os tempos de 1, 3, 7, 14

e 28 dias, gerando dados para ajuste de modelos de previsão de *souring* em reservatórios.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Recuperação de petróleo

A energia natural de um reservatório para a produção de petróleo é pouco eficiente e por consequência retêm grandes quantidades de hidrocarbonetos após sua exaustão, assim sendo necessário o emprego de uma série de processos visando a obtenção de uma recuperação adicional. Esses processos são chamados de métodos de recuperação e, de uma maneira geral, interferem nas características do reservatório que favorecem a retenção do óleo. Os métodos de recuperação de um reservatório de petróleo são compostos de etapas ao longo de sua vida produtiva, que cronologicamente, são chamadas de recuperação primária, recuperação secundária (também chamadas de métodos convencionais de recuperação), e a recuperação terciária, também chamada de métodos especiais de recuperação (TRIGGIA et al., 2004).

A recuperação primária é a produção de óleo resultante da atuação da energia natural do reservatório. A recuperação secundária são métodos mecânicos aplicados através da injeção de água ou gás com o único intuito de deslocar o óleo para fora dos poros da rocha. Nestes processos convencionais, a água utilizada para injeção pode ter quatro diferentes origens: água subterrânea (coletada de mananciais por meio de poços perfurados), água de superfície (rios e lagos), água do mar e água produzida (água que sai junto com o óleo na produção). Já o gás natural injetado, pode ser o próprio gás que é produzido com o óleo ou após ser processado. Este gás é injetado através de compressores que fornecem a pressão e a vazão necessária para o processo de recuperação (TRIGGIA et al., 2004).

A recuperação terciária ou métodos especiais são empregados para atuar onde o método convencional não obteve sucesso. São eles: métodos térmicos, métodos miscíveis, métodos químicos, entre outros. O método térmico é onde o calor é gerado na superfície e logo depois transportado para o interior da formação (utiliza-se a água como fluido aquecido, normalmente em forma de vapor) ou a partir da combustão de parte do óleo existente no reservatório, o calor é gerado, chamado de combustão in situ. Ambos os métodos térmicos têm o objetivo de diminuir a viscosidade do óleo substancialmente. Os métodos miscíveis são métodos que injetam fluidos que se misturam com o óleo assim eliminando as tensões interfaciais. Desse modo, o óleo é deslocado aumentando seu fator de recuperação. Para tal fim pode-se empregar o dióxido de carbono, o gás natural e o nitrogênio. Nos métodos químicos emprega-se um fluido injetado promovendo uma interação química com o fluido do reservatório, como por exemplo a injeção de algumas soluções de polímeros, tensoativos, soluções alcalinas e de microemulsão.

Alguns destes processos também podem ser enquadrados como métodos miscíveis. Outros métodos que não se enquadram nestes métodos citados anteriormente são a recuperação microbiológica (MEOR) que é obtida a partir do emprego de microrganismos que, através do seu metabolismo, produzem substâncias que causam uma série de efeitos no reservatório e, além deste método, o uso de ondas eletromagnéticas obtidas a partir de uma diferença de potencial entre os poços do campo (TRIGGIA et al., 2004).

O *souring* ocorre principalmente durante o processo de recuperação secundária, onde a injeção de água do mar, que é rica em íons sulfato, fornece compostos para o desenvolvimento de microrganismos envolvidos na produção do gás ácido sulfídrico, processo este que será descrito a seguir.

3.2 Geração biogênica de H₂S (*souring*) em reservatórios de petróleo

A geração biogênica de ácido sulfídrico (H₂S) em reservatórios de petróleo, também conhecida como *souring*, é decorrente, em sua maioria, da ação de microrganismos procariotos redutores de sulfato (PRS) (KASTER et al., 2007). Por outro lado, alguns reservatórios são acidificados devido a mecanismos que incluem a decomposição térmica dos hidrocarbonetos contendo enxofre (S), à dissolução da pirita ou à redução termoquímica do sulfato. Estes mecanismos são influenciados pela natureza da rocha-reservatório, composição do óleo e maturidade térmica, altas temperaturas e aquatermólise em operações de recuperação térmica (FRAZER; BOLLING, 1991; HOLUBNYAK et al., 2011; KHATIB; SALANITRO, 1997; SETO; BELIVEAU, 2000; SONG et al., 2009).

O *souring* biogênico é difundido em toda a indústria do petróleo e ocorre tanto em operações de produção em campos terrestres (*onshore*) quanto em campos marítimos (*offshore*), tanto em reservatórios, quanto nas instalações de superfície (*topside*), em condições ambientais variadas de disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura, entre outras (GIEG; JACK; FOGHT, 2011). Por exemplo, em função do pH, o sulfeto pode se apresentar na fase aquosa em formas distintas: em valores de pH entre 6,0 a 9,0 uma mistura de H₂S e HS⁻ coexistem, aumentando a proporção de HS⁻ com o aumento do pH; para valores de pH acima de 8,5 tem-se a dissociação de HS⁻ em S²⁻, a qual passa a predominar em valores de pH acima de 10 (BASTOS, 2006). A forma não dissociada (H₂S) é a de maior toxicidade, uma vez que a ausência de carga permite a difusão passiva do gás através da membrana celular para o citoplasma, onde pode reagir com componentes celulares, causando sua inativação (MOHAN et al., 2005; WEIJMA et al., 2002).

Os procariotos redutores de sulfato (PRS) podem existir indigenamente em reservatórios de petróleo ou podem ser introduzidos durante o desenvolvimento da produção do reservatório de petróleo (por exemplo, através de operações de perfuração) ou predominantemente durante a fase de produção de óleo, pela injeção de água, sobretudo água do mar ou água de produção. A injeção de água é uma estratégia de recuperação, denominada recuperação secundária, realizada para manter a pressão do reservatório e “varrer” o óleo para os poços de produção, prolongando a produção de um campo petrolífero (GIEG; JACK; FOGHT, 2011). Ainda de acordo com GIEG; JACK; FOGHT (2011), o tipo de água e a operação de produção podem fornecer múltiplos componentes, tais como sulfato, fontes de carbono e populações microbianas que levem à geração de sulfeto. Por isso, o controle do *souring* pode ser alcançado pela adoção de estratégias que induzam à repressão das populações microbianas potenciais causadores de *souring*. Para tal, pode-se recorrer à aplicação de biocidas, que podem atuar de forma não específica sobre a comunidade microbiana presente, ou à injeção de nitrato (e/ou nitrito) que afeta especificamente os PRS por mecanismos competitivos ou inibitórios.

3.3 Mitigação de *souring* biogênico

Os problemas ocasionados pelo *souring* em reservatórios de petróleo têm incentivado à busca por medidas de mitigação, já que a redução da produção de H₂S garante a execução segura de atividades operacionais e qualidade adequada para movimentação do óleo produzido com menores custos de produção. Para o controle do *souring*, existem algumas medidas preventivas como, por exemplo, a remoção do sulfato da água de injeção, a supressão de microrganismos redutores de sulfato pelo uso de biocidas ou inibidores do metabolismo, tais como o nitrito e o molibdato, e a adição de nitrato na água de injeção (TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009; TANJI et al., 2014).

A eliminação do sulfato da água de injeção, em plataformas *offshore* de exploração, é realizada em unidades removedoras de sulfato (URS), com membranas de nanofiltração em um ou dois estágios. Este tratamento permite a retenção de íons sulfato da água do mar enquanto outros íons permeiam, podendo reduzir as concentrações de sulfato de cerca de 3000 mg/L para menos de 40 mg/L (MACKAY et al., 2005). Embora este tratamento seja necessário e eficiente, a sua implementação deve ser bem planejada já que possui custo elevado e requer um grande espaço físico nas plataformas devido ao grande volume de água a ser tratado (ALVES, 2006). A remoção de sulfato de água de injeção também pode ser feita com o uso de membranas de

osmose reversa, que apesar de também ter um custo elevado, permite uma retirada mais seletiva de íons sulfato (SILVA et al., 2015).

Os biocidas, a despeito de muitas vezes serem utilizados no controle do *souring*, não são apropriados no combate aos PRS presentes nos reservatórios, devido sua ação tóxica e corrosiva (TANG; BASKARAN; NEMATI, 2009); baixa estabilidade térmica, adsorção e raio de ação no reservatório; necessidade de altas doses; e baixa eficácia contra algumas populações microbianas, dentre outras. Os testes de laboratório não conseguem reproduzir de fato as comunidades microbianas predominantes no reservatório. Além disso, algumas populações microbianas são tipicamente produtoras de exopolissacarídeos, favorecendo a formação de biofilmes, cuja matriz atua como proteção contra a ação dos biocidas, selecionando populações microbianas mais resistentes aos produtos biocidas. Ademais, alguns componentes químicos do reservatório podem reagir com o biocida, diminuindo assim, sua eficácia (REINSEL et al., 1996).

Devido à ineficiência e aos altos custos envolvidos na aplicação e implantação das tecnologias citadas acima, a busca por outras tecnologias para controle do *souring*, como o uso do nitrato e nitrito se intensificou nos últimos anos. Em linhas gerais, a incorporação da injeção de nitrato ou nitrito no sistema de injeção de água durante o processo de recuperação secundária de petróleo tem o objetivo de estimular as bactérias redutoras de nitrato ou nitrito que, por exclusão biocompetitiva, levam à redução das populações de microrganismos redutores de sulfato, indicando que esta pode ser uma maneira mais efetiva de controle do *souring* biogênico em reservatórios (HUBERT et al., 2005; HUBERT; VOORDOUW; MAYER, 2009).

3.3.1 Procariotos redutores de sulfato (PRS)

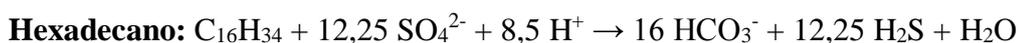
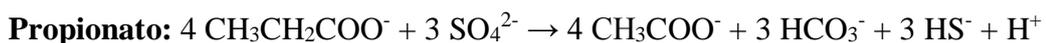
No ciclo do enxofre verifica-se a presença de microrganismos que são capazes de realizar a redução do sulfato por duas vias metabólicas: a assimilativa e a dissimilativa. A redução assimilativa do sulfato acontece em condições aeróbicas ou anaeróbicas, para incorporação do sulfeto em moléculas orgânicas, tais como aminoácidos (cisteína) e vitaminas (biotina, tiamina e ácido pantotênico), que são constituintes essenciais de proteínas e coenzimas, respectivamente (MADIGAN et al., 2016). Já a dissimilativa acontece quando o sulfato atua como acceptor final de elétrons na respiração anaeróbica, produzindo H_2S que é liberado para o ambiente (VIDELA, 2003).

Os microrganismos redutores de sulfato apresentam a capacidade de realizar o metabolismo dissimilativo, além do assimilativo. Este metabolismo é identificado em quatro

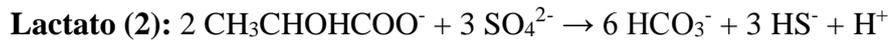
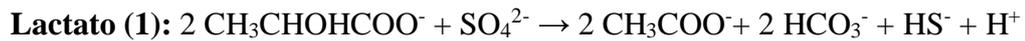
diferentes filos do domínio Bacteria (Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospira e Thermodesulfobacterium), denominadas bactérias redutoras de sulfato (BRS), bem como nos filos Euryarchaeota e Crenarchaeota, do domínio Archaea (ARS) (VOORDOUW et al., 1996; YOUSSEF; ELSHAHED; MCINERNEY, 2009). Por isso, o conjunto desses microrganismos filogeneticamente diversificado é denominado procariotos redutores de sulfato (PRS).

Os PRS estão amplamente distribuídos em ambientes aquáticos e terrestres (BARTON; HAMILTON, 2007). Nos reservatórios de petróleo, podem ser indígenas ou serem introduzidos através de atividades de exploração e produção de petróleo.

Em geral, os PRS crescem heterotroficamente a partir de substratos orgânicos como fontes de carbono e energia (doadores de elétrons), porém algumas espécies podem também crescer autotroficamente fixando CO₂ e com H₂ como doador de elétrons (LENS; KUENEN, 2001). Os PRS heterotróficos podem utilizar diversas fontes de carbono, incluindo álcoois (metanol, etanol, propanol e butanol) e ácidos orgânicos de baixa massa molecular, ou seus sais, como acetato, formiato, lactato, propionato, piruvato, geralmente disponíveis nos reservatórios em decorrência do metabolismo de bactérias. Alguns ainda são capazes de utilizar hidrocarbonetos do petróleo como única fonte de carbono, tais como alcanos, compostos aromáticos como benzeno e tolueno, e inclusive hidrocarbonetos poliaromáticos sugerindo a origem do *souring* e a corrosão, influenciados pelo metabolismo microbiano (BARTON; TOMEI, 1995; DHILLON et al., 2003; GIEG; JACK; FOGHT, 2011; HANDA et al., 2010; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; VOORDOUW et al., 1996). A seguir estão exemplificadas algumas das reações de oxidação de compostos orgânicos disponíveis em reservatórios por ação de PRS em anaerobiose com geração de sulfeto (CARDOSO, 2017; VANCE; THRASHER, 2005).



A utilização de substratos orgânicos no metabolismo desses microrganismos pode ser realizada de duas formas distintas: oxidação completa ou incompleta. Assim, o lactato, um substrato importante, pode seguir duas vias de oxidação representadas pelas equações seguintes abaixo (GIBSON, 1990):



A figura 1 ilustra a obtenção da energia a partir de fonte de carbono orgânico com íons sulfato como acceptor final de elétrons. Esta redução do sulfato pode levar a sulfetos, bissulfetos e hidrogênio sulfetado, além de produtos metabólicos intermediários, como os politionatos, tiosulfatos e tetracionatos, que têm papel importante na corrosão anaeróbica do ferro (VIDELA, 2003).

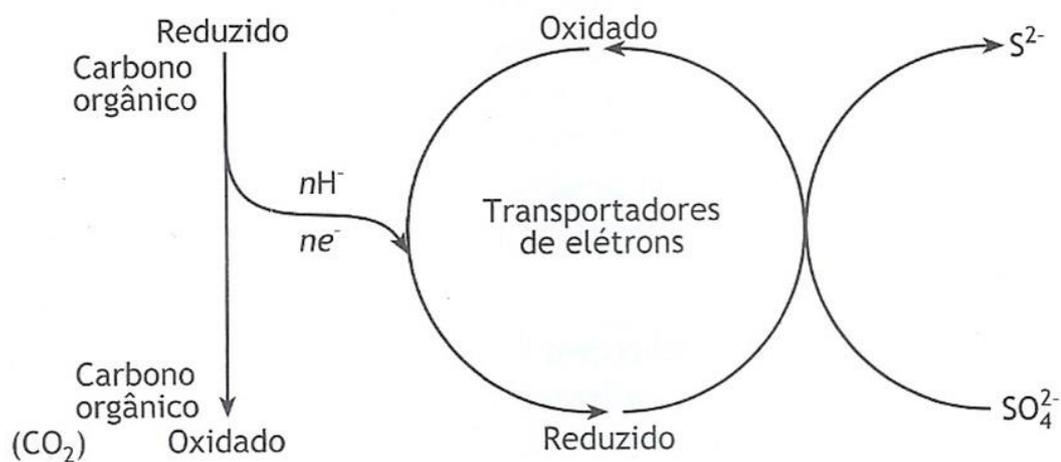


Figura 1: Metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) onde o carbono orgânico é o doador de elétrons na redução dos íons sulfato (VIDELA, 2003).

Em geral, os PRS oxidam de forma incompleta as fontes de carbono com formação de acetato como produto (MUYZER; STAMS, 2008). Porém, foram isoladas várias espécies com a capacidade de realizar o metabolismo completo, com geração de CO₂, conforme ilustra a figura 1. Com base nos compostos orgânicos doadores de elétrons utilizados e o produto da oxidação, os PRS são divididos em dois grupos: (1) os que utilizam o lactato, piruvato, etanol e determinados ácidos graxos com formação de acetato; e (2) os que oxidam ácidos graxos, particularmente o acetato na redução do sulfato a sulfeto. Exemplos de gêneros representantes destes grupos são: (1) *Desulfovibrio*, *Desulfobotulus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Thermodesulfobacterium*; (2) *Desulfobacter* e *Desulfobacterium*.

O sulfato é a forma oxidada de enxofre mais abundante na natureza (MARIETOU, 2016), por isso, normalmente, a literatura descreve PRS atuando na redução enzimática deste íon. No entanto, os PRS podem usar outros íons reduzidos de enxofre como acceptor de elétrons, como é o caso do sulfito e do tiosulfato, que são intermediários na redução do sulfato, bem

como enxofre elementar (FAUQUE; BARTON, 2012; GIEG; JACK; FOGHT, 2011; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Tem-se ainda que algumas espécies de PRS são também capazes de utilizar nitrato comoceptor final de elétrons, quando há limitação de sulfato (MARIETOU, 2016; MARIETOU; GRIFFITHS; COLE, 2009; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015). Neste caso, o produto gerado pelo metabolismo dos PRS será amônia. Além disso, ainda existe a possibilidade, dependendo da espécie de BRS, dos dois aceptores de elétrons (nitrato e sulfato) serem utilizados ao mesmo tempo (BARTON; TOMEI, 1995).

A maioria das bactérias é mesofílica, com temperatura ótima de crescimento entre 24 e 45 °C. No entanto, já foram reportadas algumas espécies psicrófilas, crescem abaixo de 20 °C, e várias espécies termofílicas com máximo de crescimento em temperaturas entre 55 e 70 °C, e inclusive hipertermofílicas, isoladas de locais com temperaturas superiores a 85 °C (AMEND; SHOCK, 2001; OKPALA et al., 2017). Quanto à temperatura pode-se estabelecer que a maioria das bactérias redutoras de sulfato (BRS) são ativas em temperaturas baixas a moderadas, enquanto que as arqueias redutoras de sulfato (ARS) são ativas em altas temperaturas (JOHNSON et al., 2017).

No que tange o pH, tem-se que o crescimento de PRS pode ocorrer na faixa de 5 a 9, embora seja indicado o valor 7,2 como o ideal (BARTON; TOMEI, 1995; MCCAULEY et al., 2009). De acordo com estudo realizado por AL-ZUHAIR; EL-NAAS; AL-HASSANI (2008) utilizando cultura de BRS isolada de água residuária de refinaria de petróleo, o pH e a temperatura ideais para o crescimento e a remoção de sulfato foram de 7,0 e 35 °C, respectivamente. Valores acima ou abaixo destes, em geral, resultam em baixa atividade metabólica, ou mesmo sua inibição. Entretanto, segundo ELLIOTT; RAGUSA; CATCHESIDE (1998), BRS viáveis foram recuperadas após 21 dias de experimento em colunas com pH 3,0, indicando serem capazes de suportar pH 3,0 por longos períodos. Porém, nesta condição, a produção de sulfetos ficou abaixo dos níveis detectáveis, e a remoção de sulfato foi de 14,4%. Cabe destacar que o estado do sulfeto gerado em solução depende unicamente do pH do ambiente, que como mencionado anteriormente, na forma não carregada (H₂S) pode ser mais tóxico à célula microbiana.

Os PRS são organismos anaeróbios e, portanto, dependem de potenciais redox inferiores a -100 mV para adequado desenvolvimento (GREENE et al., 2003). No entanto, já foi demonstrado que muitas espécies toleram O₂, sendo que algumas foram até mesmo capazes de reduzir o sulfato na presença de O₂ (CANFIELD; DES MARAIS, 1991; SIGALEVICH et al., 2000). ZARASVAND e RAI (2016) descrevem a capacidade de uma cepa isolada, *Citrobacter* sp, considerada uma bactéria redutora de sulfato “não tradicional”, como capaz de

produzir elevadas concentrações de sulfeto, similarmente aos gêneros de BRS “tradicionais” *Desulfovibrio* e *Desultomaculum*. Além disso, no ambiente, existem diferentes microrganismos interagindo, o que permite que condições anóxicas se estabeleçam mesmo que em micro nichos, e deve-se ainda considerar que o íon sulfeto é um agente potencialmente redutor.

BOYD et al. (2012) investigou as variações de O_2 e H_2S , em função da profundidade, no Lago Nymph, no Parque Nacional de Yellowstone, EUA, onde o pH é de cerca 3 e a temperatura acima de $50\text{ }^\circ\text{C}$ e verificaram que a temperatura tem uma influência maior no metabolismo das bactérias presentes. FERRIS et al. (2003) observaram um acentuado declínio na concentração de oxigênio à profundidade de $1100\text{ }\mu\text{m}$, sendo estabelecida condição anóxica abaixo de $1200\text{ }\mu\text{m}$. Na zona anóxica, as concentrações de sulfeto aumentaram de cerca 0 mM à $1200\text{ }\mu\text{m}$ de profundidade para 100 mM à profundidade de $2400\text{ }\mu\text{m}$.

3.3.2 Microrganismos redutores de nitrato

As bactérias redutoras de nitrato (BRN) normalmente são microrganismos anaeróbios facultativos que, em condições limitantes de oxigênio, realizam a respiração anaeróbia do NO_3^- ou NO_2^- com geração dos gases NO , N_2O e N_2 , processo denominado desnitrificação. A maioria desses microrganismos são quimiorganotróficos e, portanto, utilizam carbono orgânico como fonte de carbono e doador de elétrons. Como exceção, tem-se as bactérias redutores de nitrato (desnitrificantes) oxidantes de enxofre (BRN-OS) que, normalmente, são anaeróbias facultativos e que, em sua maioria, crescem preferencialmente em aerobiose, ou seja, utilizando O_2 como acceptor final de elétrons (MADIGAN et al., 2016).

A desnitrificação de NO_3^- a N_2 exige várias etapas enzimáticas, sendo que a maioria das BRN são incapazes de realizar a redução total, pois possuem apenas parte da via de desnitrificação (MADIGAN et al., 2016). A redução do nitrato pode ser tanto por processo assimilativo quanto dissimilativo (Figura 2), assim como ocorre para a redução do sulfato.

Como ilustrado na Figura 2, o processo assimilativo se dá pela incorporação de íons nitrato, pela ação de um sistema enzimático específico, resultando na formação de amônia, que posteriormente é incorporada em aminoácidos que, por sua vez unidas por ligações peptídicas, permitirá a síntese de diferentes moléculas de proteínas. Já o processo dissimilativo ocorre quando o NO_3^- é utilizado como acceptor final de elétrons, sendo grande parte reduzido com excreção de gás para o ambiente (MADIGAN et al., 2016; NASCIMENTO, 2006). Como apontado na Figura 2, o processo dissimilativo pode ocorrer por duas rotas: (i) redução parcial do nitrato – onde o nitrato é convertido em nitrito e/ou amônia; e (ii) desnitrificação – onde o

nitrato é convertido em gás nitrogênio, conforme demonstrado nas equações a seguir (NASCIMENTO, 2006), conforme exemplificado a seguir:

Redução parcial do nitrato: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$

Desnitrificação: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

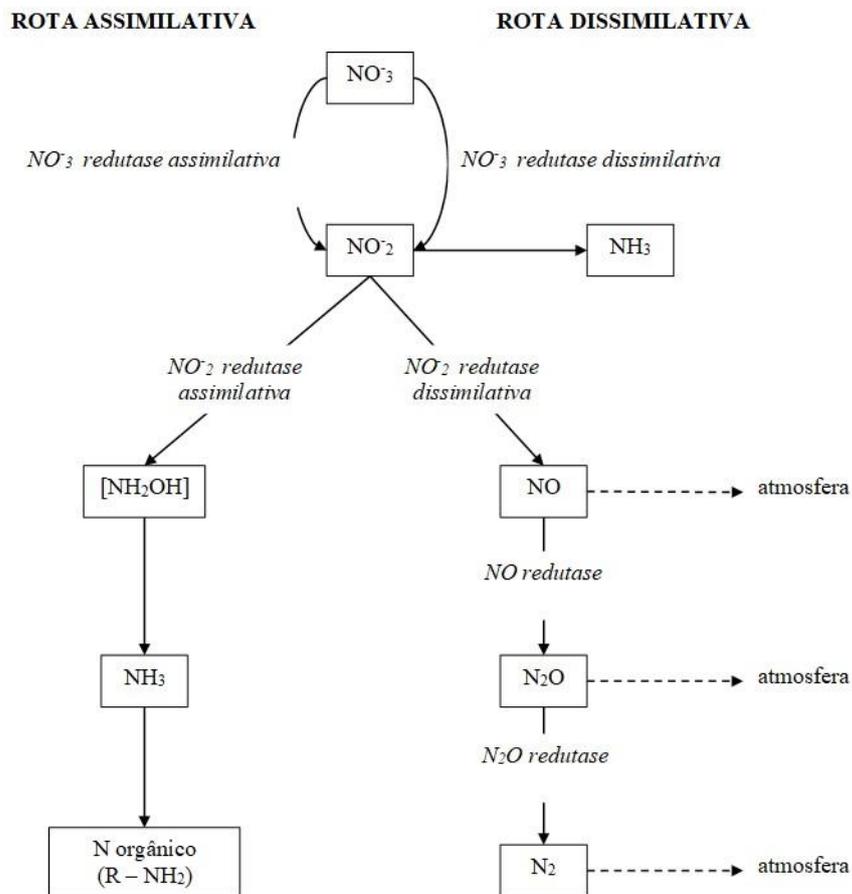


Figura 2: Rotas assimilativa e dissimilativa do nitrato. Adaptado de (MADIGAN et al., 2016).

As bactérias redutoras de nitrato, assim como as BRS, agrupam espécies filogeneticamente diferentes que podem ser encontradas em diferentes ambientes, aquáticos e terrestres, com várias espécies isoladas de reservatório de petróleo (CHEN et al., 2017; HUBERT; VOORDOUW, 2007; LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al., 2004; MYHR et al., 2002; VIGNERON et al., 2017). As bactérias redutoras de nitrato correspondem de 10 a 50% das bactérias totais no ambiente (BUSCOT; VARMA, 2005).

As BRN englobam uma grande variedade de espécies heterotróficas (BRNorg) e autotróficas, com predominância das primeiras, o que permite que a redução de nitrato possa ocorrer a partir das mais diversas fontes de carbono e energia, em variadas temperaturas e pH.

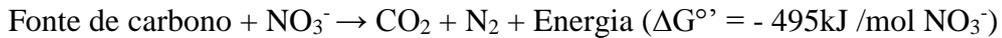
A exemplo das BRS, a presença de ácidos graxos voláteis, como acetato, propionato e butirato são considerados potenciais doadores de elétrons, além de compostos aromáticos como fenóis e tolueno, o que propicia a atividade de BRN em reservatórios de petróleo, e inclusive, a competição de ambas pelas fontes de carbono neles existentes (CHEN et al., 2017; ECKFORD; FEDORAK, 2004; HUBERT; VOORDOUW, 2007; VAZQUEZ-DUHALT; QUINTERO-RAMIREZ, 2004). Em geral, tanto íons nitrato quanto nitritos podem ser utilizados como aceptores de elétrons (BUSCOT; VARMA, 2005).

Já as BRN-OS são geralmente quimiolitotróficas, obtendo a energia necessária para suas funções vitais a partir da oxidação de sulfeto a sulfato ou enxofre elementar, com nitrato como acceptor final de elétrons. Logo, a atividade das BRN-OS concorre para mitigação do sulfeto gerado pelas BRS. E, embora as BRS passem a dispor de um “input” de sulfato, a sua atividade é inibida pelo aumento do potencial redox devido a produção de N₂O pelas BRN-OS (VAZQUEZ-DUHALT; QUINTERO-RAMIREZ, 2004).

3.4 Exclusão biocompetitiva e mecanismos de ação do nitrato

A tecnologia da exclusão biocompetitiva, patenteada por HITZMAN; SPERL; SANDBECK (1998), se baseia em inibir a indesejável produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em reservatórios de óleo pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), pelo estímulo do crescimento seletivo de bactérias redutoras de nitrato, cuja atividade não interfere na qualidade do óleo extraído nem nas operações (ECKFORD; FEDORAK, 2004; HITZMAN; SPERL, 1994). Neste contexto, foi proposta a adição de nitrato à água de injeção como forma de minimizar a geração biogênica de H₂S, de modo a prolongar a produção em reservatórios acidificados e, ainda, podendo melhorar a recuperação do óleo residual de reservatórios.

Como descrito anteriormente, o sulfato é o principal acceptor final de elétrons para BRS enquanto algumas BRS e as BRNorg utilizam nitrato. Assim, com base na termodinâmica, cinética e no potencial redox, a competição entre esses grupos se estabelece quando ambos os ânions estão presentes. Entretanto, como a redução do nitrato fornece mais energia livre de Gibbs do que a redução do sulfato, na presença do nitrato, as BRN superam as BRS no consumo das fontes disponíveis de doadores de elétrons (DAVIDOVA et al., 2001). Conforme exemplificado a seguir, termodinamicamente, a redução microbiológica de sulfato produz aproximadamente dez vezes menos energia do que a redução do nitrato, em anaerobiose.

Redução de Sulfato:**Redução de Nitrato:**

Assim sendo, a presença concomitante de nitrato e sulfato favorecerá preferencialmente as bactérias capazes de crescer via metabolismo assimilativo e dissimilativo do nitrato. Por conseguinte, haverá o crescimento naturalmente preponderante das BRN, desde que os nutrientes não sejam limitantes. Portanto, a quantidade absoluta de biomassa produzida irá ser determinada pela concentração do nutriente limitador do crescimento.

Como o nitrato também pode ser usado por algumas espécies de BRS como acceptor de elétrons, pode-se entender que continuarão ativas, embora não haja produção de sulfeto (HUBERT; VOORDOUW; MAYER, 2009; NASCIMENTO, 2006). Portanto, cabe salientar que a adição de nitrato não eliminará necessariamente todas as espécies de BRS presentes no ambiente, mas poderá inibir a produção do sulfeto, desde que seja continuamente adicionado (NASCIMENTO, 2006).

A injeção de nitrato irá estimular o crescimento de bactérias redutoras de nitrato autotróficas e heterotróficas (BRNorg), as quais, por sua vez, também poderão controlar o crescimento das BRS devido à competição pelos substratos orgânicos (doadores de elétrons). Em função do ganho energético, haverá a tendência das BRNorg proliferarem mais rapidamente do que as BRS, diminuindo, portanto, a disponibilidade de doadores de elétrons para as mesmas.

A Figura 3 ilustra a interação entre BRNorg e BRN-OS com as BRS, a redução do nitrato pode ter como subprodutos nitrito, nitrogênio gasoso ou amônia (HUBERT; VOORDOUW; MAYER, 2009), conforme demonstrado na Figura 3.

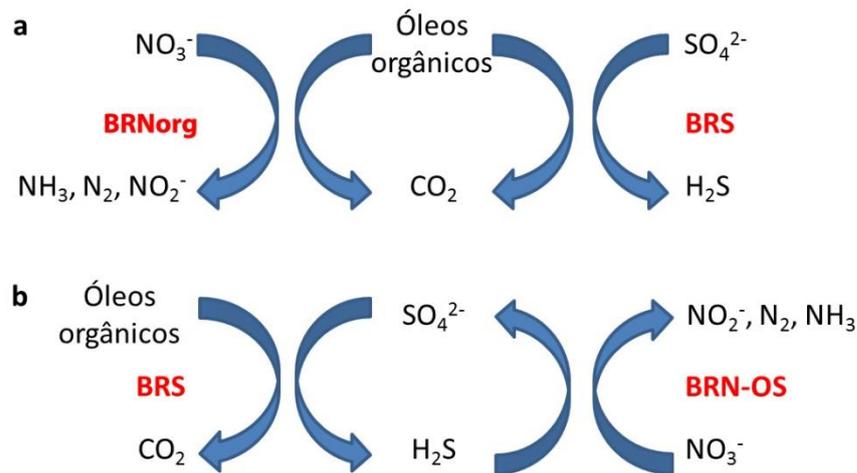
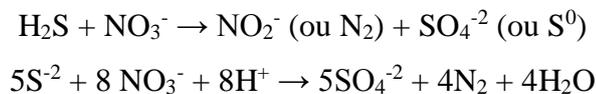
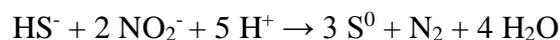


Figura 3: Impacto do nitrato ou nitrito na atividade das BRS. (a) as BRNorg competem diretamente com as BRS pelos compostos orgânicos (doadores de elétrons) resultando na exclusão biocompetitiva das BRS. (b) O H_2S produzido pelas BRS pode ser usado pelas BRN-OS como doador de elétrons durante a redução do nitrato. Adaptado de HUBERT; VOORDOUW; MAYER (2009).

Em sistemas onde o sulfeto já tenha sido produzido, é possível removê-lo através da oxidação biológica. Neste caso, o nitrato pode ser usado como aceptor de elétrons para a reoxidação do sulfeto a sulfato ou enxofre elementar pelas BRN-OS. Ou seja, o nitrato não irá prevenir ou inibir a redução de sulfato, mas sim estimular a oxidação do sulfeto gerando formas mais oxidadas de enxofre. Desta forma, é possível manter a redução contínua do sulfato, sem a produção correspondente de sulfeto. Um dos mecanismos propostos para essa oxidação está descrito abaixo (DAVIDOVA et al., 2001).



Além do processo de oxidação biológica, o sulfeto, uma vez gerado, pode ser oxidado quimicamente por alguns intermediários do metabolismo das BRN, como o nitrito. No caso do nitrito, este reage abioticamente (quimicamente) com o sulfeto dissolvido produzindo enxofre elementar. Esse mecanismo se dá através da reação abaixo (DUNSMORE et al., 2004):



Outro mecanismo observado com a adição do nitrato é a inibição das BRS pelo potencial redox. As BRS crescem somente em ambiente altamente redutor, enquanto as BRN são conhecidas por crescer em uma faixa menor de potencial redox, e qualquer redução do potencial redox pode afetar seu crescimento (KUIJVENHOVEN et al., 2007). Geralmente os

microrganismos redutores de sulfato crescem, em meio de cultivo, na faixa de -100 a -500 mV de potencial redox (BERNARDEZ et al., 2013). Este potencial é necessário para que consigam realizar a “respiração do sulfato”, ou seja, a redução do sulfato a sulfeto (POSTGATE, 1984). A redução incompleta do nitrato a nitrito pelas BRN pode promover a oxidação do sulfeto do sistema, aumentando o potencial redox (E_h), e conseqüentemente resultando na inibição das BRS (BØDTKER et al., 2009).

Mesmo quando há redução completa de nitrato à amônia pode ocorrer a geração de nitrito como um intermediário da rota metabólica. Algumas espécies de BRS conseguem utilizar o nitrito como receptor final de elétrons, demonstrando que a redução do nitrito faz parte do complexo enzimático constituinte das células (BARTON; TOMEI, 1995). Vale ainda ressaltar que, nestes casos, o nitrito é reduzido à amônia, não dando seqüência à rota dissimilativa que o levaria até nitrogênio.

Interações entre BRS e BRN-OS foram demonstradas em diversos ambientes. Por exemplo, em sedimentos marinhos anaeróbicos, a matéria orgânica é oxidada principalmente por BRS com o sulfeto resultante sendo reoxidado pela BRN-OS *Thioploca* spp. (FOSSING et al., 1995). Como as BRN-OS são geralmente autótroficas, elas não competem com BRS pelas fontes de carbono orgânico, sendo a inibição decorrente do aumento do potencial redox.

Em um estudo de campo, TELANG et al. (1997) relataram que a injeção contínua de nitrato 5 mM em um campo de petróleo levou a remoção de sulfato entre 50 e 100% nos poços de injeção e produção, enquanto a análise da comunidade microbiana indicou um forte aumento de *Thiomicrospira* sp. (BRN-OS). Em estudos laboratoriais, foi mostrado que a adição de *Thiomicrospira* sp. e nitrato em cultivos em batelada de *Desulfovibrio* sp. (BRS), proveniente de campo de óleo, resultaram em forte inibição da redução do sulfato (NEMATI; JENNEMAN; VOORDOUW, 2001).

3.5 Técnicas moleculares como ferramenta para o monitoramento microbiológico

As técnicas moleculares têm sido consideradas as mais promissoras para a investigação de microrganismos envolvidos em processos de corrosão por permitirem: (1) identificar as bactérias predominantes em um ecossistema sem as limitações das técnicas de cultivo de células viáveis; (2) determinar a proporção das bactérias responsáveis pelo processo de corrosão em relação à população total; (3) identificar as bactérias suscetíveis ou resistentes aos agentes biocidas empregados; (4) avaliar as mudanças na população total por estresse causado, como pela aplicação de biocidas ou pela limitação de nutrientes; e (5) obter uma amostra

representativa, que não sofra variação com o tempo ou alterações das condições durante o transporte (VIDELA; HERRERA, 2005).

O emprego destas técnicas se deve à disponibilidade de um banco de dados de sequências *16S RNA* ribossomal de microrganismos e aos seus avanços. As técnicas clássicas são: uso de reação de cadeia de polimerase (*PCR*); amplificação da cópia do gene específico da amostra; análise dos produtos por *PCR* e *DGGE* (eletroforese em gel de gradiente desnaturante); e, finalmente, a clonagem do *DNA*, a ser posteriormente sequenciado e comparado com as informações de um banco de dados (KLEIKEMPER et al., 2002; ZHU; LUBECK; KILBANE, 2003). O sequenciamento é qualitativo, no entanto, pelo uso de sistemas mais avançados, como *PCR* quantitativo (*qPCR*) é possível determinar quantitativamente a distribuição e a expressão do *DNA* ou *RNA* de interesse.

3.6 Planejamento Experimental

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade dos produtos, tem levado à busca por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

O planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos, é uma poderosa ferramenta para obter condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas ou para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

O delineamento experimental de Doehlert (DOEHLERT, 1970) foi aplicado para selecionar a melhor condição de concentração de nitrato e temperatura para a mitigação da geração de H_2S . Os pontos de sua matriz correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular, conforme a Figura 4 (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A escolha do delineamento experimental de Doehlert é justificada pelas vantagens que apresenta, tais como: (1) o seu domínio experimental para duas variáveis, o que acentua a uniformidade no preenchimento do espaço envolvido, (2) sua capacidade em explorar todo o domínio, onde cada variável pode ser estudada em diferentes números de níveis e (3) o deslocamento do planejamento pode ser feito aproveitando-se pontos do planejamento inicial, quando os limites não foram bem escolhidos inicialmente, conferindo mobilidade a este planejamento, conforme Figura 4 (BENSALAH et al., 2010; NOVAES et al., 2017).

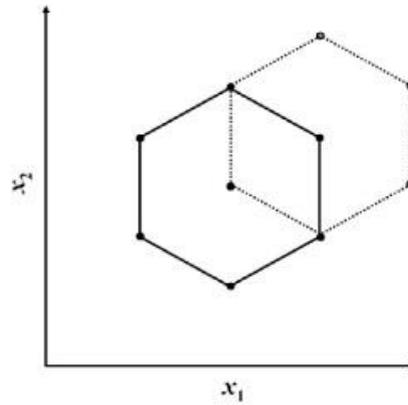


Figura 4: Planejamento de Doehlert e o aproveitamento de pontos experimentais (hexágono tracejado) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Uma outra vantagem da matriz de Doehlert é a necessidade de poucos pontos experimentais para a sua realização e sua alta eficiência. E, apesar de não ser ortogonal, isto não significa perda na qualidade da otimização dos experimentos (NOVAES et al., 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo da influência da concentração do nitrato e da temperatura na geração de H₂S biogênico foi realizado através da aplicação do Delineamento de Doehlert, para obtenção de dados significativos e confiáveis. A aplicação de um delineamento experimental permitiu a avaliação estatística dos resultados, o que, dentre outras vantagens, permite a otimização do número de ensaios de modo a manter a representatividade dos resultados obtidos e a atenuação dos erros experimentais. Os ensaios do delineamento experimental foram realizados no laboratório da Gerência de Biotecnologia do Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES) utilizando o nitrato de cálcio, produto comercial atualmente utilizado em campo, e suas concentrações se referem a concentrações de nitrato de cálcio.

O número de experimentos (N) foi obtido através da equação $N=n^2 + n + n_0$, onde n é o número de variáveis a serem estudadas e n_0 é o número de pontos centrais, neste caso fixados em 2. Portanto, considerando 2 variáveis (concentração de nitrato, x_1 e temperatura, x_2) e 2 pontos centrais, a matriz de Doehlert resultou em um total de 8 experimentos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Matriz do delineamento de Doehlert com os valores reais e codificados das duas variáveis, com duas réplicas no ponto central.

Experimentos	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	NO ₃ ⁻ (x1)	Temperatura (x2)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	Temperatura (°C)
1	1	0	110	55
2	-1	0	30	55
3	0,5	0,87	90	80
4	-0,5	0,87	50	80
5	0,5	-0,87	90	30
6	-0,5	-0,87	50	30
7	0	0	70	55
8	0	0	70	55

Um modelo quadrático com 6 coeficientes, incluindo parâmetros de interação, foi adotado para descrever o relacionamento entre cada resposta Y e os parâmetros experimentais x_i :

$$Y = b_0 + (b_1x_1) + (b_2x_2) + (b_{12}x_1x_2) + (b_{11}x_1^2) + (b_{22}x_2^2),$$

onde b_0 é a constante do modelo; b_j , os coeficientes principais; b_{jk} , os coeficientes de interação; e b_{jj} , os coeficientes quadráticos.

Os coeficientes foram determinados através de regressão linear e, de acordo com o modelo matemático estabelecido, gráficos de superfície de resposta foram gerados a partir das previsões da influência do nitrato e da temperatura em todo o espaço das variáveis estudadas.

Os dados experimentais foram analisados usando o *software* Microsoft Excel versão 2017. As figuras e tabelas apresentadas nos resultados também foram geradas utilizando-se esse mesmo *software*.

4.1 Sistema experimental

Todos os ensaios foram realizados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade vedados com batoque e tampa rosca (Figura 5) para que não houvesse interferência do oxigênio, além de garantir que, caso houvesse geração de H_2S , este não extravasasse para o ambiente.



Figura 5: Frascos hermeticamente fechados utilizados no experimento.

O sistema experimental foi composto de frascos contendo o meio de cultura de contato (Tabela 2 e Tabela 3) acrescido de diferentes concentrações de nitrato, de acordo com o planejamento experimental adotado (Tabela 1). Os meios foram inoculados com concentrações iniciais de cada cultura microbiana, conforme demonstrado mais abaixo na Figura 6, padronizadas a partir da quantificação da massa de *DNA* total de cada cultivo.

A partir da quantificação da massa de *DNA*, o inóculo foi preparado em um único frasco, misturando-se o volume definido na Tabela 15, e a partir deste inóculo único, os frascos testes tiveram adição de 10% de inóculo em cada um dos frascos.

A incubação dos cultivos foi realizada nas temperaturas de 30, 55 e 80 °C em cinco tempos distintos: 1, 3, 7, 14 e 28 dias, conforme descrito na Tabela 1. Para cada condição experimental avaliada, foi usado o volume total do frasco, ou seja, foram empregados frascos de sacrifício, para realização das análises quantitativas. Esse procedimento teve como propósito

minimizar os erros devidos a problemas de amostragens, bem como alterações da relação volume/*headspace* em face da retirada frequente de amostras.

No presente estudo, para cada experimento do planejamento experimental (Tabela 1), as variáveis respostas foram: quantificação microbiológica dos grupos das BRS, BRNorg e BRN-OS (mesofílicas e termofílicas) pelo método do NMP, quantificação dos genes *dsr* (bactérias redutoras de sulfato) e *rrs* (bactérias totais) por *qPCR*, teor de geração de sulfeto, concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), concentração de nitrato e concentração de nitrito. Para a quantificação de BRNorg e BRN-OS, foi realizada a reação de diazotização descrita por Peter Griess em 1858 (BUXTON, 2016; DESHAN et al., 1965; SIGMA-ALDRICH, 2013), onde a redução do nitrato foi avaliada através deste método. Esta metodologia está descrita no item 4.4.6.

4.2 Inóculos

As culturas microbianas – BRS, BRNorg e BRN-OS – empregadas como inóculo nos experimentos foram obtidas a partir do cultivo de uma única amostra, coletada em um poço produtor de um reservatório de petróleo da Petrobras que já utiliza o nitrato como tratamento para mitigação da geração de H₂S biogênico, em meios de cultura específicos (Figura 6). A temperatura inicial desse reservatório era de aproximadamente 80 °C e a salinidade aproximada da água do mar injetada de 35 g/L de NaCl (cloreto de sódio).

Uma vez evidenciada a presença das diferentes populações microbianas, através da quantificação da massa de *DNA*, nos cultivos iniciais foram realizados cultivos subsequentes (de 2 em 2 meses) ao longo de 6 meses de modo a obter culturas microbianas adaptadas às condições deste estudo. Os cultivos foram realizados nos meios específicos para cada grupo e estão descritos mais adiante, no item 4.3. Conforme ilustra a Figura 6, ao final desta etapa foram obtidos cultivos enriquecidos de Bactérias Redutoras de Sulfato Mesofílicas (m-BRS) e Termofílicas (t-BRS), Bactérias Redutoras de Nitrato Oxidantes de Sulfeto Mesofílicas (m-BRN-OS) e Termofílicas (t-BRN-OS) e Bactérias Redutoras de Nitrato Organotróficas Mesofílicas (m-BRNorg) e Termofílicas (t-BRNorg).

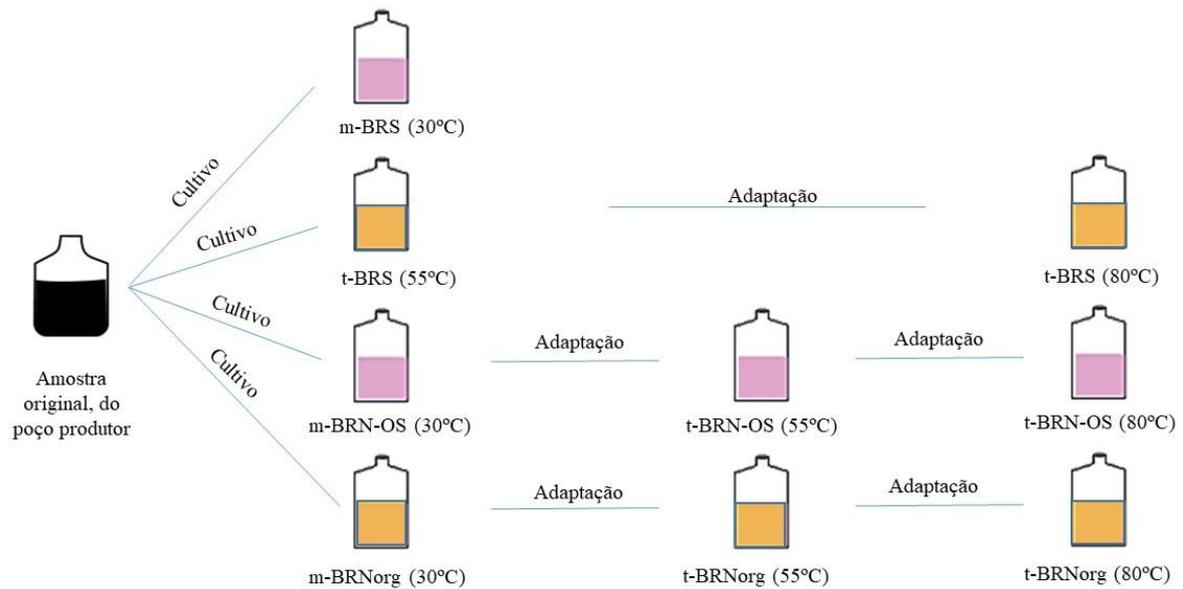


Figura 6: Esquema de cultivo e adaptação dos inóculos utilizados no ensaio.

Para as concentrações iniciais de BRS, BRN-OS e BRNorg, definiu-se a quantificação da massa de *DNA* total, considerando a sensibilidade e, sobretudo, a rapidez dos métodos moleculares comparativamente aos métodos convencionais de cultivo. Portanto, a padronização dos diferentes inóculos empregados, foram feitas através das medidas das massas de *DNA* total. Os volumes utilizados para o inóculo inicial estão apresentados no item 5.1 dos Resultados e Discussões.

4.3 Meios de cultura e soluções

4.3.1 Meio de cultura de contato

A partir de informações obtidas de bancos de dados da Petrobras sobre a composição química da água produzida (água que sai do poço junto com o óleo) do reservatório de onde a amostra inicial foi coletada, foi preparado um meio de cultura para ser utilizado nos ensaios do delineamento experimental. O meio de cultura, doravante denominado meio de cultura de contato, foi composto de água do mar natural, coletada na Baía de Ilha Grande, suplementada com sais e elementos essenciais com base no meio Postgate E modificado (POSTGATE, 1984) e ácidos orgânicos de cadeia curta como fonte de carbono, em substituição ao lactato (Tabela 2). As concentrações dos ácidos acético, propiônico e butírico foram calculadas de modo a estabelecer a relação carbono/sulfato do meio Postgate E modificado, mantendo a proporção

dos ácidos orgânicos encontrada na caracterização química da água de produção coletada do reservatório de petróleo em questão.

Após preparo, o meio de cultura de contato teve seu pH ajustado para $7,6 \pm 0,1$ com auxílio de NaOH 5 mol/L, e para garantir a anaerobiose, o meio foi preparado sob purga de nitrogênio e distribuído 250 mL em frascos de vidro âmbar, de 250 mL de capacidade. Em seguida, estes foram fechados com tampa de borracha e esterilizados por autoclavagem a 1 atm ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$), por 15 minutos. Os batoques (para garantir vedação e anaerobiose) dos frascos âmbar foram colocados após esterilização por 90 minutos em luz ultravioleta na câmara de fluxo laminar.

Tabela 2: Composição do meio de cultura de contato.

Componentes	Concentração (g/L de água do mar)
Ácido acético	2,3
Ácido propiônico	0,6
Ácido butírico	0,057
Ácido ascórbico	1,0
Cloreto de amônio	1,0
Fosfato de potássio dibásico	0,5
Extrato de levedura	1,0
Elementos traços*	1,0 (mL/L)

pH $7,6 \pm 0,1$ ajustado com NaOH 5 mol/L. *Tabela 3

A Tabela 3 apresenta a composição química da solução de elementos traços empregada na formulação do meio de cultura.

Tabela 3: Composição da solução de elementos traços (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993).

Componentes	Concentração (mg/L de água destilada)
Ácido bórico	60
Cloreto de manganês	100
Cloreto de cobalto	120
Cloreto de zinco	70
Cloreto de níquel	20
Cloreto cúprico	15
Molibdato de sódio	25
Selenito de sódio	3

pH $7,6 \pm 0,1$ ajustado com NaOH 5 mol/L.

4.3.2 Meio de cultura para bactérias redutoras de sulfato mesofílicas (m-BRS)

As etapas de crescimento, manutenção e quantificação das m-BRS foram realizadas em meio Postgate E modificado, como descrito na Tabela 4 (POSTGATE, 1984). A modificação do meio se deu pelo uso da água do mar natural como matriz de preparo do meio de cultura e pela substituição do ácido tioglicólico da composição original pela adição, após a autoclavação, de 0,1 mL de uma solução estéril de tioglicolato de sódio (12,4 g/L). O ácido tioglicólico em alta temperatura enegrece o ferro presente no meio, o que acarretaria em um falso positivo. Após preparo, o meio teve seu pH ajustado para $7,6 \pm 0,1$ com auxílio de NaOH 5 mol/L.

Para garantir a anaerobiose, o meio foi preparado sob purga de nitrogênio e distribuído 9 mL em frascos do tipo penicilina, de 10 mL de capacidade. Em seguida, estes foram vedados com tampa de borracha e lacrados com lacre de alumínio, esterilizados por autoclavação a 1 atm (121 °C), por 15 minutos.

Tabela 4: Composição do Meio Postgate E Modificado para BRS (POSTGATE, 1984).

Componentes	Concentração (g/L de água do mar)
KH ₂ PO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,83
Na ₂ SO ₄	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Ágar-ágar	1,9
Extrato de levedura	1,0
Ácido ascórbico	0,1
Lactato de sódio (50%)	7 mL/L
Solução de resazurina (0,025%)	4 mL/L
pH $7,6 \pm 0,1$ ajustado com NaOH 5 mol/L.	

4.3.3 Meio de cultura para bactérias redutoras de sulfato termofílicas (t-BRS)

As etapas de crescimento, manutenção e quantificação das t-BRS foram realizadas em meio CAPCIS modificado (COCHRANE et al., 1988; EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993), que é um meio composto por 3 soluções, conforme descrito nas Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

A modificação do meio se deu pela adição de uma solução de ácidos orgânicos de cadeia curta (solução 2) e pela adição dos reagentes sulfato de sódio (Na_2SO_4) e sulfito de sódio (Na_2SO_3) na composição original (Solução 1). Essa modificação é resultado de estudos anteriores realizados no CENPES.

As soluções 1 e 2 foram preparadas separadamente e todos os componentes foram dissolvidos e seu pH ajustado para $7,6 \pm 0,1$ com auxílio de NaOH 5 mol/L. Após o preparo, ambas as soluções foram misturadas (850 mL da solução 1 e 150 mL da solução 2, totalizando 1 Litro) e o pH novamente ajustado para $7,6 \pm 0,1$. Para garantir a anaerobiose, o meio foi preparado sob purga de nitrogênio e distribuídos 9 mL em frascos do tipo penicilina de 10 mL de capacidade. Em seguida, foram vedados com tampa de borracha e lacrados com lacre de alumínio, esterilizados por autoclavação a 1 atm (121°C), por 15 minutos. A solução 3 foi preparada previamente ao preparo das soluções 1 e 2 e preservada sob refrigeração a 4°C .

Após o preparo, esterilização e resfriamento do meio de cultivo, alíquotas de 0,1 mL de uma solução de tioglicolato de sódio 12,4 g/L previamente autoclavada a 1 atm (121°C), por 15 minutos, foi adicionada a cada frasco.

Tabela 5: Composição da Solução 1 do meio CAPCIS Modificado (COCHRANE et al., 1988).

Componentes	Concentração (g/L de água do mar)
Na_2SO_4	2,0
Na_2SO_3	1,0
K_2HPO_4	0,5
NH_4Cl	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Extrato de levedura	1,0
Elementos traços (Solução 4)	1,0 mL/L
Água do Mar	850 mL

pH $7,6 \pm 0,1$ ajustado com NaOH 5 mol/L.

Tabela 6: Composição da Solução 2 do meio CAPCIS Modificado (COCHRANE et al., 1988).

Componentes	Quantidade
Ácido ascórbico	1,0 g
Ácido láctico	1,5 mL
Ácido acético	1,5 mL
Ácido butírico	0,1 mL
Ácido propiônico	0,1 mL
H ₂ O do mar	150 mL

pH 7,6±0,1 ajustado com NaOH 5 mol/L.

Tabela 7: Composição da Solução 3 do meio CAPCIS Modificado (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993).

Componentes	Concentração (g/L de água destilada)
Ácido bórico	0,06
Cloreto de manganês	0,1
Cloreto de cobalto	0,12
Cloreto de zinco	0,07
Cloreto de níquel	0,02
Cloreto cúprico	0,015
Molibdato de sódio	0,025
Selenito de sódio	0,003

4.3.4 Meio de cultura para bactérias redutoras de nitrato organotróficas (BRNorg)

As etapas de crescimento, manutenção e quantificação das BRNorg foram realizadas em caldo nutriente, conforme composição descrita na Tabela 8.

O meio de cultivo foi preparado sob purga de nitrogênio e não teve seu pH ajustado, pois já estava próximo ao pH utilizado para este grupo, próximo do neutro. Para garantir a anaerobiose, o meio foi preparado sob purga de nitrogênio e distribuídos 9 mL em frascos do tipo penicilina de 10 mL de capacidade de volume final. Em seguida, foram vedados com tampa de borracha e lacrados com lacre de alumínio, esterilizados por autoclavação a 1 atm (121 °C), por 15 minutos.

Tabela 8: Composição do caldo nitrato empregado no cultivo de bactérias redutoras de nitrato organotróficas.

Componentes	Concentração (g/L de água do mar)
Extrato de carne	3,0
Peptona Universal	5,0
KNO ₃	1,0

4.3.5 Meio de cultura para bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto (BRN-OS)

As etapas de crescimento, manutenção e quantificação das BRN-OS mesofílicas e termofílicas foram realizadas em meio desenvolvido por DAVIDOVA et al. (2001), como descrito nas Tabela 9 e Tabela 10. Após seu preparo, o meio teve o pH ajustado para $7,2 \pm 0,1$ com adição de NaOH 5 mol/L.

Para garantir a anaerobiose, o meio foi preparado sob purga de uma mistura de gases de N₂/CO₂ (80:20) e distribuído em alíquotas de 9 mL em frascos do tipo penicilina com capacidade de volume final de 10 mL. Em seguida, foram vedados com tampa de borracha e lacrados com lacre de alumínio, esterilizados por autoclavação a 1 atm (121 °C), por 15 minutos.

Tabela 9: Composição do meio de cultura para BRN-OS (DAVIDOVA et al., 2001).

Componentes	Concentração (g/L de água do mar)
KCl	0,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,4
KH ₂ PO ₄	0,3
NH ₄ Cl	0,5
Na ₂ S ₂ O ₃	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15
NaNO ₃	0,85
Extrato de levedura	0,1
NaHCO ₃ (após a esterilização)	5,0
Resazurina (0,025% p/v)	4 mL/L
Elementos traços *	10 mL/L

pH $7,2 \pm 0,1$ ajustado com NaOH 5 mol/L; *Tabela 10

Tabela 10: Composição Química da Solução de elementos-traço usada no meio de cultura para BRN-OS Adaptado de (WOLIN; WOLIN; WOLFE, 1963).

Componentes	Concentração (mg/L de água destilada)
Ácido nitriloacético	2,0 mL/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,0
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0,8
CoCl ₂ .H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Ni ₆ Cl ₂ .H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄	0,02
Na ₂ SeO ₄	0,02
Na ₂ WO ₄	0,02

4.3.6 Soluções empregadas na reação de diazotação

A reação de diazotação é um método simples e efetivo para determinação de nitrato e nitrito em uma variedade de matrizes. Esta reação consiste na formação de coloração rósea quando da diazotação de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com α -naftilamina em meio ácido, formando o ácido α -naftilamino- p -azobenzeno- p -sulfônico (BRASIL, 1999).

As Tabela 11 e Tabela 12 apresentam as composições das duas soluções, Reagentes A e B, respectivamente.

Tabela 11: Composição da solução Reagente A para teste de redução de nitrato.

Componentes	Concentração (g/L de água destilada)
Ácido sulfanílico	8,0
Ácido acético 30%	1,0

Tabela 12: Composição da solução Reagente B para teste de redução de nitrato.

Componentes	Concentração (g/L de água destilada)
α -naftilamina	6,0
Ácido Acético 30%	1,0

A realização do teste consistiu em adicionar 1 mL do Reagente A e 1 mL do Reagente B a frascos contendo 10 mL de amostra dos cultivos. Frascos que apresentaram coloração

vermelha/rósea após 30 segundos de contato com os Reagentes A e B foram considerados positivos, pois tal coloração decorre da presença de nitrito no meio.

Nos frascos que permaneceram com a cor inalterada, pó de zinco foi adicionado para catalisar a reação de redução de nitrato a nitrito. De modo que, após a adição de zinco, frascos em que a coloração se manteve inalterada foram considerados positivos, enquanto aqueles onde a coloração foi alterada para vermelha/rósea foram considerados negativos, o que advém da presença de nitrato (SIGMA-ALDRICH, 2013).

Como os meios de cultura utilizados foram preparados em água do mar, foi utilizado um frasco controle negativo, ou seja, com água do mar em substituição à amostra.

4.4 Análises Químicas

4.4.1 Determinação do teor de sulfeto gerado

A análise de sulfeto foi realizada nos laboratórios da Gerência de Biotecnologia do CENPES através da técnica de titulação potenciométrica, utilizando o equipamento 862 *CompactTitrosampler*[®] da Metrohm. Para analisar a fase gás do sulfeto, os frascos testes foram purgados com nitrogênio em NaOH a 5 mol/L, por 20 minutos. Para a fase líquida, NaOH a 5 mol/L foi adicionado até atingir o pH 12,0. As análises foram realizadas separadamente e, ao final, os valores foram somados.

4.4.2 Sais de ácidos orgânicos de cadeia curta, nitrato e nitrito

As análises químicas de sais de ácidos orgânicos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), nitrato e nitrito foram realizados pela Gerência de Química do CENPES, pela técnica de cromatografia de íons, utilizando o equipamento 861 *Advanced Compact IC*[®] da Metrohm, de acordo com as configurações estabelecidas na Tabela 13. Alíquotas de 50 mL foram colocadas em tubos de centrífuga estéreis e enviadas para análise.

Tabela 13: Metodologia empregada na determinação dos ânions nitrito, nitrato e ácidos carboxílicos de cadeia curta.

Métodos	Modelo				Outros itens		Eluentes		Fluxo - mL/min
	Cromatógrafo	Amostrador	Pré-coluna	Coluna	PCC*	Membrana	Eluente - Fase Móvel	Eluente Supressor de íons	
Determinação de nitrito e nitrato - Eliminação de Matriz	861 - Advanced Compact IC	838 - Advanced Samplo Processor	Metrosep A 4/5 Guard/ 4.0	Metrosep A Supp 4 250/4.0	Metrosep A PCC 1 HC/4.0	Não há	Solução aquosa de carbonato de sódio - 1,8 mmol/l e bicarbonato de sódio - 1,7 mmol/l	Solução aquosa de ácido sulfúrico - 50 mmol/l	1
Determinação de ácidos carboxílicos - Exclusão de Iônica	861 - Advanced Compact IC	838 - Advanced Samplo Processor	Metrosep Organic Guard/ 4.6	Metrosep Organic Acids 250/7.8	Não há	Membrana de Poliamida	Solução aquosa de ácido perclórico - 0,8 mmol/l + 2% de acetonitrila	Solução aquosa de cloreto de lítio - 50 mmol/l	1

* PCC - Coluna Pré-Concentradora de íons

4.4.3 Análises moleculares

Para a quantificação do *DNA* total das culturas microbianas, alíquotas de 10 mL dos cultivos foram centrifugados por 10 min a 13.000g, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido à lise para purificação do *DNA* pelo *kit Power Water*[®] da MO BIO, conforme as instruções do fabricante. A concentração de *DNA* foi determinada por espectrofotometria no equipamento *NanoDrop 2000*[®] da ThermoScientific.

A seguir, o *DNA* total extraído e purificado foi utilizado como molde para a amplificação das regiões alvo do ribossomo (gene 16S do *RNA* ribossomal para *Bacteria* e *Archaea* – 16S *rDNA* ou *rrs*), através da técnica de *PCR*, a fim de verificar a presença desses grupos nos diferentes cultivos. Para confirmação da amplificação, os produtos de *PCR* foram resolvidos em gel de agarose 1%, corado com *SYBR*[®] *Safe DNA Gel Stain*, pela equipe daquele laboratório.

A quantificação dos genes *dsr* e *rrs* pela técnica de *qPCR* foi realizada pelo Laboratório de Genética Microbiana do Instituto de Microbiologia da UFRJ, com base na equação da curva padrão gerada para cada gene.

A *PCR* quantitativa é uma variante da técnica de *PCR*, utilizada quando se faz necessário quantificar os produtos da amplificação de um gene ou sequência de interesse (gene alvo). Neste trabalho, a técnica de *qPCR* foi usada para quantificar as bactérias totais, usando-se como alvo o gene *rrs* (16S *rDNA*), e as BRS, através da quantificação do gene *dsr*, que codifica a enzima redutase dissimilativa de sulfato, que promove a redução de sulfato a sulfeto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação da massa de *DNA* total das culturas microbianas (BRS, BRNorg e BRN-OS) para padronização do inóculo

A coleta e interpretação de dados científicos, sobretudo quando envolve a atividade de microrganismos, depende essencialmente de que eles sejam representativos e confiáveis. Para tanto, a exceção dos parâmetros a serem avaliados, os demais devem estar normatizados.

Assim, considerando a importância da interação dos microrganismos para avaliar o efeito do nitrato na biogênese do sulfeto, primeiramente foi dada atenção a garantir a obtenção de um inóculo padronizado, tanto quanto possível, em termos qualitativos e quantitativos. Com este propósito foi adotada a quantificação da massa de *DNA* total de cada cultura microbiana para definir a estratégia de inoculação. Além disto, deve ser considerada a dificuldade de realizar a quantificação pela metodologia tradicional, o cultivo, para microrganismos termofílicos e hipertermofílicos, uma vez que podem ocorrer alterações na composição dos meios em temperaturas mais elevadas por períodos prolongados.

Conforme apresentado na Tabela 14, foi possível extrair *DNA* de todos os cultivos obtidos a partir da prévia inoculação (6 meses de adaptação aproximadamente) de amostra oriunda de um poço produtor de um reservatório de petróleo, cultivada subsequentemente em meios específicos para BRS, BRNorg e BRN-OS, em distintas temperaturas. No entanto, verifica-se que a quantidade de *DNA* diminui consideravelmente à medida que aumenta a temperatura dos cultivos. Também cabe salientar que as BRN-OS, comparativamente as demais populações microbianas analisadas, apresentaram reduzido crescimento, particularmente quando incubadas a 30 °C. Aparentemente, o número de microrganismos termofílicos e, principalmente dos hipertermofílicos, já era baixo no inóculo inicial e não foi estabelecida condição favorável para o desenvolvimento destes microrganismos.

Tabela 14: Quantificação em massa de *DNA* Total (ng/ μ L).

	30 °C	55 °C	80 °C
BRS	845,01	54,6	23,3
BRNorg	626,6	144,6	24,4
BRN-OS	72	40	10

A seguir, o *DNA* total de cada amostra foi submetido à *PCR* a fim de verificar a presença de bactérias e arqueias. A Figura 7 apresenta a imagem do gel de agarose com os produtos amplificados por *PCR* para *Bacteria* (gene *rrs*). Verifica-se que, com exceção das amostras dos cultivos de BRS, BRN-OS e BRNorg a 80°C, todas as demais amostras contêm bactérias.

É importante ressaltar que os *DNA*s das culturas incubadas à 30 e 55 °C foram extraídos dos sub-cultivos da amostra original, enquanto os cultivos à 80 °C foram obtidos a partir dos cultivos previamente incubados à temperatura de 55 °C (Figura 6). Portanto, é bem possível que, durante esse período, tenham sido perdidas algumas espécies que só poderiam sobreviver em condições extremas de temperatura.

Cabe salientar também que, com exceção do meio de cultura para BRS Termofílicas (Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7), os demais meios de cultura utilizados no preparo dos inóculos foram desenvolvidos para cultivos à 30 °C. A composição destes meios também pode ter reduzido as chances de recuperar grupos bacterianos termofílicos.

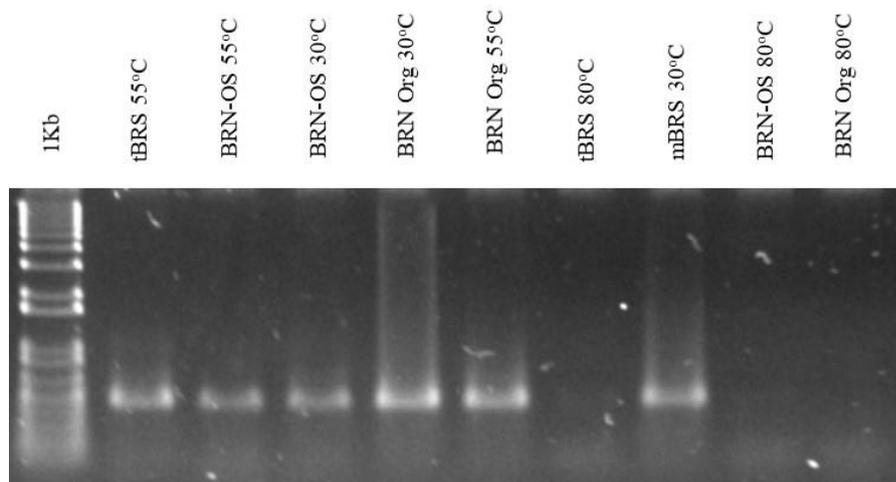


Figura 7: Gel de agarose (1%) mostrando a presença de algumas populações bacterianas em diferentes temperaturas. Resultados obtidos a partir da amplificação do gene *rrs* (iniciadores específicos para *Bacteria*) pela técnica de *PCR*.

Na Figura 8 pode-se observar o gel de agarose com os produtos amplificados por *PCR* para o gene *rrs* de *Archaea*. Verifica-se que apenas três amostras apresentaram bandas no gel: t-BRS a 55 °C, e BRN-OS à 30 e 55 °C (vide retângulo vermelho na Figura 8). As arqueias possuem estruturas de parede celular e de membrana celular que permitem sua sobrevivência em ambientes extremos, como aqueles com temperaturas elevadas (MADIGAN et al., 2016). Porém, o cultivo de arqueias anaeróbicas é dificultado pelo fato de serem extremamente sensíveis ao oxigênio (ROTHER; THOMM, 2000). Assim, se a amostra original não foi

devidamente coletada no reservatório ou acondicionada, isto é, mantida em atmosfera isenta de oxigênio, pode ter comprometido a atividade das arqueias. Além disso, o cultivo e a incubação das amostras não foram feitos em meios específicos para arqueias, mas sim em meios próprios para bactérias, o que pode ter reduzido ainda mais as chances de sua sobrevivência.

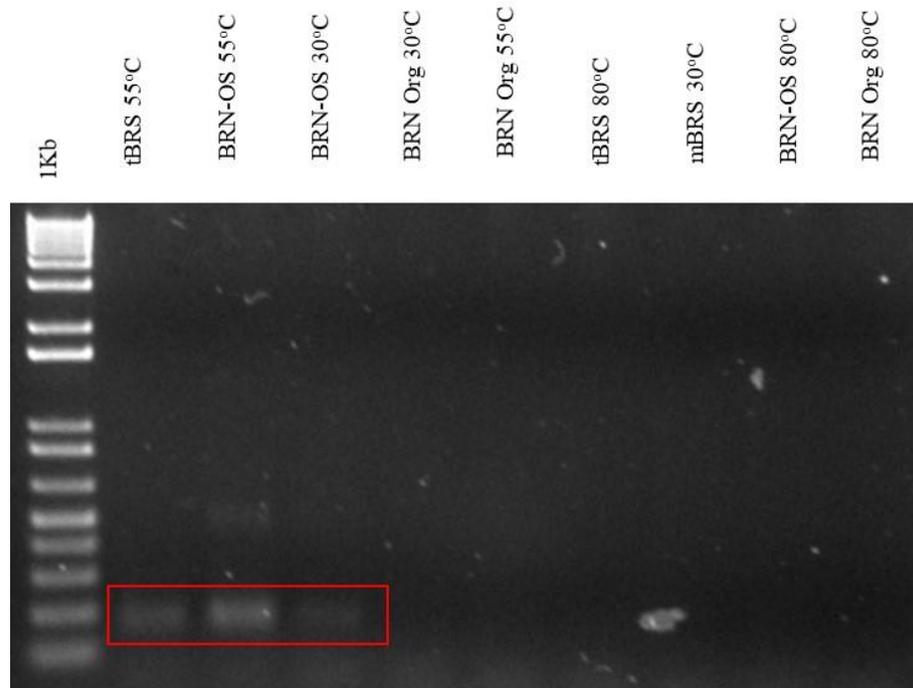


Figura 8: Gel de agarose (1%) para mostrando a presença de arqueias em diferentes temperaturas. Resultados obtidos a partir da amplificação do gene *rrs* (iniciadores específicos para *Archaea*) pela técnica de *PCR*.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 14, foram calculados os volumes de cada cultura para emprego como inóculo nos ensaios de contato. O cálculo do volume foi realizado de maneira que se estabelecesse uma quantidade igual de *DNA* de cada grupo no teste. Os volumes de cada cultura são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Volume em mililitro (mL) dos inóculos utilizados no ensaio.

	30 °C	55 °C	80 °C
BRS	2,2	34,8	81,5
BRNorg	3,0	13,1	77,9
BRN-OS	26,4	47,5	190,0

5.2 Crescimento microbiano através da quantificação pelo NMP

5.2.1 BRS, BRNorg e BRN-OS

As Tabela 16, Tabela 17 e Tabela 18 apresentam os resultados obtidos para a quantificação microbiológica de BRS, BRNorg e BRN-OS nas condições definidas pelo delineamento experimental.

O crescimento das BRS foi determinado pelo enegrecimento acentuado do meio, o que se deve à formação de FeS (sulfeto de ferro), em consequência da reação entre o H₂S gerado pelas BRS e o ferro constituinte do meio.

O crescimento das BRNorg foi constatado pela turbidez do meio em associação à reação de diazotação.

O crescimento das BRN-OS foi determinado pela reação de diazotação.

Tabela 16: Resultados de BRS (mesofílicas e termofílicas) expressos em NMP/mL em diferentes condições experimentais

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
30	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
90	80	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
50	80	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
90	30	3,5E+01	9,3E+01	1,2E+06	9,3E+05	4,3E+05
50	30	9,3E+01	4,3E+02	4,4E+05	4,3E+05	9,3E+04
70	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
70	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01

Tabela 17: Resultados de BRNorg (mesofílicas e termofílicas) expressos em NMP/mL em diferentes condições experimentais

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	<3,0E-01	<3,0E-01	7,4E-01	3,6E-01	<3,0E-01
30	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
90	80	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
50	80	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
90	30	4,6E+06	>1,4E+07	>1,4E+07	>1,4E+07	1,5E+01
50	30	1,5E+06	>1,4E+07	4,6E+06	2,1E+06	1,1E+03
70	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	2,3E+01	<3,0E-01
70	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	9,3E+00	<3,0E-01

Tabela 18: Resultados de BRN-OS (mesofílicas e termofílicas) expressos em NMP/mL em diferentes condições experimentais

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	<3,0E-01	<3,0E-01	4,3E+01	<3,0E-01	<3,0E-01
30	55	<3,0E-01	<3,0E-01	1,5E+00	<3,0E-01	<3,0E-01
90	80	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
50	80	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
90	30	4,3E+05	2,1E+06	>1,4E+07	>1,4E+07	3,6E+03
50	30	7,5E+05	>1,4E+07	1,1E+07	>1,4E+07	2,3E+03
70	55	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01	<3,0E-01
70	55	<3,0E-01	<3,0E-01	2,3E+00	<3,0E-01	<3,0E-01

As Figura 9, Figura 10 e Figura 11 mostram o comportamento das BRS, BRNorg e BRN-OS, respectivamente, ao longo do tempo, nos 8 ensaios do planejamento experimental definido para este trabalho, considerados como variáveis independentes a concentração de nitrato e a temperatura.

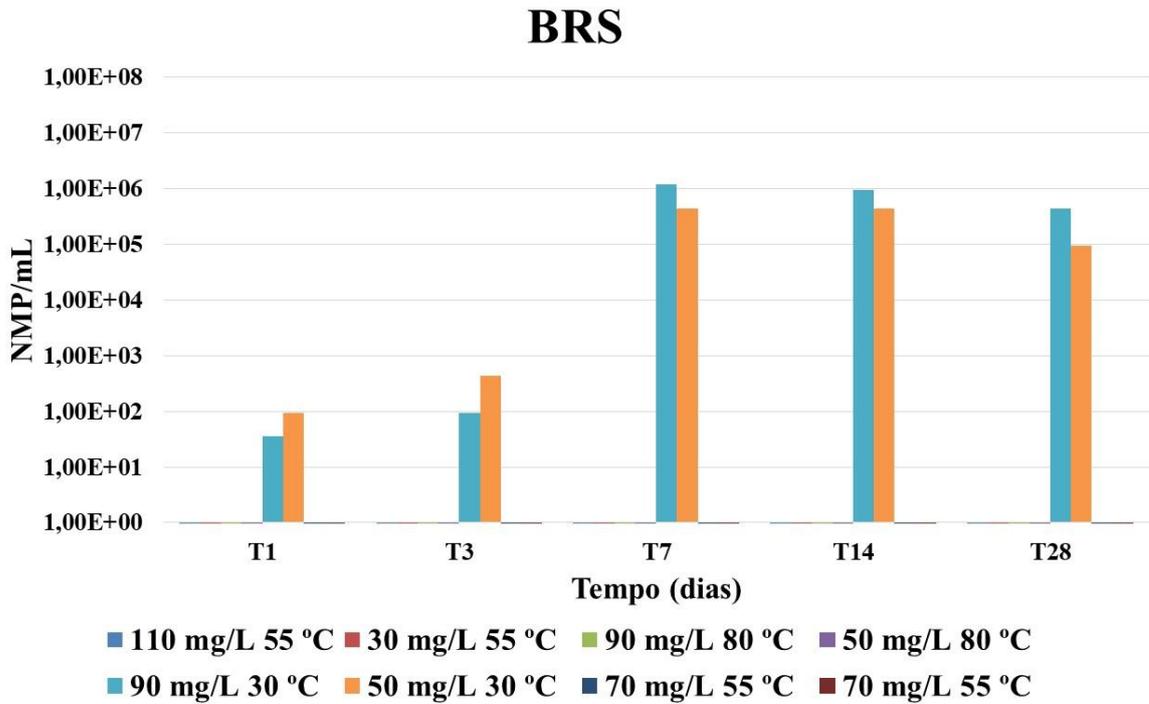


Figura 9: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para as BRS.

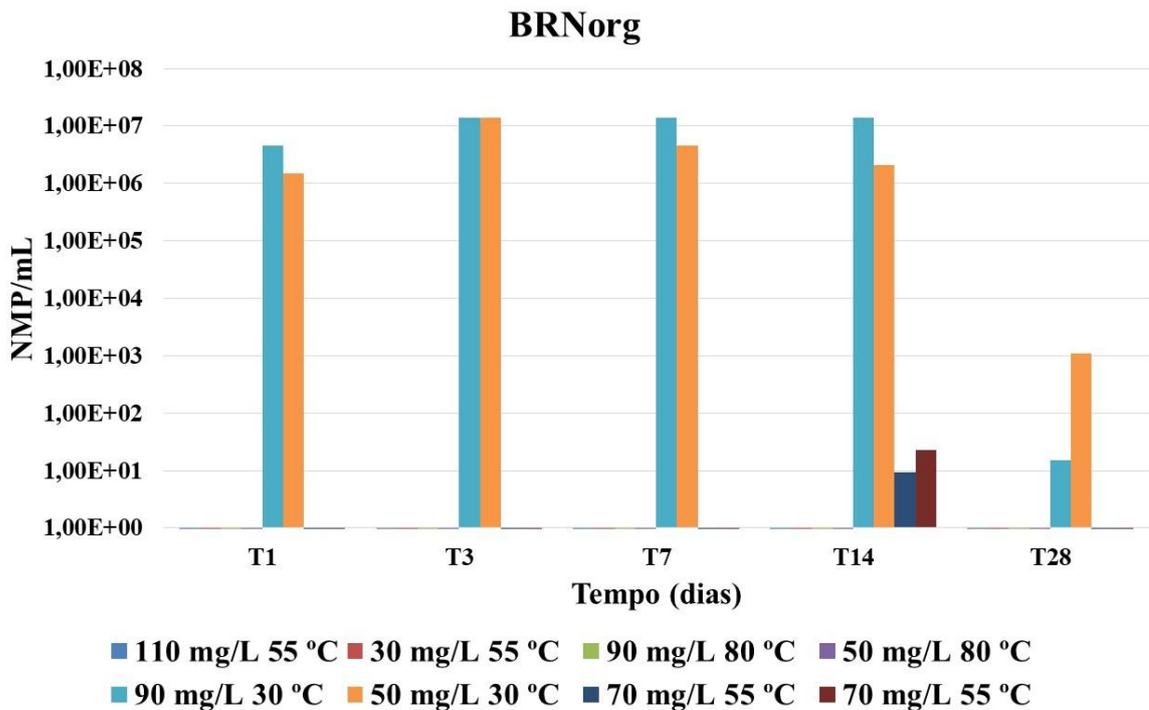


Figura 10: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para as BRNorg.

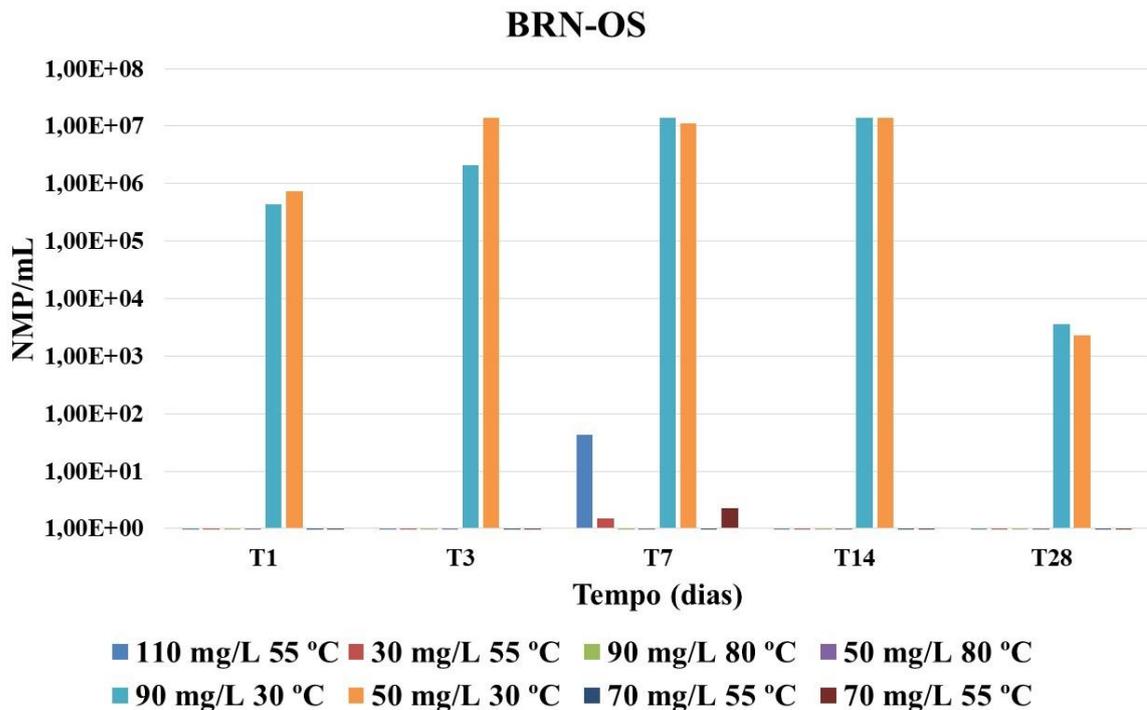


Figura 11: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para as BRN-OS.

É possível observar que, a 30°C, as BRS apresentaram um ligeiro crescimento do primeiro para o terceiro dia (Figura 9). Entretanto, houve um aumento considerável, cerca de 4 ordens de grandeza, no sétimo dia, mantendo-se o valor praticamente inalterado até o último dia do ensaio (vigésimo oitavo dia), nas concentrações de 50 e 90 mg/L de nitrato. Já os sistemas incubados em temperaturas mais elevadas resultaram na inibição do crescimento das BRS.

O ligeiro aumento de BRS evidenciado no início do ensaio pode estar relacionado à atividade de algumas espécies de BRS que são capazes de crescer utilizando nitrato como aceptor final de elétrons (MARIETOU, 2016; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2015). *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 é um exemplo de BRS capaz de utilizar a redução dissimilativa do nitrato, na ausência de sulfato (MARIETOU; GRIFFITHS; COLE, 2009).

Os microrganismos heterotróficos, como é o caso da maioria das BRS, podem responder de forma diferenciada a diferentes níveis de temperatura (GOLDHABER, 2011; KIRCHMAN; MALMSTROM; COTTRELL, 2005). Em estudos de campo, VOORDOUW et al. (2007) mostraram que as taxas de acidulação biogênica, e, portanto, a atividade das BRS eram controladas pela temperatura. A maioria das BRS são mesofílicas, mas podem sobreviver até 60°C (ZHANG; WEN; CAO, 2011). No entanto, segundo COSTERTON et al. (1995) existem espécies de BRS hipertermofílicas, com temperatura ótima de crescimento acima de 60°C.

À medida que o reservatório vai se tornando maduro, aumenta o volume de água injetada, o que leva ao resfriamento das zonas próximas aos poços injetores, que por sua vez favorece o crescimento de BRS mesofílicas. Por outro lado, em zonas do reservatório mais distantes do poço injetor, ou seja, mais profundas, deve-se considerar que o crescimento das BRS termofílicas ou hipertermofílicas é maior (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Por isso, não há consenso se a produção ocorre principalmente perto do poço injetor ou ocorre indistintamente em zonas de temperatura elevadas (LAMBO et al., 2008).

Como previsível, tanto as BRNorg quanto as BRN-OS apresentaram comportamento bem distinto ao das BRS (Figura 9, Figura 10 e Figura 11), uma vez que a presença de nitrato estimula a competição entre elas pelas fontes de carbono disponíveis (MYHR et al., 2002). Evidencia-se uma elevada concentração de bactérias redutoras de nitrato desde o primeiro dia de ensaio; valor que se manteve até o 14º dia, com considerável decaimento no 28º dia.

Como citado anteriormente, o metabolismo dos microrganismos redutores de nitrato, por ser mais acelerado do que o das BRS, consome o nitrato disponível nos primeiros dias de ensaio. Assim, as BRS conseguem crescer notadamente somente após a supressão do nitrato (Figura 13). Também foi observado por SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO (2010) que à medida que o nitrato é consumido e não é feita uma nova aplicação, as BRS voltam a consumir o sulfato disponível no meio, retomando seu crescimento. Daí a importância da adição periódica de nitrato como controle da biogênese de sulfeto em reservatórios.

Em relação à temperatura, é possível observar uma maior influência no controle microbiano a partir de 55 °C. Isso, provavelmente, se deve a possíveis perdas das comunidades termofílicas quando as populações microbianas, ao longo dos meses prévios ao experimento, foram cultivadas em meios de cultivos não específicos para temperaturas mais altas (exceto no caso das BRS termofílicas que foram cultivadas em meios específicos a 55 °C).

É importante salientar que, neste tópico, estão sendo avaliados os resultados encontrados a partir da quantificação microbiológica baseada em técnica convencional de cultivo. Como organismos de ambientes mais extremos são mais difíceis de serem cultivados, as técnicas moleculares podem ser mais apropriadas nestes casos.

5.3 Sulfeto Total

A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos para a quantificação do teor de sulfeto gerado, em mg/L, nas condições definidas pelo delineamento experimental.

Tabela 19: Resultados de quantificação do teor de sulfeto total gerado (mg/L) nos 5 tempos avaliados no planejamento experimental, pela técnica da titulação potenciométrica.

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	2,88	2,67	5,26	6,53	13,42
30	55	2,92	2,51	5,76	7,45	9,70
90	80	2,40	2,44	2,93	3,78	10,28
50	80	2,59	1,50	5,87	5,89	7,63
90	30	2,61	6,55	139,06	176,82	191,58
50	30	2,65	5,08	199,49	174,22	158,49
70	55	4,65	3,46	5,05	4,73	6,60
70	55	3,22	2,79	9,87	5,02	5,40

Com os dados da Tabela 19 foi construído um gráfico para obter o perfil da concentração de sulfeto total (Figura 12) e, assim, melhor evidenciar a influência de cada variável estudada (concentração de nitrato e temperatura) sobre a geração de sulfeto total ao longo do tempo.

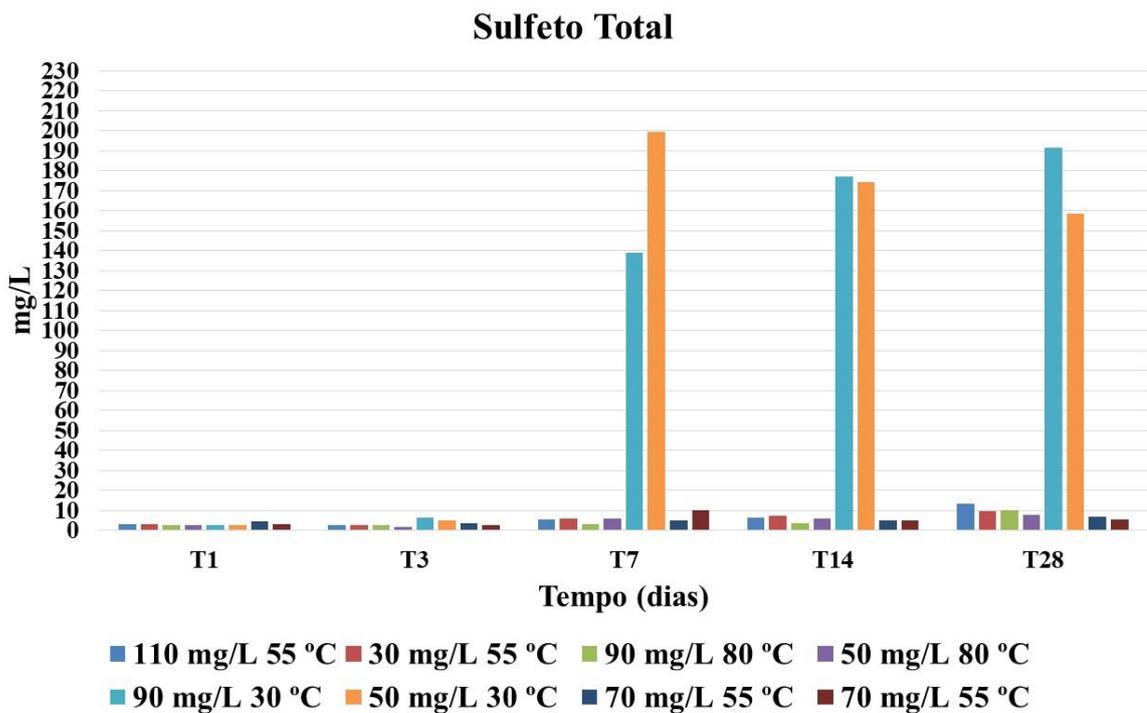


Figura 12: Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura ao longo do tempo para a geração de Sulfeto Total.

5.4 Nitrato

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos para concentração de nitrato, em mg/L, cujo valor inicial no meio de contato se encontrava abaixo do limite inferior de detecção do método adotado para sua quantificação. Segue a Figura 13 construída com os dados compilados na Tabela 20 para análise da influência da concentração de nitrato e temperatura sobre o consumo do nitrato, ao longo do tempo.

Tabela 20: Concentração de nitrato (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	110	220	150	120	110
30	55	38	40	54	39	64
90	80	85	100	95	100	110
50	80	65	56	61	78	64
90	30	1,4	N.D.	<1,0	9	52
50	30	12	N.D.	9,1	4,2	39
70	55	75	81	78	88	68
70	55	69	100	83	82	69

Os maiores consumos de nitrato ocorrem quando os ensaios foram mantidos a 30 °C. Porém, conforme a temperatura aumenta, o nitrato é preservado e, em alguns casos, verifica-se inclusive seu aumento.

As concentrações de BRNorg e BRN-OS nos ensaios à 30 °C aumentaram até os 14 dias de experimento, confirmando o consumo biológico deste composto, já que o metabolismo desses grupos é mais rápido, consumindo o nitrato mais rapidamente do que as BRS. Quando ocorre a prevalência das BRS (28º dia), verifica-se aumento da concentração de nitrato no meio reacional, ficando acima das concentrações dosadas inicialmente. Uma hipótese para a formação de nitrato é a oxidação da amônia, processo chamado anamox.

Para avaliar esse aumento na concentração de nitrato nas temperaturas acima de 55 °C, foi realizado um ensaio abiótico a fim de verificar se este aumento se deve ao consórcio microbiano utilizado ou se há uma influência físico-química.

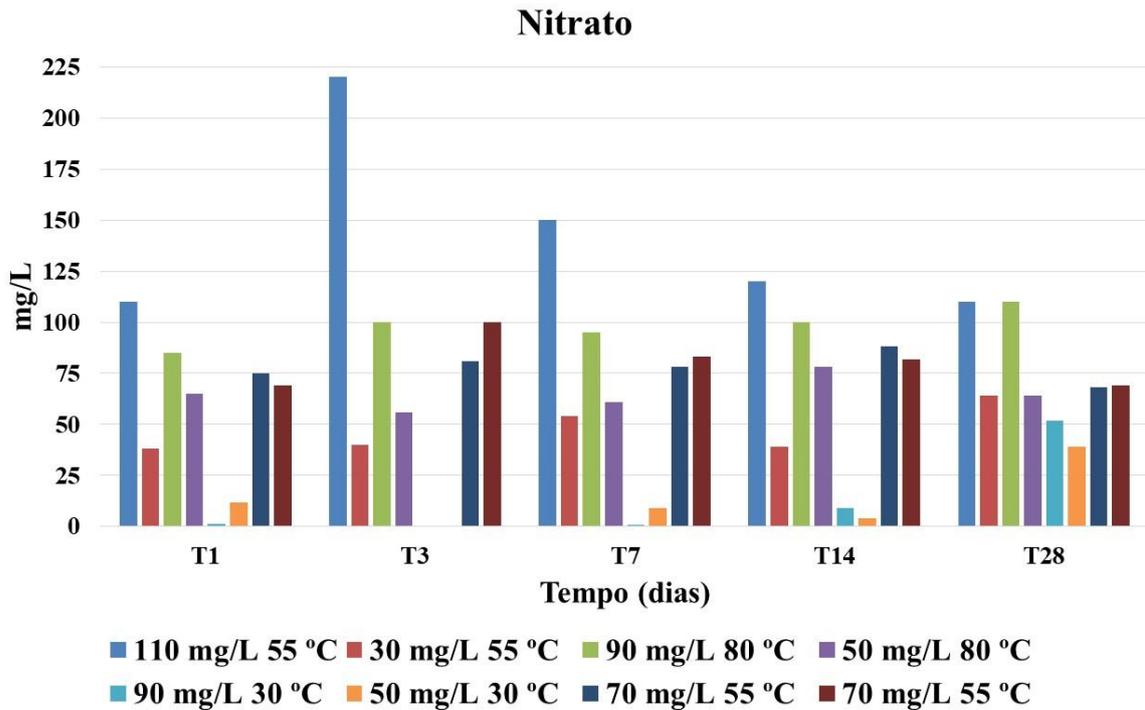


Figura 13: Quantificação da concentração de nitrato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).

Para isso, foi utilizado o mesmo produto (nitrato de cálcio) e o mesmo meio de cultura de contato descrito na Tabela 2. Foi selecionada a maior concentração de nitrato testada, 110 mg/L, avaliada nas três temperaturas e nos mesmos tempos adotados na execução dos ensaios bióticos.

A concentração inicial de nitrato no teste abiótico foi <math><1,0\text{ mg/L}</math> nos frascos sem adição de nitrato. Não houve quantificação inicial nas amostras com adição de nitrato. Por isso, considerou-se que a dosagem inicial nesses frascos era de 110 mg/L.

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para concentração de nitrato, em mg/L, nos ensaios abióticos, que foram utilizados na construção da Figura 14.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 21 e com o gráfico da Figura 14, foi possível quantificar nitrato nos frascos que não receberam o composto inicialmente, após 14 dias de incubação, nas 3 temperaturas testadas. Após esse período, a concentração do nitrato cai, chegando quase a zero, de 2-13 mg/L.

Tabela 21: Concentrações de nitrato (mg/L) determinadas para ensaios abióticos em diferentes temperaturas e tempos.

Nitrato mg/L	Temperatura (°C)	T1	T3	T7	T14	T28
0	30	<1	<1	<1	88	2
0	55	<1	<1	<1	77	5
0	80	<1	<1	<1	81	13
110	30	146	143	142	166	143
110	55	155	119	128	166	121
110	80	117	132	137	162	110

Na Figura 14, observa-se também um aumento nas concentrações de nitrato nos frascos aos quais foram adicionados, inicialmente, 110 mg/L do composto. Só que, neste caso, o aumento aconteceu logo no primeiro dia de incubação, e se manteve oscilando ao longo do tempo, caindo apenas no último tempo do ensaio, mas se mantendo a ordem de grandeza.

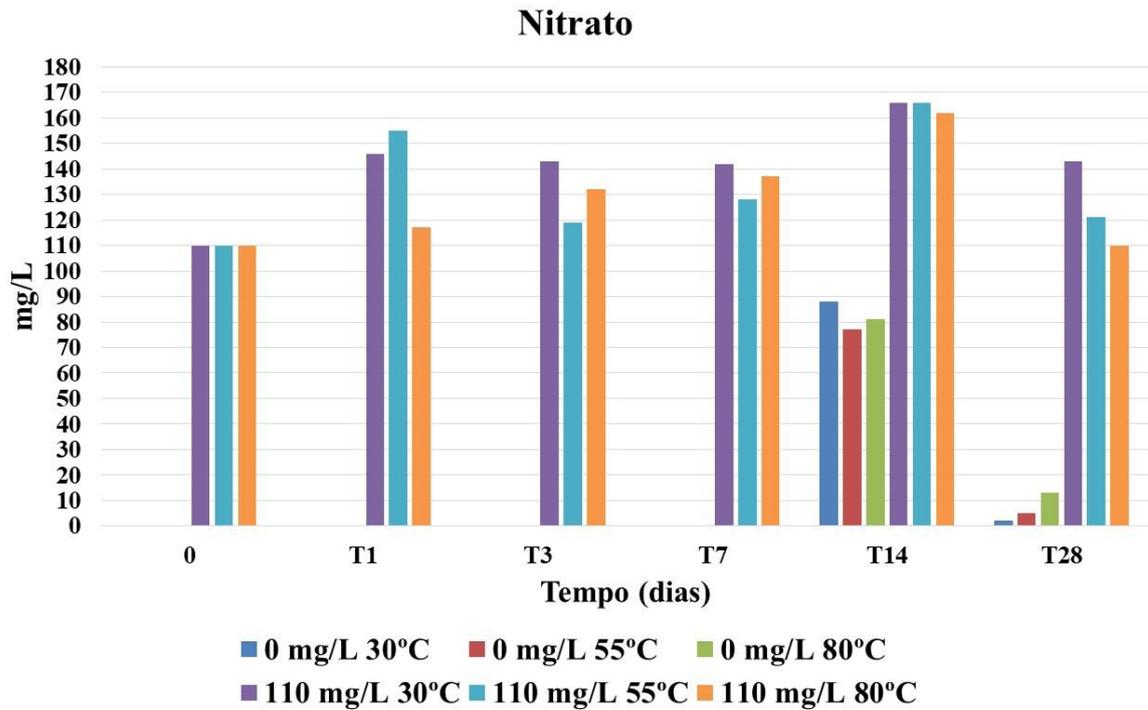


Figura 14: Concentração de nitrato em mg/L no ensaio abiótico.

Avaliando a composição do meio de cultura de contato (Tabela 2 e Tabela 3), percebe-se que somente o extrato de levedura poderia ser metabolizado ao longo do tempo com geração de nitrato, porém não foi possível realizar as devidas análises para verificar essa hipótese.

Portanto, não se pode inferir que o aumento do teor de nitrato nas maiores dosagens e temperaturas, observado no ensaio biótico, possa ser atribuído a uma produção biológica.

5.5 Nitrito

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para concentração de nitrito, em mg/L, cujo valor inicial no meio de contato foi de 4,5 mg/L. A Figura 15, construída a partir dos dados desta tabela, permite melhor identificar o perfil das condições estudadas (concentração de nitrato e temperatura) sobre o consumo/produção do nitrito, ao longo do tempo.

Tabela 22: Concentração de nitrito (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	6,3	1,5	8,9	4,6	7,0
30	55	7,6	5,9	9,0	9,0	9,4
90	80	10,0	6,1	9,2	19,0	7,3
50	80	10,0	7,3	9,3	20,0	7,2
90	30	5,3	7,6	15,0	16,0	15,0
50	30	11,0	8,0	14,0	12,0	15,0
70	55	8,6	9,5	12,0	12,0	10,0
70	55	8,2	8,3	11,0	9,8	10,0

Analisando a Figura 15, para os tempos de 1, 3 e 7 dias, tem-se que na temperatura de 30 °C, conforme aumentam as dosagens de nitrato, são menores as concentrações de nitrito. Em alguns casos, quando as dosagens de nitrato estão próximas ao ponto central (70 mg/L), a concentração de nitrito diminui, mesmo em temperaturas mais elevadas.

Cabe lembrar que o nitrito é gerado a partir do metabolismo da redução do nitrato, e que temperaturas mais altas podem reduzir o crescimento e, conseqüentemente, o metabolismo microbiano. Portanto, esperava-se uma menor geração de nitrito nas temperaturas superiores avaliadas neste planejamento.

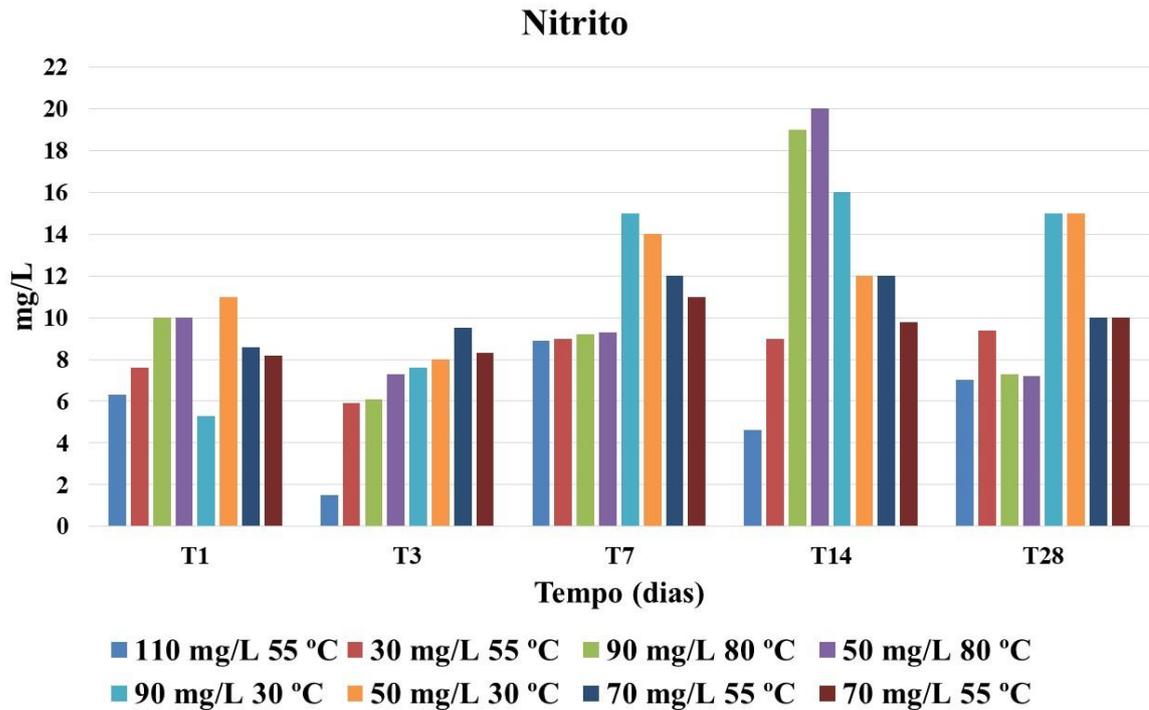


Figura 15: Concentração de nitrito (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).

No tempo de 28 dias, não se nota influência da concentração de nitrato sobre as concentrações de nitrito à 30 °C. Para o menor tempo, tem-se que a concentração de nitrito aumenta na maior temperatura, enquanto que não se observa o aumento do nitrito nesta condição no maior tempo experimental.

A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos para concentração de nitrito, em mg/L, nos ensaios abióticos. A concentração inicial de nitrito no teste abiótico foi de <1,0 mg/L nos frascos sem adição de nitrato.

Nenhuma concentração de nitrito foi observada, todas as análises ficaram abaixo do limite de detecção do método. Ou seja, não houve a formação deste composto através da degradação do nitrato.

Tabela 23: Concentrações de nitrito (mg/L) determinadas para ensaios abióticos em diferentes temperaturas e concentrações de nitrato.

Nitrato mg/L	Temperatura (°C)	T1	T3	T7	T14	T28
0	30	<1	<1	<1	<1	<1
0	55	<1	<1	<1	<1	<1
0	80	<1	<1	<1	<1	<1
110	30	<1	<1	<1	<1	<1
110	55	<1	<1	<1	<1	<1
110	80	<1	<1	<1	<1	<1

A partir dos resultados acima podemos afirmar que todo o nitrito encontrado nos experimentos bióticos (Tabela 22 e Figura 15) são de origem biológica, presumivelmente a partir da redução do nitrato.

5.6 Análises moleculares – *qPCR*

A análise de *qPCR* foi utilizada com o intuito de estimar a abundância de bactérias totais (gene *rrs*) e de BRS (gene *dsr*) presentes nas amostras do delineamento experimental. A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos para os tempos 1, 7 e 28 dias.

A análise dos resultados da quantificação do gene *rrs* permite notar a interferência dos parâmetros estudados (temperatura e concentração de nitrato) sobre a comunidade bacteriana total presente nas amostras. O aumento da temperatura foi determinante para a diminuição da abundância do gene *rrs*, sendo os maiores valores observados à temperatura de 30 °C, de até duas ordens de grandeza. E, como esperado, nas amostras submetidas à temperatura de 80°C foram detectados os menores valores de abundância relativa do gene *rrs*, indicando que tal condição acarretou o maior impacto na comunidade bacteriana total presente.

Tabela 24: Resultados da quantificação dos genes *rrs* e *dsr*, pela técnica de *qPCR*, para estimativa da concentração de BRS e bactérias totais no meio de contato após 1, 7 e 28 dias de ensaio.

Nitrato mg/L	Temperatura °C	BRS (gene <i>dsr</i>)			Totais (gene <i>rrs</i>)		
		t1	t7	t28	t1	t7	t28
110	55	A.L.	A.L.	A.L.	6,30E+03	4,40E+07	2,10E+07
30	55	A.L.	A.L.	A.L.	3,10E+05	2,50E+07	3,40E+07
90	80	A.L.	A.L.	A.L.	6,60E+05	2,10E+04	A.L.
50	80	A.L.	A.L.	A.L.	2,80E+05	6,90E+04	1,80E+04
90	30	A.L.	4,00E+03	1,42E+04	6,60E+07	1,70E+07	7,50E+09
50	30	A.L.	1,23E+03	4,59E+02	1,50E+08	2,20E+05	6,50E+07
70	55	A.L.	7,30E+01	A.L.	9,20E+06	5,00E+07	2,10E+08

A.L.: Abaixo do limite de detecção do método

Os resultados da quantificação do gene *dsr*, presente nas bactérias redutores de sulfato, revelaram que a adição do nitrato parece estar relacionada ao controle do crescimento de bactérias redutoras de sulfato, pois o gene só foi detectado em amostras com 90 mg/L de nitrato a 30 °C, 50 mg/L de nitrato a 30 °C e 70 mg/L de nitrato a 55 °C. Entretanto, estranhamente, este gene não foi detectado nestas amostras com 1 dia de incubação.

Considerando a análise ao longo do tempo, somente na amostra com 90 mg/L de nitrato a 30 °C a adição de nitrato não se mostrou eficiente, já que a abundância do gene *dsr* foi crescente e o maior valor foi observado na amostra de 28 dias.

Em um experimento típico de análise de comunidades, o *DNA* total é isolado diretamente a partir do habitat microbiano (MADIGAN et al., 2016). Neste estudo, o *DNA* total foi extraído de cultivos, utilizados como inóculos, resultantes de subseqüentes transferências para novos meios, ao longo de seis meses. Para iniciar o experimento, conforme descrito na Tabela 15, distintos volumes de inóculos foram definidos a partir da quantificação do *DNA* total de cada meio de cultivo específico, e não do *DNA* específico de cada grupo. Portanto, é possível que, ao adicionar os diferentes inóculos ao meio de contato, nas quantidades definidas a partir do *DNA* total, a quantidade de BRS inicial tenha sido muito pequena, prejudicando sua detecção pela técnica de *qPCR*.

Cabe lembrar que, em função da quantificação do *DNA* total, o volume definido para a retirada de inóculo do meio de cultivo específico de BRS (Postgate E modificado) foi muito pequeno, especialmente, para o cultivo a 30°C (2,2 mL).

A metodologia usada para a quantificação do inóculo dos ensaios (massa de *DNA* total), aliada aos poucos meios de cultivo disponíveis para o crescimento de grupos bacterianos específicos, pode ser a causa das variações dos resultados.

5.7 Concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos de concentração de acetato residual/produzido, em mg/L, a partir do planejamento experimental. A concentração inicial de acetato no meio de contato foi de 2400 mg/L.

Tabela 25: Concentração de acetato residual (mg/L) em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental.

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	2300	1900	1900	1800	1100
30	55	2100	2000	1900	1900	1100
90	80	2500	1900	1900	1700	1000
50	80	2200	1900	1900	1800	1100
90	30	2400	1900	2200	2100	1300
50	30	2100	2200	2500	2200	1200
70	55	2300	1900	2000	1800	1000
70	55	2200	1900	1900	1800	1000

Com os dados da Tabela 25 foi construído um gráfico para obter o perfil da concentração de acetato (Figura 16) e, assim, melhor evidenciar o perfil das condições estudadas (concentração de nitrato e temperatura) sobre o consumo/produção do acetato, ao longo do tempo.

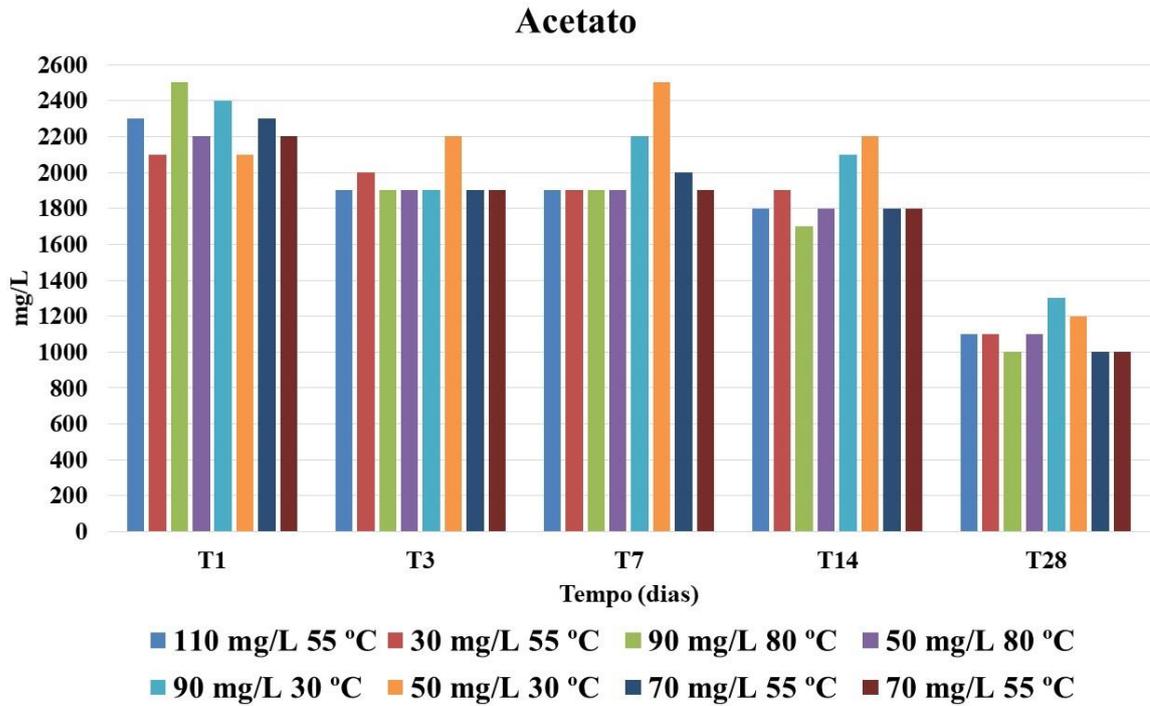


Figura 16: Concentração de acetato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).

Em termos gerais, houve um suave decaimento da concentração de acetato durante o período experimental, sendo o máximo de consumo de cerca 1000 mg/L atingido decorridos 28 dias. No primeiro dia tem-se a ocorrência dos maiores consumos de acetato para as combinações nitrato e temperatura de 50 mg/L e 30 °C e 30 mg/L e 55 °C. Segue-se uma tendência de consumo regular na maioria das condições ensaiadas, evidenciando-se os maiores teores residuais de acetato nos sistemas incubados a 30 °C.

A Tabela 26 apresenta os resultados obtidos para concentração de propionato, em mg/L, cujo valor inicial no meio de contato foi de 570 mg/L. Os dados foram compilados na Figura 17 de modo a facilitar a melhor análise da influência da concentração de nitrato e temperatura sobre o consumo/produção do propionato, ao longo do tempo.

Tabela 26: Concentração de propionato residual (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental

Nitrato mg/L	Temperatura °C	t1	t3	t7	t14	t28
110	55	640	570	500	200	380
30	55	650	600	480	190	370
90	80	540	540	510	220	390
50	80	650	610	540	210	380
90	30	620	520	580	240	370
50	30	640	600	570	240	380
70	55	610	600	490	170	390
70	55	590	580	470	170	360

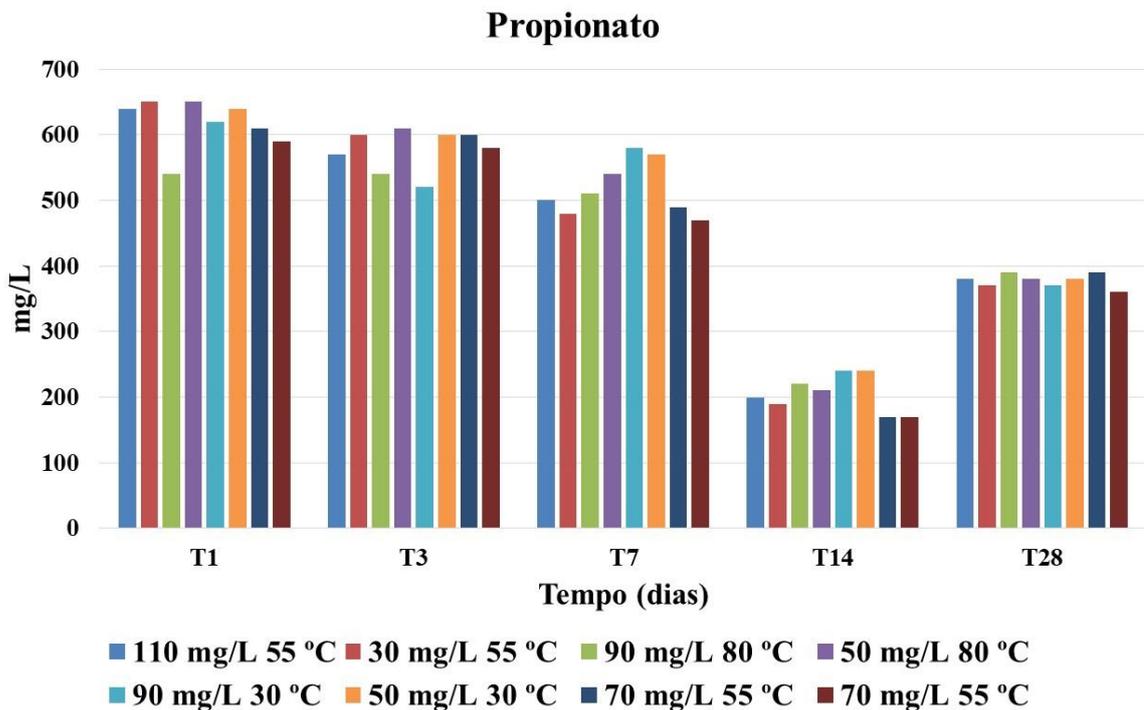


Figura 17: Concentração de propionato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).

Novamente pode-se observar um decaimento gradual da concentração de propionato, embora os valores mínimos residuais tenham ocorrido no 14º dia, com média de consumo de cerca 350 mg/L. Porém, neste caso, houve um aumento da concentração de propionato nos cultivos ao final do período experimental, similarmente em todas as condições testadas.

Na Tabela 27 são apresentados os resultados obtidos para concentração de butirato, em mg/L, cujo valor inicial no meio de contato foi de 62 mg/L. Os dados foram compilados na

Figura 18 de modo a facilitar a melhor análise da influência da concentração de nitrato e temperatura sobre o consumo/produção do butirato, ao longo do tempo.

Tabela 27: Concentração de butirato residual (mg/L) no meio de contato em função de diferentes concentrações de nitrato e temperaturas ao longo do período experimental

Nitrato mg/L	Temperatura °C	Tempo (dias)				
		t1	t3	t7	t14	t28
110	55	56	44	53	20	44
30	55	58	44	54	19	43
90	80	59	39	61	22	45
50	80	58	48	62	22	49
90	30	56	35	100	56	100
50	30	60	41	80	62	42
70	55	57	46	79	18	42
70	55	56	49	61	19	40

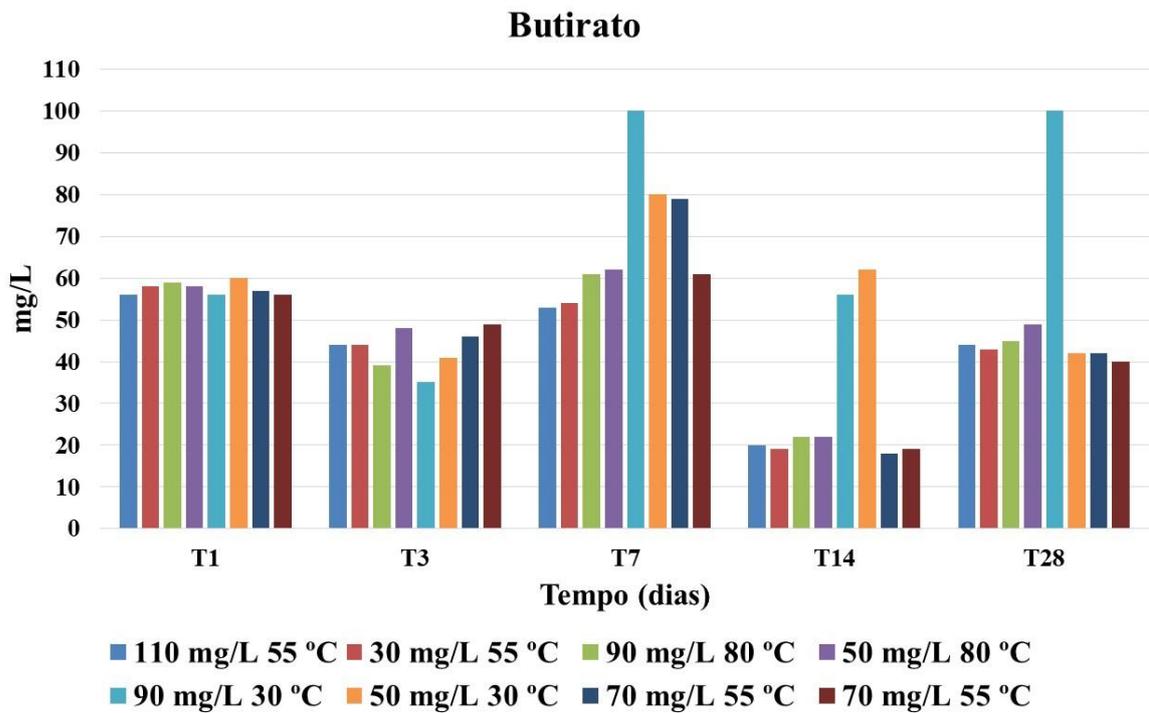


Figura 18: Concentração de butirato (mg/L) em função da concentração de nitrato (mg/L) e da temperatura (°C).

O perfil do consumo de butirato foi bem distinto ao dos demais ácidos orgânicos. Porém, similarmente ao observado para o propionato, em geral, o consumo de butirato foi máximo no 14º dia, correspondendo a cerca de 70 % da concentração inicial. O consumo máximo de

butirato foi bem inferior à temperatura de 30 °C, ao redor de 30 %, independentemente da concentração de nitrato empregada. Também foi observado aumento da concentração acima do nível inicial para algumas condições experimentais.

O acetato, o propionato e o butirato ocorrem em águas produzidas de campos de petróleo e, frequentemente, estes ácidos orgânicos são utilizados para o crescimento microbiano de consórcios provenientes desses campos. Estudos recentes realizados por CHEN et al. (2017), em microcosmos, para a avaliação da cinética de uso destes três componentes para a redução do nitrato e sulfato por um consórcio anaeróbico obtido de um reservatório de petróleo, verificaram que o nitrato foi reduzido primeiro, com preferência pelo acetato e propionato. A redução do sulfato seguiu com propionato (mas não butirato) como doador de elétrons, enquanto a fermentação do butirato (mas não do propionato) foi associada à metanogênese.

Na degradação anaeróbia da matéria orgânica, acetato, propionato e butirato, além do formiato, são intermediários-chave (MAGOT, 2005). Acoplado à redução de sulfato, o acetato é um dos principais metabólitos produzidos na oxidação incompleta de ácidos graxos (MAGOT; OLLIVIER; PATEL, 2000).

Estudos realizados por GRIGORYAN et al. (2008) mostram que o uso de propionato e de butirato pelas BRS na redução de sulfato a sulfeto é acompanhado da produção de acetato. Já a redução do nitrato pelas BRN ocorre com a participação dos três ácidos orgânicos (acetato, propionato e butirato). No estudo atual, foi observada a produção do acetato entre os tempos 3 e 7 dias na condição de 50 mg/L de nitrato a 30 °C, porém nas demais condições observou-se o seu consumo. Já a redução do nitrato foi observada na presença dos 3 compostos.

VAN DEN BRAND et al. (2014) verificaram, em estudos realizados em reatores, que na competição entre BRS e metanogênicas, as BRS superavam as metanogênicas quando lhes era fornecido um substrato com uma mistura de acetato e propionato. Em nosso estudo, observou-se que o acetato foi consumido primeiramente e, depois, o propionato, principalmente nas temperaturas mais altas. Já o butirato apresentou aumento em alguns pontos, não permitindo nenhuma associação entre esses aumentos e o metabolismo microbiano.

5.8 Análise estatística da resposta Sulfeto Total

A partir dos resultados que estão apresentados na Tabela 16 e da equação estabelecida para o Delineamento de Doehlert, foram geradas as matrizes de previsões para os tempos 1, 3, 7, 14 e 28 dias, as quais são apresentadas no Apêndice B. Essas matrizes permitem avaliar a influência de cada variável estudada (concentração de nitrato e temperatura) sobre o teor de

sulfeto total gerado, ao longo do tempo, e foram utilizadas para gerar os gráficos de superfície de resposta, mostrados a seguir na Figura 19.

No tempo 1 dia, a previsão sugere uma tendência de menores concentrações de H_2S nos extremos de concentração de nitrato (inferior e superior). As maiores concentrações de H_2S são previstas apenas para as concentrações médias de nitrato. No entanto, é possível que o tempo de incubação dos ensaios tenha influenciado esses resultados, visto que o metabolismo do sulfato é bastante lento. O mesmo pode ser dito em relação à variável temperatura.

No tempo 3 dias, a previsão sugere uma tendência de aumento no teor de sulfeto gerado à medida que aumenta a concentração de nitrato dosado. Já o aumento da temperatura tem um efeito oposto, levando à concentrações menores de sulfeto. Retomando os resultados obtidos através do método do NMP, para quantificação de BRS, vê-se que com 3 dias de incubação as concentrações celulares ainda são baixas. Isso está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 30 (Apêndice B), onde os teores de sulfeto gerados neste tempo (3 dias) também são bastante baixos, não muito diferentes daqueles obtidos com um dia de incubação. Por isso, as diferenças encontradas entre os diferentes tratamentos estabelecidos pelo planejamento experimental são muito tênues.

Para o tempo de 7 dias, a previsão sugere uma tendência de redução no teor de sulfeto gerado com o aumento na concentração do nitrato e na temperatura. De acordo com o comportamento da curva da superfície de resposta, a redução nos teores de H_2S pode ser atingida, especialmente, nas dosagens de 110 mg/L de nitrato, em temperaturas entre 30°C e 55 °C. Porém, abaixo dessa dosagem, poderá haver geração de altos teores de H_2S para essa mesma faixa de temperatura. Já temperaturas acima dos 55 °C controlam a geração de H_2S , mesmo com dosagens de nitrato inferiores à citada. Dosagens de nitrato superiores a 70 mg/L, em temperaturas mais elevadas, já seriam eficientes nesse controle.

No tempo 14 dias, a previsão sugere que apenas a temperatura tem influência na diminuição do teor de geração de H_2S . Conforme a temperatura aumenta, o teor de H_2S gerado diminui, com uma redução mais significativa por volta dos 55 °C.

No tempo 28 dias, a previsão sugere que há um aumento da geração de H_2S nas concentrações mais altas de nitrato, nas temperaturas superiores a 30 °C. Porém, após esse período espera-se que o nitrato dosado tenha sido totalmente consumido pelos microrganismos redutores de nitrato. Com isso, as BRS devem voltar a consumir o sulfato disponível e, conseqüentemente, retomar o metabolismo de geração de H_2S , conforme observado na Figura 12.

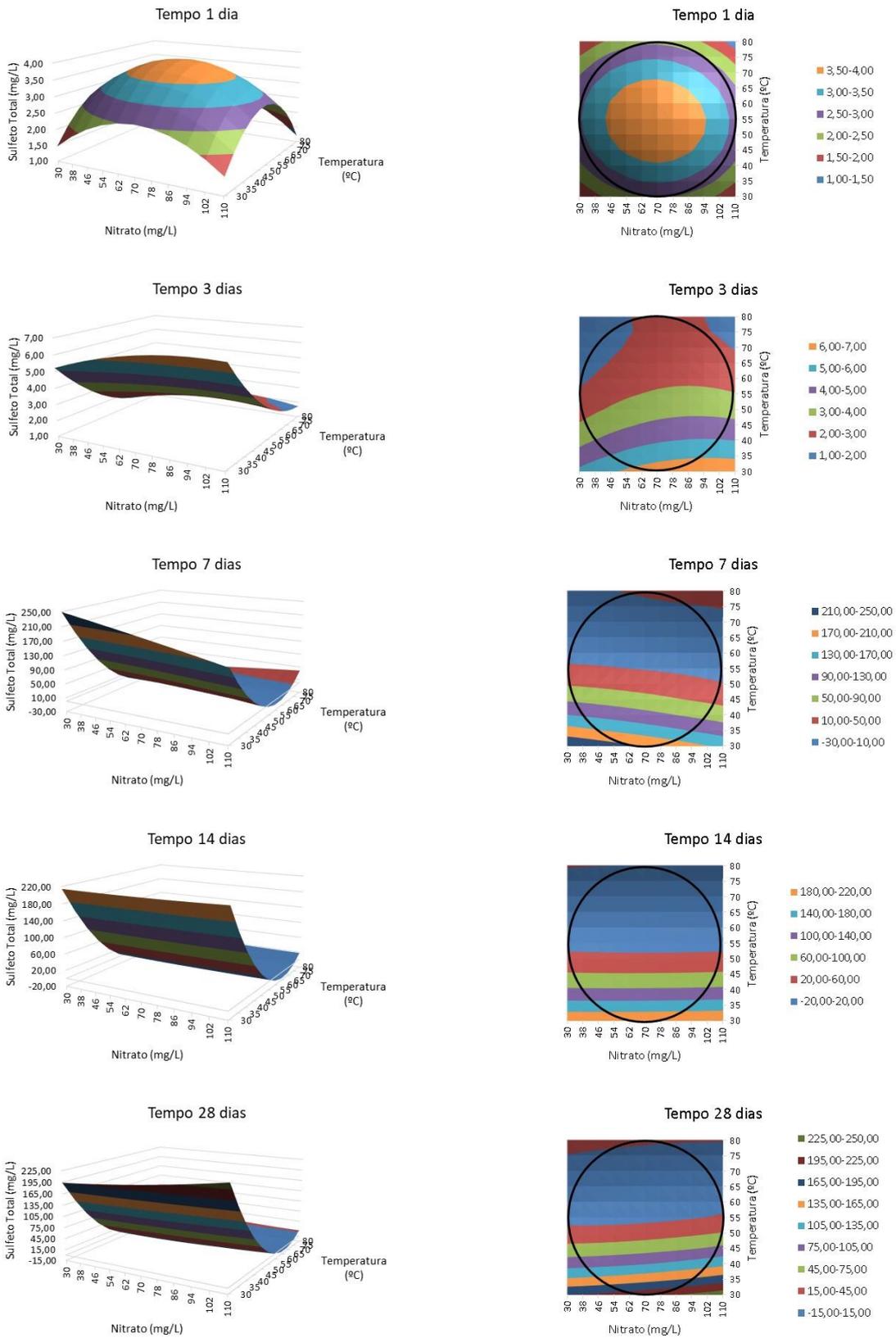


Figura 19: Gráficos de superfície de resposta para quantificação do teor de Sulfeto Total (mg/L) gerado em função da concentração de Nitrato (mg/L) e da Temperatura (°C).

6 CONCLUSÕES

- Houve inibição do metabolismo do sulfato estimulada pela presença do nitrato, resultando na redução da biogênese de H₂S, apesar das BRS ainda estarem presentes no meio reacional; conseqüentemente, com a supressão do nitrato, as BRS voltaram a consumir o sulfato disponível e gerar o H₂S, o que endossa ter o nitrato efeito inibidor sobre o metabolismo de redução de sulfato;
- Dentre os sais de ácidos orgânicos, o acetato foi consumido primeiramente pela comunidade microbiana, sendo seu consumo associado ao metabolismo da redução do nitrato e do sulfato. O propionato foi consumido principalmente em temperaturas mais altas em associação ao metabolismo dissimilativo do sulfato. Já para o butirato, foi observado aumento inespecífico da sua concentração em algumas condições experimentais;
- O consumo de nitrato ocorre em poucas horas, quando a 30 °C e para adição de 50 e 90 mg/L;
- Foi constatada formação de nitrito por ação biológica;
- A mitigação da geração biológica de sulfeto foi constatada em temperaturas próximas a 55 °C e 80 °C em concentrações de nitrato a partir de 70 mg/L. Porém, as reduções mais significativas foram obtidas nas dosagens de 110 mg/L de nitrato;
- Dessa forma, conclui-se que o controle de *souring* poderá ser efetivo em reservatórios com altas temperaturas (≥ 55 °C) nos quais sejam aplicadas dosagens de nitrato de pelo menos 110 mg/L.

7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Validar protocolos para obtenção de culturas enriquecidas de BRS, BRNorg e BRN-OS, termofílicas e hipertermofílicas, a partir de amostras de reservatórios.
- Realizar ensaios de validação estatísticas dos dados obtidos no estudo.
- Avaliar o efeito da periodicidade de adição de nitrato na biogênese do sulfeto em função da temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZUHAIR, S.; EL-NAAS, M. H.; AL-HASSANI, H. Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria. **Journal of Biochemical Technology**, v. 1, n. August, p. 39–44, 2008.

ALVES, T. DE L. **Estudo da formação de incrustações inorgânicas em membranas de nanofiltração utilizadas em processos de dessulfatação**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2006.

AMEND, J. P.; SHOCK, E. L. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 175–243, abr. 2001.

BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. **Sulphate-Reducing Bacteria - Environmental and Engineered Systems**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

BARTON, L. L.; TOMEI, F. . **Characteristics and activities of sulfate reducing. Bacteria. In: Sulphate-reducing bacteria**. Vol 8 ed. New York and London: Biotechnology Handbooks, 1995.

BASTOS, R. K. X. Abastecimento de água para consumo humano. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 195–195, set. 2006.

BENSALAH, W. et al. Thick and dense anodic oxide layers formed on aluminum in sulphuric acid bath. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 113–118, 2010.

BERNARDEZ, L. A. et al. A kinetic study on bacterial sulfate reduction. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 12, p. 1861–1869, 2013.

BØDTKER, G. et al. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 439–450, 2009.

BOYD, E. S. et al. Modeling the Habitat Range of Phototrophs in Yellowstone National Park: Toward the Development of a Comprehensive Fitness Landscape. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

BRASIL. Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes - sal e salmoura. p. 0–98, 9 set. 1999.

BUSCOT, F.; VARMA, A. **Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions**. 1. ed., v. 3, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.

BUXTON, R. Nitrate and Nitrite Reduction Test Protocols. . 2011, p. 1–20.

CALLBECK, C. C.; AGRAWAL, A.; VOORDOUW, G. Acetate production from oil under sulfate-reducing conditions in bioreactors injected with sulfate and nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 5059–5068, 2013.

CANFIELD, D.; DES MARAIS, D. Aerobic sulfate reduction in microbial mats. **Science**, v. 251, n. 5000, p. 1471–1473, 22 mar. 1991.

CARDOSO, E. B. **Análise do tratamento com nitrato em campo de petróleo com biogênese de sulfeto utilizando simulação de reservatório**. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

CHEN, C. et al. Use of acetate, propionate, and butyrate for reduction of nitrate and sulfate and methanogenesis in microcosms and bioreactors simulating an oil reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 7, p. 1–17, 2017.

COCHRANE, W. J. et al. **Studies on the Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria From a Souring North Sea Oil Field**. European Petroleum Conference. **Anais...**Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 1988

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711–745, out. 1995.

CUHEL, R. L.; TAYLOR, C. D.; JANNASCH, H. W. Assimilatory Sulfur Metabolism in Marine Microorganisms - Sulfur Metabolism, Protein-Synthesis, and Growth of *Pseudomonas-Halodurans* and *Alteromonas-Luteo-Violaceus* During Unperturbed Batch Growth. **Archives of Microbiology**, v. 130, n. 1, p. 8–13, 1981.

DAVIDOVA, I. et al. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 80–86, 2001.

DESHAN, P. W. et al. The Griess test as a screening procedure for bacteriuria during pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 27, n. 2, p. 202–205, 1965.

DHILLON, A. et al. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2765–72, maio 2003.

DINNING, A. J. et al. **Initial souring monitoring and souring-mitigation testing using an online souring-mitigation cabinet (SMC) prior to live produced water reinjection (PWRI) and nitrate-based souring-mitigation treatment on Norske Shell's Draugen Platform**. SPE 93281. **Anais**. Houston: SPE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OILFIELD CHEMISTRY, 2005

DOEHLERT, D. H. Uniform Shell Designs. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 19, n. 3, p. 231–239, 1970.

DUNSMORE, B. et al. **Corrosion by Sulfate Reducing Bacteria that Utilize Nitrate**. NACE-04763. **Anais**. New Orleans: NACE International, 2004

ECKFORD, R. E.; FEDORAK, P. M. Using nitrate to control microbially-produced hydrogen sulfide in oil field waters. In: VAZQUEZ-DUHALT, R.; QUINTERO-RAMIREZ, R. (Eds.). **Petroleum Biotechnology Developments and Perspectives**. Elsevier B. V., 2004. p. 307–340.

EDEN, B.; LAYCOCK, P. J.; FIELDER, M. **Oilfield Reservoir Souring**. 1993.

ELLIOTT, P.; RAGUSA, S.; CATCHESIDE, D. Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3724–3730, dez. 1998.

EVANS, P.; DUNSMORE, B. **Reservoir simulation of sulfate reducing bacteria activity in the deep sub-surface**. NACE-06664. **Anais...**São Diego, Califórnia: 2006

FARQUHAR, G. B. **A review and update of the role of volatile fatty acids (VFA's) in seawater injection systems**. NACE-98005. **Anais**. San Diego, Califórnia: NACE International, 1998

FAUQUE, G. D.; BARTON, L. L. Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In: **Advances in Microbial Physiology**. Elsevier, 2012. p. 1–90.

FERRIS, M. J. et al. Microbially mediated sulphide production in a thermal, acidic algal mat community in Yellowstone National Park. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 954–960, 2003.

FOSSING, H. et al. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca*. **Nature**, v. 374, n. 6524, p. 713–715, 20 abr. 1995.

FRAZER, L. C.; BOLLING, J. D. **Hydrogen Sulfide Forecasting Techniques for the Kuparuk River Field**. International Arctic Technology Conference. **Anais**. Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 1991

GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 263–282, 2011.

GOLDHABER, M. B. Sulfur-rich Sediments. In: HOLLAND, H. D.; TUREKIAN, K. (Eds.). . **Isotope Geochemistry: A derivative of the Treatise on Geochemistry**. 1 st ed. Academic Press, 2011. p. 752.

GREENE, E. A. et al. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 607–617, 2003.

GRIGORYAN, A. A. et al. Competitive Oxidation of Volatile Fatty Acids by Sulfate- and Nitrate-Reducing Bacteria from an Oil Field in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4324–4335, 15 jul. 2008.

HANDA, T. et al. Microbial and chemical characterizations of oil field water through artificial souring experiment. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 43, n. 9, p. 792–797, 2010.

HITZMAN, D. O.; SPERL, G. T. **New microbial technology for enhanced oil recovery and sulfide prevention and reduction**. SPE/DOE 27752. **Anais**. Society of Petroleum Engineering, 1994

HITZMAN, D. O.; SPERL, G. T.; SANDBECK, K. **Composition for reducing the amount of and preventing the formation of hydrogen sulfide in an aqueous system, particularly in an aqueous system used in oil field applications**. United States of America United States Patent, 1998.

HOFFMANN, H.; SPARK, I. S. C. **Injection Seawater versus Produced Water SRB and Archaea Populations**. SPE International Conference & Workshop on Oilfield Corrosion. **Anais...**Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 2012

HOLUBNYAK, Y. et al. **Understanding the Souring at Bakken Oil Reservoirs**. SPE International Symposium on Oilfield Chemistry. **Anais...**Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 2011

HUBERT, C. et al. Containment of Biogenic Sulfide Production in Continuous Up-Flow Packed-Bed Bioreactors with Nitrate or Nitrite. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 338–345, 4 abr. 2003.

HUBERT, C. et al. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Environmental Biotechnology**, v. 68, p. 272–282, 2005.

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

HUBERT, C.; VOORDOUW, G.; MAYER, B. Elucidating microbial processes in nitrate and sulfate-reducing systems using sulfur and oxygen isotope ratios: The example of oil reservoir souring control. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, n. 13, p. 3864–3879, 2009.

JOHNSON, R. J. et al. Reservoir Souring – Latest developments for application and mitigation. **Journal of Biotechnology**, v. 256, p. 57–67, ago. 2017.

KASTER, K. M. et al. Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field in the North Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 195–203, 2007.

KHATIB, Z. I.; SALANITRO, J. **Reservoir Souring: Analysis of Surveys and Experience in Sour Waterfloods**. SPE Annual Technical Conference and Exhibition. **Anais...**Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 1997

KIRCHMAN, D. L.; MALMSTROM, R. R.; COTTRELL, M. T. Control of bacterial growth

by temperature and organic matter in the Western Arctic. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 52, n. 24–26, p. 3386–3395, dez. 2005.

KLEIKEMPER, J. et al. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1516–23, abr. 2002.

KUIJVENHOVEN, C. et al. **1 Year Experience With the Injection of Nitrate To Control Souring in Bonga Deepwater Development Offshore Nigeria**. International Symposium on Oilfield Chemistry. **Anais**. Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 2007

KUMARASWAMY, R. et al. Molecular- and cultivation-based analyses of microbial communities in oil field water and in microcosms amended with nitrate to control H₂S production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 2027–2038, 2011.

LAMBO, A. J. et al. Competitive, microbially-mediated reduction of nitrate with sulfide and aromatic Oil components in a low-temperature, western Canadian oil reservoir. **Environ Sci Technol.**, v. 42, n. 23, 2008.

LENS, P. N.; KUENEN, J. G. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 44, n. 8, p. 57–66, 2001.

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

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. C. et al. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 3, p. 399–407, jun. 2004.

MACKAY, E. J. et al. What Level of Sulphate Reduction is Required to Eliminate the Need for Scale Inhibitor Squeezing? **SPE International Symposium on Oilfield Scale**, p. 1–15, 2005.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14^a ed. Person Education, 2016.

MAGOT, M. Indigenous Microbial Communities in Oil Fields. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Eds.). **Petroleum Microbiology**. American Society of Microbiology, 2005. p. 21–34.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 103–116, 2000.

MARIETOU, A. Nitrate reduction in sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 15, p. 2016–2019, 2016.

MARIETOU, A.; GRIFFITHS, L.; COLE, J. Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by a nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing

bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 882–889, 2009.

MCCAULEY, C. A. et al. Sulfate and metal removal in bioreactors treating acid mine drainage dominated with iron and aluminum. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 961–970, mar. 2009.

MOHAN, S. V. et al. Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2849–2857, 2005.

MUGGERIDGE, A. et al. Recovery rates, enhanced oil recovery and technological limits. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 372, n. 2006, p. 20120320–20120320, 2013.

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

MYHR, S. et al. Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 400–408, 2002.

NASCIMENTO, J. R. DO. **Avaliação da tecnologia de exclusão biocompetitiva para o controle de processos de acidificação biogênica (souring) e corrosão microbiológica na indústria do petróleo**. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

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

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.

O'REILLY, C.; COLLERAN, E. Toxicity of nitrite toward mesophilic and thermophilic sulphate-reducing, methanogenic and syntrophic populations in anaerobic sludge. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 46–52, 10 fev. 2005.

ODOM, J.; SINGLETON, R. J. **The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives**. New York, NY: Springer New York, 1993.

OKPALA, G. N. et al. Effect of thermophilic nitrate reduction on sulfide production in high temperature oil reservoir samples. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–13, 2017.

POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. 2^a ed. New York: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1984.

REINSEL, M. A. et al. Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 128–136,

1996.

REN, H. Y. et al. Comparison of microbial community compositions of injection and production well samples in a long-term water-flooded petroleum reservoir. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–9, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2^a ed. Campinas: Cárita Editora, 2009.

ROTHER, O.; THOMM, M. A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic Archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 4, p. 247–252, 2000.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. *Desulfosporosinus acididurans* sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 39–47, 5 jan. 2015.

SETO, C. J.; BELIVEAU, D. A. **Reservoir Souring in the Caroline Field**. SPE/CERI Gas Technology Symposium. **Anais...**Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 2000

SIGALEVICH, P. et al. Sulfate Reduction and Possible Aerobic Metabolism of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in a Chemostat Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB under Exposure to Increasing Oxygen Concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 5013–5018, 1 nov. 2000.

SIGMA-ALDRICH. **73426 Nitrate Reduction Test**Fluka Analytical. Suíça. Disponível em: <sigma-aldrich.com>.

SILVA, T. G. D. DA et al. Remoção de íons de sulfato da água oceânica e de injeção através da nanofiltração. **Cadernos de Graduação**, v. 3, n. 1, p. 131–140, 2015.

SONG, G. et al. Aquathermolysis of conventional heavy oil with superheated steam. **Petroleum Science**, v. 6, n. 3, p. 289–293, 2009.

SOUSA, K. A. DE; CAMMAROTA, M. C.; SÉRVULO, E. F. C. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 273–278, 2010.

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

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

TELANG, A. J. et al. Effect of nitrate injection on the microbial community in an oil field as

monitored by reverse sample genome probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1785–1793, 1997.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

THORSTENSON, T. et al. **Biocide Replacement by Nitrate in Sea Water Injection Systems**. NACE-02033. **Anais**. NACE International, 2002

TRIGGIA, A. A. et al. **Fundamentos de engenharia de petróleo**. 2ª Edição ed. Rio de Janeiro: Petrobras, 2004.

VAN DEN BRAND, T. P. H. et al. Influence of acetate and propionate on sulphate-reducing bacteria activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 6, p. 1839–1847, 2014.

VANCE, I.; THRASHER, D. R. Reservoir Souring: Mechanisms and Prevention. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Eds.). **Petroleum Microbiology**. Washinton, DC. p. 123–142., 2005

VAZQUEZ-DUHALT, R.; QUINTERO-RAMIREZ, R. **Petroleum Biotechnology: Developments and Perspectives**. 1 st ed. Elsevier Science, 2004.

VIDELA, H. A. **Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais**. 1ª ed. Editora Edgard Blücher Ltda, 2003.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 169–80, set. 2005.

VIGNERON, A. et al. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle. **The ISME Journal**, v. 11, n. 9, p. 2141–2154, 19 set. 2017.

VOORDOUW, G. et al. Characterization of 16s rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1623–1629, 1996.

VOORDOUW, G. et al. **Use of Nitrate or Nitrite for the Management of the Sulfur Cycle in Oil and Gas Fields**. International Symposium on Oilfield Chemistry. **Anais**. Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 2007

VOORDOUW, G. et al. Sulfide Remediation by Pulsed Injection of Nitrate into a Low Temperature Canadian Heavy Oil Reservoir. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9512–9518, 15 dez. 2009.

WEIJMA, J. et al. Optimisation of sulphate reduction in a methanol-fed thermophilic

bioreactor. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 1825–1833, 2002.

WEINBAUER, M. G.; WENDEROTH, D. F. Microbial Diversity and Ecosystem Functions - the Unmined Riches. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 0–0, 15 abr. 2002.

WOLIN, E. A.; WOLIN, M. J.; WOLFE, R. S. Formation of methane by Bacterial Extracts. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 238, n. 8, p. 2882–2886, 1963.

XUE, Y.; VOORDOUW, G. Control of Microbial Sulfide Production with Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating Bioreactors. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 8 dez. 2015.

YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S.; MCINERNEY, M. J. Microbial Processes in Oil Fields. Culprits, Problems, and Opportunities. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. Elsevier Inc., v. 66p. 141–251., 2009

ZARASVAND, K. A.; RAI, V. R. Identification of the traditional and non-traditional sulfate-reducing bacteria associated with corroded ship hull. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 197, 12 dez. 2016.

ZHANG, C.; WEN, F.; CAO, Y. Progress in research of corrosion and protection by sulfate-reducing bacteria. **Procedia Environmental Sciences**, v. 10, n. PART B, p. 1177–1182, 2011.

ZHU, X. Y.; LUBECK, J.; KILBANE, J. J. Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5354–63, set. 2003.

APÊNDICE A – Coeficientes das respostas estudadas e modelos gerados

Tabela 28: Coeficientes para a resposta Sulfeto total.

	T1	T3	T7	T14	T28
b₀	3,94	3,12	7,46	4,87	6,00
b₁	-0,05	0,46	-10,73	-0,22	7,20
b₂	-0,08	-2,21	-94,76	-98,09	-95,45
b₁₂	-0,09	-0,31	33,04	-2,70	-17,50
b₁₁	-1,04	-0,54	-1,96	2,12	5,56
b₂₂	-1,47	1,19	105,51	112,00	111,78

Com base nos coeficientes calculados (Tabela 28) e na equação de Doehlert, definiu-se um modelo para a resposta Sulfeto Total para cada tempo estudado e estão apresentados a seguir:

$$T1: Y = 3,94 - 0,05x_1 - 0,08x_2 - 0,09x_1x_2 - 1,04x_1^2 - 1,47x_2^2$$

$$T3: Y = 3,12 + 0,46x_1 - 2,21x_2 - 0,31x_1x_2 - 0,54x_1^2 + 1,19x_2^2$$

$$T7: Y = 7,46 - 10,73x_1 - 94,76x_2 + 33,04x_1x_2 - 1,96x_1^2 + 105,51x_2^2$$

$$T14: Y = 4,87 - 0,22x_1 - 98,09x_2 - 2,70x_1x_2 + 2,12x_1^2 + 112,00x_2^2$$

$$T28: Y = 6,00 + 7,20x_1 - 95,45x_2 - 17,50x_1x_2 + 5,56x_1^2 + 111,78x_2^2$$

APÊNDICE B – Matrizes de previsões da análise estatística dos resultados e modelos matemáticos

Tabela 29: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 1 dia.

		X1 (Nitrato)										
		-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X2 (Temperatura)	-1	1,47	1,85	2,14	2,36	2,49	2,54	2,50	2,39	2,18	1,90	1,54
	-0,8	2,00	2,38	2,67	2,88	3,01	3,05	3,01	2,89	2,69	2,40	2,03
	-0,6	2,42	2,79	3,08	3,29	3,41	3,45	3,41	3,28	3,08	2,79	2,41
	-0,4	2,71	3,08	3,37	3,57	3,69	3,73	3,69	3,56	3,35	3,05	2,68
	-0,2	2,89	3,26	3,54	3,74	3,86	3,89	3,84	3,71	3,50	3,20	2,82
	0	2,95	3,32	3,60	3,79	3,91	3,94	3,88	3,75	3,53	3,23	2,85
	0,2	2,90	3,26	3,53	3,72	3,83	3,86	3,81	3,67	3,45	3,14	2,76
	0,4	2,72	3,08	3,35	3,54	3,65	3,67	3,61	3,47	3,24	2,94	2,55
	0,6	2,43	2,78	3,05	3,24	3,34	3,36	3,30	3,15	2,92	2,61	2,22
	0,8	2,02	2,37	2,63	2,81	2,91	2,93	2,87	2,72	2,48	2,17	1,77
	1	1,49	1,83	2,10	2,28	2,37	2,38	2,32	2,16	1,93	1,61	1,21

Tabela 30: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 3 dias.

		X1 (Nitrato)										
		-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X2 (Temperatura)	-1	5,22	5,57	5,87	6,13	6,35	6,53	6,66	6,75	6,79	6,80	6,76
	-0,8	4,41	4,75	5,04	5,29	5,49	5,65	5,77	5,85	5,88	5,88	5,82
	-0,6	3,70	4,02	4,30	4,54	4,73	4,88	4,99	5,05	5,07	5,05	4,99
	-0,4	3,08	3,39	3,66	3,88	4,06	4,20	4,29	4,35	4,35	4,32	4,24
	-0,2	2,56	2,86	3,11	3,32	3,49	3,61	3,70	3,74	3,73	3,69	3,60
	0	2,13	2,42	2,66	2,86	3,01	3,12	3,19	3,22	3,21	3,15	3,04
	0,2	1,80	2,07	2,30	2,49	2,63	2,73	2,79	2,80	2,77	2,70	2,59
	0,4	1,56	1,82	2,04	2,21	2,34	2,43	2,48	2,48	2,44	2,35	2,23
	0,6	1,42	1,67	1,87	2,03	2,15	2,23	2,26	2,25	2,20	2,10	1,96
	0,8	1,38	1,61	1,80	1,95	2,06	2,12	2,14	2,12	2,05	1,94	1,79
	1	1,42	1,65	1,83	1,96	2,06	2,11	2,11	2,08	2,00	1,88	1,72

Tabela 31: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 7 dias.

		X1 (Nitrato)										
		-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X2 (Temperatura)	-1	249,55	241,50	233,29	224,93	216,41	207,73	198,90	189,91	180,77	171,47	162,01
	-0,8	186,00	179,28	172,39	165,35	158,15	150,80	143,29	135,62	127,80	119,82	111,68
	-0,6	130,90	125,49	119,93	114,21	108,33	102,30	96,11	89,77	83,27	76,61	69,79
	-0,4	84,24	80,15	75,91	71,51	66,96	62,25	57,38	52,36	47,18	41,84	36,35
	-0,2	46,02	43,25	40,33	37,26	34,02	30,63	27,09	23,39	19,53	15,51	11,34
	0	16,24	14,79	13,20	11,44	9,53	7,46	5,24	2,86	0,32	-2,37	-5,22
	0,2	-5,10	-5,22	-5,50	-5,93	-6,52	-7,27	-8,17	-9,23	-10,45	-11,82	-13,35
	0,4	-18,00	-16,80	-15,75	-14,87	-14,13	-13,56	-13,14	-12,88	-12,77	-12,82	-13,03
	0,6	-22,46	-19,93	-17,57	-15,36	-13,30	-11,41	-9,67	-8,08	-6,65	-5,38	-4,27
	0,8	-18,47	-14,63	-10,94	-7,41	-4,03	-0,81	2,25	5,15	7,90	10,50	12,93
1	-6,05	-0,88	4,13	8,98	13,68	18,22	22,60	26,83	30,90	34,82	38,58	

Tabela 32: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 14 dias.

		X1 (Nitrato)										
		-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X2 (Temperatura)	-1	214,61	214,34	214,25	214,32	214,56	214,97	215,55	216,30	217,22	218,31	219,57
	-0,8	155,21	154,83	154,63	154,59	154,73	155,03	155,50	156,14	156,96	157,94	159,09
	-0,6	104,77	104,29	103,97	103,83	103,86	104,05	104,42	104,95	105,65	106,52	107,56
	-0,4	63,29	62,70	62,28	62,03	61,94	62,03	62,29	62,71	63,31	64,07	65,00
	-0,2	30,77	30,07	29,54	29,18	28,99	28,97	29,12	29,44	29,92	30,58	31,40
	0	7,21	6,41	5,77	5,30	5,00	4,87	4,91	5,12	5,50	6,05	6,76
	0,2	-7,38	-8,30	-9,04	-9,62	-10,03	-10,27	-10,33	-10,23	-9,96	-9,52	-8,92
	0,4	-13,02	-14,04	-14,90	-15,58	-16,10	-16,44	-16,62	-16,63	-16,47	-16,14	-15,64
	0,6	-9,70	-10,83	-11,79	-12,59	-13,21	-13,66	-13,95	-14,06	-14,01	-13,79	-13,39
	0,8	2,58	1,34	0,27	-0,63	-1,36	-1,92	-2,31	-2,54	-2,59	-2,48	-2,19
1	23,83	22,48	21,30	20,29	19,45	18,78	18,28	17,95	17,79	17,79	17,97	

Tabela 33: Matriz de previsões da influência do nitrato e da temperatura sobre a quantificação do teor de Sulfeto Total gerado, para o tempo 28 dias.

		X1 (Nitrato)										
		-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X2 (Temperatura)	-1	194,09	197,03	200,41	204,24	208,51	213,23	218,39	224,00	230,05	236,54	243,49
	-0,8	138,26	140,50	143,18	146,31	149,88	153,90	158,36	163,27	168,62	174,41	180,66
	-0,6	91,37	92,91	94,89	97,32	100,19	103,51	107,27	111,48	116,13	121,23	126,77
	-0,4	53,43	54,26	55,55	57,28	59,45	62,07	65,13	68,63	72,59	76,98	81,82
	-0,2	24,42	24,56	25,14	26,17	27,64	29,56	31,92	34,73	37,98	41,68	45,82
	0	4,36	3,80	3,68	4,01	4,78	6,00	7,66	9,77	12,32	15,32	18,76
	0,2	-6,76	-8,02	-8,84	-9,21	-9,14	-8,62	-7,66	-6,25	-4,40	-2,10	0,64
	0,4	-8,94	-10,90	-12,41	-13,49	-14,11	-14,29	-14,03	-13,32	-12,17	-10,58	-8,53
	0,6	-2,17	-4,83	-7,05	-8,82	-10,15	-11,03	-11,47	-11,46	-11,01	-10,11	-8,77
	0,8	13,53	10,17	7,26	4,79	2,76	1,18	0,04	-0,65	-0,90	-0,70	-0,06
	1	38,18	34,12	30,51	27,34	24,61	22,33	20,49	19,10	18,15	17,65	17,59