



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O CARBONO E O
NITROGÊNIO IDEAL PARA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE
SULFETO EM UM CONSÓRCIO MICROBIANO
ENRIQUECIDO A PARTIR DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE UM
RESERVATÓRIO DE ÓLEO OFFSHORE.**

WALTER ARIZA CAMACHO

**Florianópolis
MARÇO/2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

WALTER ARIZA CAMACHO

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O CARBONO E O
NITROGÊNIO IDEAL PARA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE
SULFETO EM UM CONSÓRCIO MICROBIANO
ENRIQUECIDO A PARTIR DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE UM
RESERVATÓRIO DE ÓLEO OFFSHORE.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador:
Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Coorientadores:
Prof. Dr. Cléo Bressan
Prof. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis
MARÇO/2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Camacho, Walter Ariza

Determinação da Relação entre o Carbono e o Nitrogênio Ideal para Inibição da Produção de Sulfeto em Um Consórcio Microbiano Enriquecido a Partir de Água de Produção de Um Reservatório de Óleo Offshore / Walter Ariza Camacho ; orientador, Hugo Moreira Soares ; coorientadores, Cléo Bressan e . Willibaldo Schmidell Netto – Florianópolis, SC, 2015

92 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. Biocorrosão. 3. Bactérias sulfato redutoras. 4. Nitrato. 5. Inibição 6. Recuperação terciária de petróleo. I. Soares, Hugo Moreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Termo de aprovação

*Dedicado especialmente à minha mãe e à
Yobana por ser o apoio em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo grande incentivo e apoio durante toda a formação acadêmica;

Um agradecimento muito especial à Yobana, pelo apoio, compressão e cuidados por que mesmo na distancia sempre foi minha companhia e força.

Ao professor Hugo, pela oportunidade, orientação, compreensão e amizade ao longo de todo o curso.

Ao professor Cléo, pela amizade e ensinamentos ao longo de todo o curso.

Aos meus amigos do LTBR, especialmente pela amizade construída ao longo deste período.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

E ao PETROBRAS e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Um dos maiores problemas nos poços maduros de petróleo é a presença de acidez biogênica (*souring*), gerada principalmente pela produção biológica de sulfeto na recuperação secundária do petróleo em plataformas *offshore*. Uma das estratégias para o controle do *souring* em reservatórios consiste na injeção de nitrato, o qual é utilizado preferencialmente como aceptor de elétron, limitando desta forma a produção de sulfeto. O objetivo do presente estudo foi investigar a relação entre o carbono e o nitrogênio (Relação C:N) necessária para inibição da produção de sulfeto num consórcio microbiano enriquecido a partir de água de produção de um reservatório de óleo *offshore*. Foi realizado primeiramente um ensaio em batelada com acetato e propionato (ácidos graxos de fácil degradação) para avaliar o melhor doador de elétrons utilizado pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) para produção de sulfeto. A partir do ensaio concluiu-se que o consórcio de bactérias utiliza propionato para produzir acetato e CO₂. Com isso, para subseqüentes ensaios, foi utilizado propionato como aceptor de elétrons. Dois ensaios mais foram feitos, a fim, de avaliar a relação C:N inibitória da produção de sulfeto: o primeiro, mudando a concentração de carbono e a concentração de nitrogênio; o segundo, mantendo a concentração de carbono constante e variando a concentração de nitrogênio. No primeiro, evidenciou-se que, nas condições onde a concentração de nitrogênio, expressada em nitrato (N-NO₃⁻), foi superior à concentração de carbono orgânico, expressada em propionato (C - CH₃CH₂COO⁻). A produção de sulfeto ficou inibida, possivelmente, pela indisponibilidade de carbono, ou então pelo favorecimento de processos de desnitrificação autotrófica, que resultariam na remoção de algum sulfeto formado. Já, nas condições onde a concentração de nitrato foi inferior à de carbono orgânico houve formação de sulfeto, a partir do ponto de término do nitrito, não havendo uma influência da concentração residual de matéria orgânica no sistema. Os resultados da segunda série de ensaios foi concordante com a primeira, evidenciando que a relação C:N propriamente dita não é um fator que resulte em inibição ou estimulação das BRS num ponto específico de injeção, mas sim, a presença ou ausência de nitrato ou nitrito, de forma independente da concentração de matéria orgânica. Um ensaio adicional foi realizado para determinação da presença ativa de bactérias autotróficas redutoras de nitrato e oxidadoras de sulfeto (BRN-OS); os resultados mostram presença ativa de BRN-OS.

Palavras chaves: Biocorrosão, Bactérias Sulfato Redutoras, Nitrato, Inibição, Recuperação Terciária de Petróleo

ABSTRACT

A major problem in oil wells is the presence of biogenic acid (Souring) generated mainly by the production of sulfide in secondary recovery of oil at offshore platforms. The control of souring in reservoirs can be done through nitrate injection, which is preferably used as the electron acceptor, limiting the production of sulphide. The objective of this study was to investigate the carbon-nitrogen ratio required (C:N) for inhibition of sulfide production in an enriched microbial consortia coming from a production water from an offshore oil reservoir. It was first performed a batch assay with acetate and propionate (easily degradable fatty acids) to evaluate the best electron donor used by sulphate reducing bacteria (SBR) to produce sulfide. It was concluded from this assay that the bacteria consortia has a greater affinity to propionate. Two more assays were made with the objective to evaluate the C:N ratio that inhibit sulfide production: the first, it was maintained constant carbon concentration and varying nitrogen concentration; the second, it was maintained nitrogen concentration constant and varying carbon concentration. The first assay showed that, under the conditions where the concentration of nitrate expressed as nitrogen ($N-NO_3^-$) was greater than the concentration of organic carbon ($C-CH_3CH_2COO^-$), sulfide production was possibly inhibited by the lack of organic matter, or it was favored by autotrophic denitrification processes, that contributes to remove of some sulfide formed. When nitrate concentration was lower than organic carbon, sulfide was formed immediately after nitrogen species were totally consumed. There was no influence of residual concentration of organic matter in the system. The second assay results corroborate with the previous one, indicating that the C:N ratio is not a factor that results in SBR inhibition or stimulation, but, what matter is the nitrate, or nitrite, presence or absence, independently of the organic matter concentration. An additional test was performed to determine the presence active of sulfide-oxidizing, nitrate reducing bacteria (NBR - OS).

Keywords: Souring, Sulfate Reducing Bacteria, Nitrate, Inhibition, Enhanced Oil Recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fontes que ocasionam a pressão para conseguir a recuperação primária de petróleo.	27
Figura 2: Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo.	28
Figura 3: Esquema das reduções assimilativa e desassimilativa do sulfato Fonte: Madigan <i>et al.</i> , (2004).....	33
Figura 4: Possível rota da redução desassimilativa do sulfato. Fonte: Postgate (1984).....	34
Figura 5: Esquema da corrosão do metal causado por BRS. Fonte: Muyzer e Stams (2008).	35
Figura 6: Representação esquemática das relações metabólicas entre BRS, BRN-h e BRS-OS. Fonte Zarasvand e Rai (2014).....	39
Figura 7: Procedimento de lavagem para o preparo da biomassa.	45
Figura 8: Montagem do <i>shaker</i> utilizado para o ensaio cinético	46
Figura 9: Concentração de sulfeto ao longo do tempo na operação de borbulhamento com gás argônio.	46
Figura 10: Concentração de sulfeto obtido nas três condições avaliadas nos ensaio cinético realizado (E1).....	60
Figura 11: Concentração de sulfeto e de acetato na condição onde só tem acetato como doador de elétrons (E1).	61
Figura 12: Concentração de sulfeto, propionato e de acetato na condição onde só tem propionato como doador de elétrons (E1).	62
Figura 13: Produção de sulfeto e consumo dos substratos na condição onde tem acetato e propionato como substrato (E1).	62
Figura 14: Concentração de sulfeto acumulada após 96 horas de ensaio em função da concentração de nitrato inicial para cada concentração de propionato testada (E2).	65
Figura 15: Concentração de íons ao longo da cinética numa relação C:N 4.3 (E3).....	68
Figura 16: Concentração de íons ao longo da cinética numa relação C:N de 1,1 (E3).....	69
Figura 17: Concentração de íons ao longo da cinética numa relação C:N de 0,5 (E3).....	70

Figura 18: Resultado obtidos da cinética de presença de BRN-OS (E4).
..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de acetato, propionato e nitrato adicionadas à cultura mãe.	44
Tabela 2: Concentração mássica entre carbono y nitrogênio utilizadas no ensaio influencia da relação entre carbono e nitrogênio (C:N) variando as concentrações de cada substrato. (E2).	48
Tabela 3: Condições utilizados para o ensaio. (E2).	49
Tabela 4: concentrações do meio de cultura para o ensaio cinético. (E3)	50
Tabela 5: volumes adicionados nos ensaios da cinética. (E3).....	51
Tabela 6: Valores das concentração de íons para cada relação C:N testada no ensaio E2. (Relações C:N 4,3, 2,1, 1,1 e 0,5 em sobrescrito)	63

LISTA DE SÍMBOLOS

BRS :bactérias redutoras de sulfato
BRN : bactérias redutoras de nitrato
BRN-h : bactérias redutoras de nitrato heterotróficas
BRN-OS: bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto
VFA: Ácidos graxos voláteis
Ac- : Acetato
Prop- : propionato
CMI :corrosão microbiologicamente induzida
EOR :Enhanced Oil Recovery
MEOR: Microbial Enhanced Oil Recovery
SSV : Concentração de sólidos suspensos totais
T : temperatura
t : tempo
 μ : Massa atômica
 $C - CH_3CH_2COO^-$: Concentração em $mg.L^{-1}$ de carbono em propionato
 $C - CH_3COO^-$: Concentração em $mg.L^{-1}$ de carbono em acetato
 $N - NO_3^-$: Concentração em $mg.L^{-1}$ de nitrogênio em nitrato
AFS: Adenosina fosfosulfato
PPi: Pirofosfato
FAFS: Fosfoadenosina fosfosulfato
AMP: Adenosina monofosfato
THPS: Tetraquishidroximetil fosfônio
Dsr: Dissimilatorysulfitereductase

SUMÁRIO

CAPITULO 1.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
OBJETIVOS	25
Objetivo geral	25
Objetivos específicos	25
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1 Recuperação de óleo em poços petrolíferos	27
1.2 Acidez biogênica (<i>souring</i>) em poços de petróleo	30
1.3 Bactérias sulfato redutoras (BRS)	32
1.4 Tecnologias de Inibição de <i>souring</i>	35
1.5 Uso do Nitrato como Tecnologia Alternativa para Controle de <i>Souring</i>	38
CAPITULO 2.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1 Enriquecimento da cultura mãe utilizada nos ensaios cinéticos.	43
2.2 Ensaios cinéticos para seleção do doador de elétron (E1)	44
2.3 Retirada de sulfeto da biomassa utilizando gás argônio... ..	46
2.4 Influencia da relação carbono e nitrogênio na produção do sulfeto	47
2.5 Ensaio cinético verificação da atividade de Bactérias Redutoras de Nitrato Oxidadoras de Sulfeto (BRN-OS) no consorcio estudado. (E4).....	51
2.6 Determinações analíticas	52
CAPITULO 3.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

3.1	Ensaio cinético para avaliação de acetato e propionato como doador de elétron para o consórcio estudado (E1).....	55
3.2	Influencia da relação carbono e nitrogênio na produção do sulfeto.	63
3.3	Ensaio cinético verificação da atividade de bactérias reductoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS) no consorcio estudado (E4).....	71
CONCLUSÕES		75
PERSPECTIVAS FUTURAS		77
BIBLIOGRAFIA.....		79
ANEXOS.....		87
ANEXO 1		87
1.1	Água do mar sintética utilizada nos experimentos	87
ANEXO 2		89
Resultados das cinéticas apresentadas		89

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

A extração do petróleo em um poço produtor é realizada em diferentes estágios: Num primeiro estágio, a produção é feita por pressão natural contida no reservatório. Porém, à medida que a pressão no poço diminui, equilibrando-se com a pressão ambiente, a extração cessa, havendo necessidade de se utilizar outros artifícios para recuperar mais petróleo. Num segundo estágio, fluidos são injetados no poço para aumentar a pressão e continuar com a produção do petróleo; este estágio é conhecido como produção secundária. Normalmente se utiliza água num primeiro momento e, posteriormente, são adicionados aditivos a esta água para melhorar suas propriedades de fluidez e de interações com a fase oleosa, como a adição de surfactantes.

Em campos marítimos, denominados *offshore*, o fluido injetado é água do mar, a qual possui alta salinidade e grandes quantidades de sulfato que, na presença de matéria orgânica nos poços, acarreta a ativação das bactérias redutoras de sulfato, presentes naturalmente nos poços. A atividade destas bactérias resulta na produção de sulfeto, principal precursor da acidificação biogênica (*souring*) nos poços. O sulfeto de hidrogênio é uma forma de enxofre altamente reativa, corrosiva e tóxica. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são microrganismos anaeróbios que utilizam sulfato como acceptor de elétrons e uma grande variedade de compostos orgânicos (em algumas famílias até hidrocarbonetos) como doadores de elétron, gerando como produto sulfeto e dióxido de carbono.

O efeito do *souring* pode ser remediado mediante o uso de tubulações e equipamentos construídos com ligas de aço especiais para resistir à biocorrosão, ou usar artifícios para evitar a atividade das BRS, como é a injeção de biocidas químicos, a remoção das cargas de sulfato na água injetada (dessulfatação), entre outros. No entanto, estas técnicas, além do grande custo e agressividade ao meio ambiente como no caso dos biocidas, não conseguem controlar completamente o crescimento das BRS. Estas limitações geram grande interesse no desenvolvimento de processos alternativos para o controle do *souring*, como a injeção de nitrato para inibição do metabolismo destas bactérias. A injeção de nitrato favorece o crescimento de bactérias redutoras de nitrogênio heterotróficas (BRN-h), as quais, além de competir pelo substrato

disponível e ter um ganho energético 10 vezes maior que o das BRS, tem como produto intermediário nitrito o qual é um inibidor das BRS.

O uso de nitrato para o controle do *souring* vem sendo praticado em escala piloto pelas empresas de petróleo, porém, não se têm ainda uma conclusão sobre os benefícios que esta prática traz para este fim. Há indícios de que o uso do nitrato em determinadas concentrações, que a princípio seriam suficientes para evitar a formação do sulfeto, após um longo tempo de aplicação perde gradativamente a sua eficiência, verificando-se um ressurgimento do sulfeto levando à necessidade de aumentar a concentração de nitrato adicionada para continuar a manter a inibição sobre as BRS.

Com o exposto, a questão da verificação da relação C:N ideal a ser mantida no poço de petróleo para evitar o *souring* ainda não é um assunto que esteja esgotado, necessitando de mais estudos para entender melhor o envolvimento e interação entre estes microrganismos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da relação entre o carbono e o nitrogênio (relação C:N) sobre a inibição da produção de sulfeto, mediante a estimulação de microrganismos desnitrificantes em um consórcio microbiano enriquecido a partir de água de produção de poços de petróleo.

Objetivos específicos

- Determinar a cinética do consumo do acetato e do propionato, como substrato para produção de sulfeto pelo consórcio microbiano enriquecido a partir de água de produção de um reservatório *offshore*.
- Estabelecer a influência da relação entre o carbono e o nitrogênio (relação C:N) frente à inibição da produção do sulfeto no consórcio microbiano enriquecido a partir de água de produção de um reservatório *offshore*.
- Avaliar a presença de bactérias desnitrificantes autotróficas no consórcio microbiano estudado e sua importância frente ao controle do *souring*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Recuperação de óleo em poços petrolíferos

Atualmente as reservas de petróleo podem se encontrar em terra firme ou abaixo do fundo do mar, atingindo profundidades que podem variar de 800 a 7.000 metros. Para a extração do petróleo são realizadas 3 etapas clássicas de extração: Recuperação primária, secundária e terciária (DUNSMORE *et al.*, 2006).

1.1.1 Recuperação primária

A recuperação primária do petróleo é, basicamente, o deslocamento natural do petróleo para fora do reservatório causado pela pressão interna do mesmo. Esta pressão pode ser ocasionada por aquíferos naturais ativos, os quais adicionam água continuamente ao reservatório, forçando o petróleo menos denso para acima do poço. A Figura 1A apresenta um esquema deste caso. Outra forma que elevar a pressão interna do reservatório é pela expansão da capa gasosa (Figura 1B); esta expansão é produzida pelas mudanças de temperatura do reservatório. A produção primária de petróleo também pode ser feita com o uso de equipamentos como bombas de pressão. Deste modo, numa primeira recuperação podem ser extraídos 12% a 20% do óleo, sem introdução de substâncias no poço (SIMON, 1981).

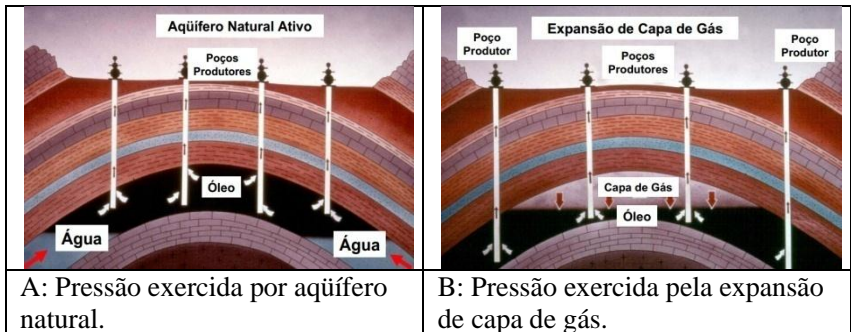


Figura 1: Fontes que ocasionam a pressão para conseguir a recuperação primária de petróleo.

Fonte: <http://engprojnews.blogspot.com/2013/10/ tipos-de-recuperacao-de-petroleo-eor.html>

1.1.2 Recuperação secundária

Quando a pressão do poço não é o suficiente para conseguir uma recuperação primária, são necessários outros processos para elevar a pressão. A Figura 2 apresenta o esquema do processo de recuperação secundária. Nesta recuperação são utilizados métodos de injeção de água ou gás, ou muitas vezes reinjeção de água produzida (água que sai do poço junto com o petróleo) em poços adjacentes, a fim de, direcionar mais óleo para fora do poço (KNIGHT, 2014).

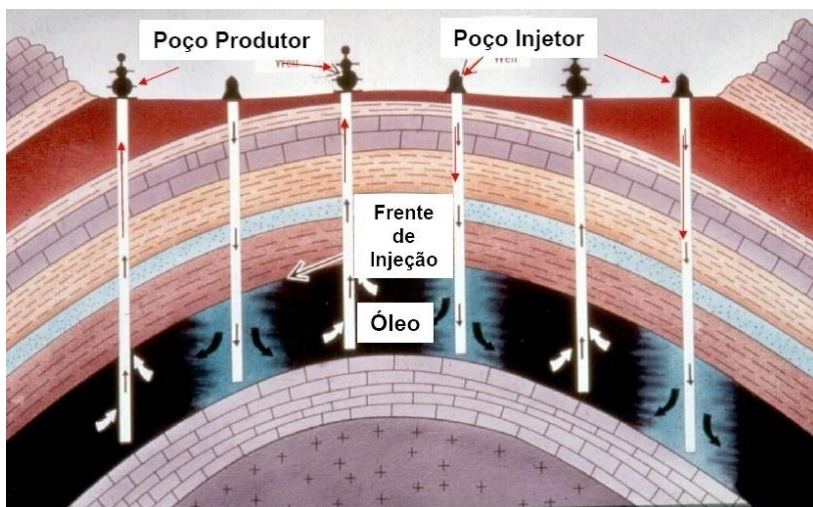


Figura 2: Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo.
Fonte: <http://engprojnews.blogspot.com/2013/10/tipos-de-recuperacao-de-petroleo-eor.html>

A recuperação secundária de petróleo depende da quantidade de água injetada e da viscosidade do mesmo. Desta forma, para cada m^3 de petróleo produzido são injetados em torno de 3 a 4 m^3 de água, podendo este número chegar até 7 m^3 . O volume de água ainda pode aumentar entre 75 a 90%, dependendo do estágio de extração do petróleo, devido à viscosidade do petróleo remanescente. Na medida em que a fração do petróleo no reservatório diminui, este apresenta uma viscosidade maior gerando a necessidade de grandes volumes de água para elevar a pressão e forçar o petróleo para fora do reservatório (THOMAS, 2004).

1.1.3 Recuperação terciária

Na recuperação terciária pode-se recuperar cerca de 11% do petróleo no reservatório e, é utilizada quando a viscosidade do petróleo é muito elevada e este perde a fluidez, ficando quase impossível sua extração. Entre os modelos de recuperação terciária encontra-se a recuperação avançada de petróleo (EOR - *Enhanced Oil Recovery*), o qual consiste na injeção de vapor, gás ou produtos químicos no reservatório, entre outros. A injeção de vapor é utilizada para aquecer o petróleo diminuindo desta forma a viscosidade do mesmo e recuperando sua mobilidade, ficando mais fácil a extração. Gases como nitrogênio ou dióxido de carbono são injetados por que, além de, aumentar a pressão, possam se dissolver no petróleo melhorando sua fluidez. Podem-se injetar também produtos químicos (surfactantes) para diminuir a tensão superficial do petróleo, aumentando desta forma sua fluidez (KNIGHT, 2014).

Outro modelo de recuperação terciária é o de recuperação avançada de petróleo com microrganismos (MEOR- *Microbial Enhanced Oil Recovery*), o qual fundamenta-se na estimulação do crescimento microbiano com o objetivo de aumentar a extração de petróleo (DONALDSON *et al.*, 1989). Os mecanismos através dos quais os microrganismos podem levar a um aumento na produção de óleo são variados, incluindo:

- Redução da tensão interfacial: Produção microbiana de biossurfactantes pode facilitar a recuperação do óleo pela redução da tensão interfacial entre as fases imiscíveis no reservatório.
- Obstrução de caminhos preferenciais: Crescimento da biomassa pode obstruir caminhos preferenciais do fluxo resultando em aumento na recuperação de óleo por forçar o fluxo por caminhos alternativos.
- Formação biogênica de gases: Formação biogênica de dióxido de carbono e metano pode aumentar a pressão nos poros e/ou dissolver na fase oleosa reduzindo sua viscosidade e facilitando a sua mobilização.
- Alterações na molhabilidade do reservatório: Desenvolvimento de biofilmes sobre a rocha pode modificar a molhabilidade do reservatório tornando-o mais hidrofílico.
- Degradação de hidrocarbonetos: Degradação microbiana de hidrocarbonetos resulta, geralmente, em compostos menos

complexos os quais têm uma viscosidade mais baixa facilitando o seu arraste.

Geralmente a determinação de quais destes mecanismos estão envolvidos no aumento da recuperação de óleo é muito difícil, por que estes quase nunca ocorrem isoladamente. Mesmo nos estudos de laboratório com MEOR, estes processos também não são facilmente identificados e/ou quantificados devido ao fato de que comumente são utilizados meios porosos não transparentes para os estudos de MEOR, não permitindo uma visualização direta dos fenômenos envolvidos (ARMSTRONG e WILDENSCHILD, 2012).

1.2 Acidez biogênica (*souring*) em poços de petróleo

Nos campos *offshore*, é injetada água do mar para a recuperação secundária de óleo, devido à sua disponibilidade, ou reinjeção de água produzida (HUBERT e VOORDOUW, 2007; BODTKER *et al.*, 2008). Esses fluidos injetados apresentam concentração de sulfato em torno de $3.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, gerando o processo de “azedamento” (*souring*) do poço devido ao aumento da produção microbiana de sulfeto de hidrogênio (H_2S). Sulfeto de hidrogênio é um gás solúvel em água, altamente reativo, corrosivo e tóxico (COLLERAN *et al.*, 1995; MOHAN *et al.*, 2005). Devido à sua reatividade este composto reage com as ligas metálicas, levando o metal para uma forma menos energética (SCHWEITZER, 2010), sendo responsável por vários problemas ambientais e econômicos.

Farquhar (1998) afirma que a acidificação de reservatórios de petróleo está principalmente atribuída a fatores bióticos, como a geração microbiológica de sulfeto, porém, existem também fatores abióticos que, podem em determinados ambientes ou condições, chegar a produzir sulfeto. Estes podem ser: 1) a dissolução de materiais piríticos; 2) redução termoquímica do sulfato; 3) oxidação termoquímica de compostos orgânicos de enxofre e 4) reações de oxi-redução com bissulfeto de amônia (sequestro de H_2S presente em alguns sistemas).

No entanto, as considerações a seguir corroboram a afirmação anterior e descartam os mecanismos abióticos como precursores da formação de *souring*:

- 1) Normalmente, a quantidade de pirita é mínima na rocha do reservatório.
- 2) Para que ocorra redução termoquímica do sulfato são necessárias temperaturas na faixa de 80°C a 120°C .

Normalmente os reservatórios após da injeção de água do mar, a qual contém sulfato, apresentam temperaturas inferiores a essa faixa;

- 3) A oxidação termoquímica de compostos orgânicos de enxofre ocorre a temperaturas superiores ou iguais a 80°C, o qual seria favorável, porém, um fator limitante seria a quantidade desses compostos no reservatório.
- 4) Os níveis residuais de bissulfito de amônia presentes no sistema não são capazes de contribuir significativamente para a formação de H_2S .

O principal mecanismo de geração microbiológica de sulfeto em reservatórios de petróleo esta relacionado ao metabolismo das bactérias sulfato redutora (BRS). A temperatura e reservas de carbono presentes nos reservatório de petróleo oferecem um ambiente favorável para o desenvolvimento de BRS. Aliando-se à condição do reservatório, a injeção de água do mar na recuperação secundária de petróleo introduz grandes quantidades de íons sulfato, os quais servem como aceptores finais de elétrons para as BRS (ADKINS *et al.*, 1992; BHUPATHIRAJU *et al.*, 1992; DAVIDOVA *et al.*, 2001; HUBERT *et al.*, 2003).

A acidificação dos poços associada à injeção de água do mar, ou à reinjeção de água produzida pode resultar não só em acidificação do reservatório, como também na obstrução dos poços injetores e produtores pela deposição de sulfeto férrico (FeS) produzido da reação do sulfeto com as ligas metálicas, ocasionando a redução da produtividade dos poços e a contaminação do petróleo produzido. Além disso, a injeção de água do mar nos reservatórios também promove simultaneamente a redução da salinidade e da temperatura da água de formação, o que pode contribuir para o crescimento microbiano (DUNSMORE e EVANS, 2005). A reinjeção desta água produzida é justificada como alternativa de manejo desta água, uma vez que sua disposição sem tratamento prévio acarreta sérios danos ambientais. Embora sendo a reinjeção desta água uma alternativa ambientalmente correta, a sua reutilização como fluido injetor pode intensificar o *Souring*, pois, a água produzida constitui fonte de nutrientes de fácil degradação (ácidos graxos de cadeia curta), que podem ser facilmente utilizados pelo BRS, além de reintroduzir BRS já adaptados às condições do reservatório (DINNING *et al.*, 2005; VOORDOU e Jack, 2005; ALVES DE SOUSA, 2009).

1.3 Bactérias sulfato redutoras (BRS)

O enxofre é um dos elementos mais abundantes na Terra. Pode estar presente em grandes quantidades na água do mar, na forma de sulfato. O ciclo de enxofre é complexo, pois, o enxofre tem uma ampla gama de estados de oxidação, a partir de 6 (completamente oxidada na forma de sulfato (SO_4^{-2})) a -2 (completamente reduzido na forma de sulfeto de hidrogênio (H_2S)).

As BRS são microrganismos anaeróbios que utilizam sulfato (SO_4^{-2}) como acceptor de elétrons, geralmente, compostos orgânicos como doador de elétrons em seu metabolismo, gerando como produtos sulfeto (H_2S) e dióxido de carbono (CO_2). Porém, além do sulfato, as BRS podem usar compostos mais reduzidos de enxofre como acceptor de elétrons, como é o caso do sulfito (SO_3^{-2}) e do tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$). Contudo, a forma mais oxidada do enxofre, o sulfato, é mais abundante na natureza (Fauque e Barton, 2012). BRS podem ser heterotróficas, utilizando como fonte de energia o carbono orgânico, ou autotróficas, que utilizam CO_2 como fonte de carbono e hidrogênio como fonte de elétrons. (DALSGAARD e BAK, 1994; LENS e KUENEN, 2001). As BRS compreendem um diversificado grupo e têm um papel central nos ciclos do carbono e enxofre em condições anóxicas nos oceanos. São capazes de crescer a partir de ácidos graxos de cadeia curta, incluindo acetato e propionato, assim como, em ácidos graxos de cadeia longa e compostos aromáticos (WIDDEL, 1980). Além disso, também são capazes de crescer na presença de hidrocarbonetos de petróleo como a única fonte de carbono (WILKES *et al.*, 2000). Em relação à sua capacidade de metabolização do carbono orgânico, as BRS podem ser divididas em dois grupos: as que degradam compostos orgânicos de forma incompleta até acetato, e aquelas que degradam compostos orgânicos de forma completa até dióxido de carbono (MUYZER e STAMS, 2008).

As BRS são conhecidas por se desenvolverem bem em ambientes com pH em uma faixa ampla de 5 e 9 (MCCAULEY *et al.*, 2009); valores de pH fora desta faixa, geralmente, resultam numa atividade baixa ou inibitória. Quanto à temperatura, a maioria das BRS é classificada como mesófila, com um ótimo de crescimento entre 25 e 40 °C. Mas algumas espécies podem tolerar até -5 °C (psicrofílicas), enquanto outras podem apresentar crescimento ótimo em temperaturas superiores a 75°C (hipertermofílicas) (TANG *et al.*, 2009). Essas

características permitem às BRS ser um grupo com uma grande habilidade para estar presente ou adaptar-se em muitos ecossistemas.

O sulfato é reduzido pelas BRS de duas formas: por redução assimilativa, onde o sulfato é utilizado como fonte de enxofre para os processos de biosíntese e, desassimilativa, quando o sulfato é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia, com produção de sulfeto (POSTGATE, 1984).

A Figura 3 mostra a redução biológica do SO_4^{-2} até H_2S , tanto para o processo assimilativo quanto para o processo desassimilativo, estando dividido em duas etapas. Uma primeira etapa acontece para os dois processos e, é quando ocorre a ativação do sulfato por ATP. A enzima ATP sulfúrilase catalisa a ligação do íon sulfato ao fosfato da molécula de ATP, formando adenosina fosfosulfato (AFS) com a liberação de pirofosfato (PPi). Uma segunda etapa ocorre separadamente: na redução desassimilativa, a AFS é reduzida a sulfito (SO_3^{-2}) pela ação da enzima AFS redutase, com a liberação de AMP (adenosina monofosfato); porém, na redução assimilativa, outro fosfato é incorporado a AFS, formando fosfoadenosina fosfosulfato (FAFS) e, a partir desse momento, os sulfatos podem ser reduzidos por ambos processos. O sulfito é o primeiro produto da redução, e, uma vez formado, é transformado em sulfeto por intermédio da enzima sulfito redutase (MADIGAN *et al.*, 2004).

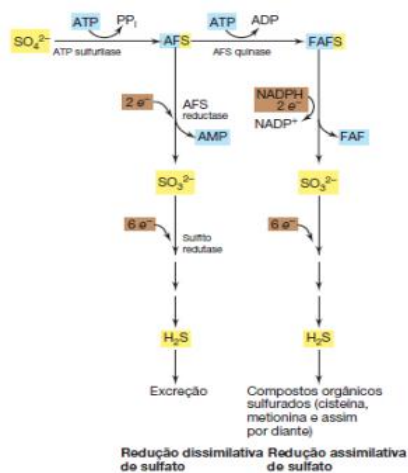


Figura 3: Esquema das reduções assimilativa e desassimilativa do sulfato. Fonte: Madigan *et al.*, (2004)

Na redução desassimilativa do sulfito (SO_3^{-2}) até sulfeto (S^{-2}) ocorre uma complexa série de etapas. A Figura 4 é uma rota proposta por Postgate (1984) para a redução desassimilativa, onde o sulfito seria convertido a metabissulfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{-2}$) com consequente redução a tritionato ($\text{S}_2\text{O}_6^{-2}$). Durante a conversão do metabissulfito, intermediários como o ditionato ($\text{S}_2\text{O}_4^{-2}$) seriam formados. Parte do tritionato seria convertida a tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) e, parte se regeneraria a sulfito. Por fim, o tiosulfato sofreria redução dando origem ao sulfeto e, ainda converter-se-ia novamente a sulfito.

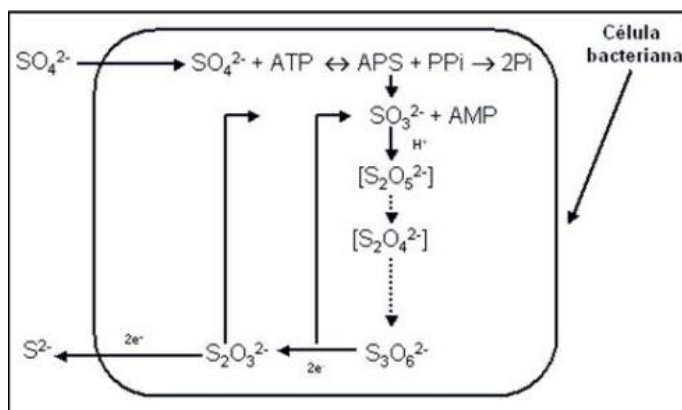


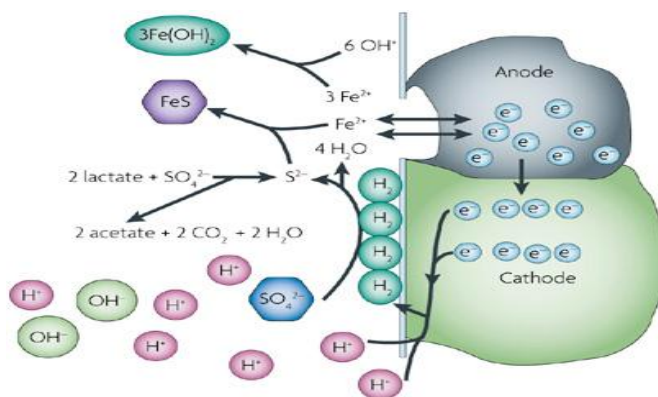
Figura 4: Possível rota da redução desassimilativa do sulfato. Fonte: Postgate (1984).

O sulfeto produzido através do processo desassimilativo é liberado ao ambiente em diferentes formas dependendo do pH do meio. Assim, para pH a baixo de 6 o sulfeto está na forma dissociada (HS^-) e, em valores de 6 a 9 coexiste numa mistura de dissociado (HS^-) e sulfeto de hidrogênio (H_2S). Na medida em que o pH continua aumentando o sulfeto de hidrogênio (H_2S) vai decaindo e, para valores de pH acima de 10 o sulfeto esta só na forma de S^{-2} .

1.3.1 Biocorrosão e sulfato redução

A corrosão é um fenômeno eletroquímico, no qual, os elétrons são liberados a partir do metal em locais anódicos e os elétrons liberados são obtidos em locais catódicos. A reação catódica pode variar de acordo com o ambiente da solução, pode-se dar com pH neutro ou

alcalino. No entanto, sob condições ácidas, o próton pode atuar como reagente catódico. Os microrganismos participam diretamente da corrosão, causando a dissolução do metal, ou indiretamente, através do seu metabolismo. Este processo recebe o nome de Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI) (MANSFELD, 2007). As BRS são as principais responsáveis por este fenômeno, diferenciando-se das demais espécies microbianas pela formação do sulfeto (KUANG *et al.*, 2007). A Figura 5 representa um esquema da biocorrosão causada pela ação do metabolismo das BRS aos metais, uma vez que o sulfeto, produto do metabolismo das BRS, tem uma grande afinidade por metais, reagindo com o ferro (Fe^{+2}) e formando sulfeto de ferro (FeS). Este processo é chamado de Despolarização Catódica, o qual assume que as BRS removem hidrogênio formado na superfície metálica pela redução do H^+ (produto da dissociação da água) e o utilizam para reduzir sulfato a sulfeto (MANSFELD, 2007).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 5: Esquema da corrosão do metal causado por BRS. Fonte: Muyzer e Stams (2008).

1.4 Tecnologias de Inibição de *souring*

Os problemas e custos de operação gerados pela acidificação de reservatórios (*Souring*) têm levado ao desenvolvimento de tecnologias para o controle da mesma, algumas destas tecnologias podem ser:

1.4.1 Uso de ligas de aço para resistir a biocorrosão

O desenvolvimento de materiais resistentes à corrosão é muito estudado não só na indústria petrolífera. Além de seu alto custo, estes materiais funcionam muito bem no início, mas depois de algum tempo terminam sendo corroídos (ZARASVAND e RAI, 2014).

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

A tecnologia de membranas de nanofiltração tem sido empregada com sucesso em alguns campos *offshore*, sendo responsável pela redução de sulfato de cerca de 2.600 mg.L^{-1} para valores inferiores a 50 mg.L^{-1} (TONY Y. RIZK *et al.*, 1998). Estudos feitos por Jordan e Walsh (2004) também citam que os sistemas atuais são capazes de reduzir o sulfato de fluidos injetores de 2.700 mg.L^{-1} para $40\text{-}50 \text{ mg.L}^{-1}$. A aplicação da tecnologia de membranas de nanofiltração em campo é escassa. O método torna-se inviável pelos custos e tempo de implantação e, principalmente, pelo grande volume de água utilizada como fluido injetor. Outro fator a se considerar, é que a dessulfatação permite reduzir consideravelmente os níveis de sulfato, porém, sempre há uma adição de sulfato mantendo o metabolismo das BRS ativo, mesmo em baixas concentrações.

1.4.3 Esterilização da água do mar com radiação ultravioleta:

A radiação UV, normalmente, em comprimento de onda de 220 a 300 nm, promove a alteração da molécula de DNA e, sob prolongada exposição, causa a morte do micro-organismo. Com a mesma finalidade, o controle de *souring* pode ser feito através da esterilização da água do mar por radiação ultravioleta (TUCKER e HITZMAN, 1994; LABAS *et al.*, 2005). No entanto, deve-se considerar que a ação da radiação UV é direta na célula microbiana, não tendo ação residual, ou seja, as BRS já presentes no poço vão continuar em atividade, gerando sulfeto. Adicionalmente, há de se considerar a inviabilidade econômica da aplicação do método em grande escala.

1.4.4 Aplicação de biocidas

O biocida geralmente empregado é o sulfato de tetraquishidroximetil fosfônio (THPS), o qual foi aplicado com sucesso no campo de Skjold Mærsk Oleie og Gas AS, Dinamarca (KASTER *et al.*, 2007). Entretanto, estudos feitos apontam que o tratamento com biocidas em alguns campos de petróleo não tiveram êxito, devido ao biocida não ter atingido as áreas onde as BRS estavam ativas ou à quantidade de biocida dosada ter sido insuficiente (ALVES DE SOUSA, 2009). A eficácia do biocida depende de seu caráter extremamente reativo, que acaba resultando na sua rápida inativação dentro do reservatório (HITZMAN e DENNIS, 1998). Assim, são necessárias altas quantidades de biocida para alcançar uma maior eficiência, de modo que a opção pelo emprego de biocida deve levar em conta a relação custo-benefício.

Adicionalmente, os biocidas apresentam riscos, tanto para os trabalhadores da indústria petrolífera, quanto para o meio ambiente, devido à sua alta toxicidade.

1.4.5 Aplicação de agentes biostáticos

Agentes biostáticos promovem a inibição do crescimento sem que haja a morte das células. Frequentemente, a inibição é provocada pela interferência na síntese proteica, em decorrência de ligação do agente aos ribossomos. A desvantagem do método relaciona-se ao altíssimo custo de implementação (LARSEN *et al.*, 2004).

1.4.6 Controle dos níveis de oxigênio no fluido injetor

O uso de oxigênio em fase sólida, como o peróxido de magnésio (MgO₂), para controle do *souring*, é relatado também como alternativa que resulta em aumento dos níveis de oxigênio. O peróxido de magnésio age através de dois mecanismos: abioticamente oxida sulfeto a sulfato, e bioticamente inibe BRS pelo aumento do potencial redox no meio (CHANG *et al.*, 2007). A aplicação da técnica é pouco descrita na literatura, o que impede maiores discussões sobre seu uso em campo. Uma questão a ser levantada quando ocorre a presença de oxigênio, é a possibilidade da existência, no reservatório, de linhagens de BRS que possuem várias estratégias de defesa quando expostas ao oxigênio (aerotolerantes), que incluem estratégias comportamentais

(formação de agregados celulares) e estratégias moleculares (ativação de sistema enzimático que promove a eliminação do oxigênio) (DOLLA *et al.*, 2006).

Todas as tecnologias citadas anteriormente, além de serem consideradas de alto custo de implementação e, em alguns casos, toxicidade ambiental, não conseguem controlar completamente o crescimento das BRS presentes no reservatório. Estas limitações geram grande interesse no desenvolvimento de métodos alternativos de inativação ou inibição das BRS. Dentre estes métodos inclui-se a aplicação de nitrato para incentivar o crescimento de bactérias redutoras de nitrato (BRN) presentes nos poços e lograr a inibição das BRS. O próximo item descreve, de forma mais detalhada, os mecanismos envolvidos na aplicação do nitrato como alternativa potencialmente promissora no controle de *souring*, bem como, as vantagens e desvantagens do método.

1.5 Uso do Nitrato como Tecnologia Alternativa para Controle de *Souring*

O uso de nitrato nos poços de petróleo, como alternativa de controle na produção de sulfeto, é uma alternativa amplamente estudada e aplicada em escala piloto no setor petrolífero (DAVIDOVA *et al.*, 2001; NEMATİ *et al.*, 2001, DA SILVA *et al.*, 2014). Alguns autores, como Hitzman e Sperl, (1994), em seus estudos chamam a injeção de nitrato de “Tecnologia da Exclusão Biocompetitiva”. Porém, estudos recentes mostram que não só é uma inibição por competição, mas, também existem outros processos envolvidos quando há uma adição de nitrato.

As bactérias redutoras de nitrato heterotróficas (BRN-h) são um grupo presente nos poços de petróleo, utilizam nitrato ou nitrito como aceptor de elétrons e, fontes de carbono orgânico como doador de elétrons, num processo conhecido como desnitrificação heterotrófica. Uma vez adicionado o nitrato, as BRN-h competem com as BRS pela matéria orgânica, porém, o ganho energético das BRN-h é cerca de 10 vezes maior que o das BRS (DAVIDOVA *et al.*, 2001). Thauer (1977) estudou a oxidação de acetato, tanto pela redução de nitrato, quanto pela redução de sulfato, obtendo que a energia livre de Gibbs para a redução de nitrato é de $-495 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NO}_3$, enquanto que na redução de sulfato

foi de $-47 \text{ kJ.mol}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$. Este resultado demonstrou que as BRN-h tem, termodinamicamente, vantagem sobre as BRS, ou seja, na presença de nitrato as BRN-h podem ser mais ativas que as BRS, diminuindo assim a produção de sulfeto (H_2S). Teoricamente, o aumento no número de BRN-h provocaria um maior consumo de fontes de carbono, resultando na limitação de matéria orgânica para as BRS.

Outro grupo presente nos poços de petróleo são as bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS). Essas bactérias são quimiolitotróficas, obtêm energia pela oxidação de compostos inorgânicos de enxofre reduzidos e, sendo assim, são capazes de remover o sulfeto gerado pela atividade de BRS. Nessa condição, o nitrato serve como acceptor final de elétrons para a reoxidação de sulfeto a sulfato ou enxofre. As BRN-OS representam uma linha de pesquisa ainda não explorada para o controle de *souring*, porém, alguns estudos feitos por Nemati (2001) evidenciaram a importância destas no controle do *souring* e do ciclo do enxofre em reservatórios. Na Figura 6 pode-se observar os substratos e produtos envolvidos no metabolismo dos três grupos bacterianos.

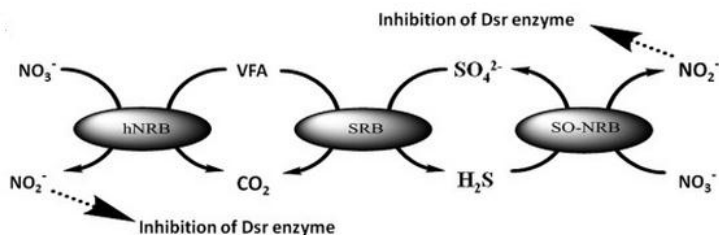


Figura 6: Representação esquemática das relações metabólicas entre BRS, BRN-h e BRS-OS. Fonte Zarasvand e Rai (2014).

As BRN são geralmente microrganismos aeróbios facultativos, apresentam atividade metabólica tanto na presença de oxigênio ou, ausência de oxigênio. Nesse último caso, passam a utilizar um aceptor final de elétrons alternativo, como é o caso do nitrato. (MADIGAN *et al.*, 2004). A redução do nitrato, da mesma forma que o sulfato, pode-se dar por processo assimilativo quanto desassimilativo. O processo assimilativo refere-se à incorporação de íons nitrato pela ação de sistema enzimático, que inclui nitrato e nitrito redutases, resultando na formação de amônia, que posteriormente é incorporada em aminoácidos para síntese proteica (MADIGAN *et al.*, 2004); (ENERGY e INSTITUTE, 2003). Os processos desassimilativos têm uma grande

importância para controle de *souring*. O nitrato pode ser reduzido por duas vias: uma via parcial, na qual o nitrato é reduzido à amônia, tendo como intermediário o nitrito (NO_2^-), e, outra via completa, em que o nitrato é reduzido até gás nitrogênio (N_2), com nitrito, óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) como intermediários.

O nitrito, produto da desnitrificação desassimilativa, é capaz de inibir a ação da enzima sulfito redutase desassimilativa (Dsr - *dissimilatory sulfite reductase*) das BRS. Além de competirem pelo substrato, as BRN também podem inibir diretamente o crescimento das BRS. Outra forma de inibição das BRS é o aumento do potencial redox. A redução desassimilativa do sulfato a sulfeto precisa de um potencial redox inferior a -100 mV, acima deste valor gera a inibição do processo. A redução desassimilativa do nitrato a nitrogênio gasoso produz intermediários, como o nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e amônia (NH_3), que possuem a capacidade de elevar o potencial redox do meio, tornando-o impróprio para o crescimento da BRS (GREENE *et al.*, 2003).

As BRS e BRN são capazes de utilizar fontes de carbonos complexas como doadores de elétrons, porém, uma fonte de carbono de fácil degradação é composta de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (GRIGORYAN *et al.*, 2008).

Existem espécies de BRS que em determinadas condições são capazes de utilizar nitrato ou nitrito como acceptor final de elétrons, formando amônia como produto final. Porém, segundo Krekeler e Cypionka (1995), a capacidade de redução parece se associar à disponibilidade de íons sulfato no meio, ou seja, o metabolismo das BRS seria direcionado à redução de nitrato quando o íon sulfato estivesse limitado. Nesse caso as BRS permanecerão metabolicamente ativas, apenas deixando de produzir sulfeto. Logo, a biogênese de sulfeto voltará a ocorrer numa eventual disponibilidade de sulfato. Neste caso, tem-se o agravante da acidificação do reservatório ser ainda intensa, visto estar a população de BRS em maior número e já adaptada às condições nele presentes.

As características do reservatório, o tipo de fluido injetado, o nível de matéria orgânica e inorgânica na água de injeção e o uso de outros produtos podem ser limitantes no uso do nitrato para controle do *souring*. No entanto, a hipótese de corrosão associada ao nitrato e aos intermediários gerados pela sua própria redução desassimilativa, como por exemplo, o nitrito, deve ser descartada (REMPEL *et al.*, 2006; HUBERT e VOORDOUW, 2007). O nitrato pode intensificar o

processo corrosivo, mas, quando se compara o nitrato com outros ânions encontrados no ambiente marinho, fica evidente que o nitrato é menos agressivo. O nitrito, por sua vez, é um agente inibidor da corrosão em altas concentrações e pode contribuir com este processo quando está presente em baixas concentrações, mas, este tipo de corrosão é encontrado só em grandes profundidades (GENTIL, 2003).

CAPITULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido utilizando um consórcio bacteriano enriquecido a partir de água de produção de um reservatório de óleo *offshore*, o qual foi alimentado com meio específico para crescimento de BRS e BRN por mais de 7 anos. Os ensaios cinéticos para avaliação da relação entre o carbono e o nitrogênio (Relação C:N), para inibição da produção de sulfeto no consórcio estudado foram feitos no Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.1 Enriquecimento da cultura mãe utilizada nos ensaios cinéticos.

Para enriquecer a cultura mãe dos microrganismos a serem usados nos ensaios cinéticos foi utilizado um consórcio bacteriano extraído da água de produção de um reservatório de óleo *offshore*, que vem sendo alimentado desde 2007, em dois reatores de 8 litros. Os reatores são operados em regime de batelada alimentada, com alimentação diária composta de água do mar sintética, acrescida de acetato, propionato e nitrato, conforme apresentado na Tabela 1. Para definição desta água do mar sintética, utilizou-se informações cedidas pela Empresa Petrobrás com relação à composição iônica da água do mar (Anexo1:Tabela 1). A partir destes dados, bem como, de dados obtidos da literatura (NEMATI *et al.*, 2001; KASTER *et al.*, 2007) foi proposto um meio de cultura específico, chamado água do mar sintética (Anexo1:Tabela 2), o qual foi utilizado como base para os ensaios realizados e para o enriquecimento da cultura mãe. À água do mar sintética foi adicionada ainda uma solução de elementos traço (Anexo 1:Tabela3). O objetivo do uso de água do mar sintética é obter a menor variabilidade possível nos resultados, visto que se buscam mimetizar ao máximo as condições naturais.

Tabela 1: Concentrações de acetato, propionato e nitrato adicionadas à cultura mãe.

SUBSTRATO DE ALIMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO
Acetato	33,9 mmol C – $CH_3COO^- \cdot L^{-1}$
Propionato	4,1 mmol C – $CH_3CH_2COO^- \cdot L^{-1}$
Nitrato	7,1 mmol N – $NO_3^- \cdot L^{-1}$

A concentração de carbono obtidas do acetato mais o propionato relacionadas com a concentração de nitrogênio resultam em uma relação C:N de 4,6, a qual, é superior à relação C:N obtida da estequiometria proposta para a desnitrificação, que é de 1,4 (MATEJU *et al.*, 1992). Esta condição, com carbono em excesso em relação ao nitrogênio, visa permitir o estabelecimento de condições para que ocorra também, a sulfato redução nos reatores. Essa condição resulta numa cultura mista contendo organismos desnitrificantes e redutores de sulfato simultaneamente.

2.2 Ensaios cinéticos para seleção do doador de elétron (E1)

2.2.1 Preparo da Biomassa para o ensaio E1.

Para a realização dos experimentos, foram coletados numa proveta, dois litros de biomassa dos reatores com a cultura mãe e deixados decantar por 4 horas. Após, foi descartado o sobrenadante e o precipitado ressuspensionado em um litro de água do mar sintética (Anexo 1), injetando gás argônio para manter a condição de anaerobiose. Esse procedimento foi repetido por cinco vezes, a fim de, realizar uma lavagem da biomassa e minimizar a quantidade de substrato da alimentação diária. Após, foi tomada uma amostra de 30 mL de biomassa e realizadas as análises de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) para determinar a concentração celular resultante. A Figura 7 apresenta o procedimento do preparo da biomassa para o ensaio cinético.

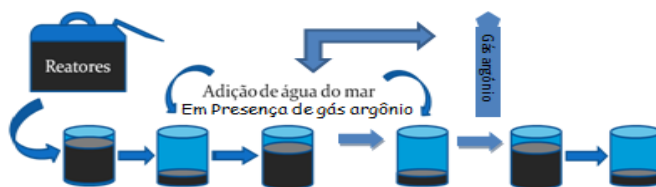


Figura 7: Procedimento de lavagem para o preparo da biomassa.

2.2.2 Meio de Cultura utilizado no ensaio cinético seleção do doador de elétron .

Para as BRS e BRN uma fonte de carbono de fácil degradação é composta de ácidos graxos voláteis de cadeia curta. Com base nisso, foram realizados ensaios cinéticos para definir o melhor doador de elétrons. Foram utilizados como substrato o acetato e o propionato, por serem dois ácidos graxos de cadeia curta de fácil degradação. Foram feitos três ensaios utilizando água do mar sintética, num primeiro foi utilizado acetato na concentração de $81,36 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{COO}^- . \text{L}^{-1}$, no segundo propionato na concentração de $78,9 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- . \text{L}^{-1}$, e no terceiro uma mistura de acetato $81,36 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{COO}^- . \text{L}^{-1}$ e propionato $78,9 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- . \text{L}^{-1}$.

2.2.3 Procedimento para a realização do ensaio cinético de seleção do doador de elétrons.

Para o desenvolvimento de um procedimento que permita medir a produção do sulfeto com diferentes doadores de elétrons, a biomassa preparada no item 2.4.1 foi dividida em três *beckers*. Depois, foram adicionados os substratos selecionados no item 2.4.2, de modo a obter uma concentração celular final de $1 \text{ gSSV} . \text{L}^{-1}$ e a concentração de substratos descritos acima; o resto de nutrientes estão presentes na água do mar sintética (Anexo1). Após, foi distribuída cada condição em 12 frascos de sacrifício de 20 ml e fechados com fita isolante de autofusão para evitar entrada de oxigênio; todo o procedimento foi feito sob borbulhamento de gás argônio para manter as condições de anaerobiose. Uma vez vedados, os frascos foram incubados num *shaker*, com agitação de 200 rpm a 35°C . A Figura 8 apresenta a montagem do ensaio cinético de seleção do doador de elétron.



Figura 8: Montagem do *shaker* utilizado para o ensaio cinético .

As amostras dos ensaios foram coletadas a cada duas horas. As análises para quantificação do sulfeto foram feitas imediatamente após a coleta e, o volume restante de cada amostra foi mantido sob refrigeração a -18°C para posterior quantificação dos íons acetato, propionato, nitrato e nitrito.

2.3 Retirada de sulfeto da biomassa utilizando gás argônio

Para propiciar o início dos ensaios sem a presença do sulfeto a biomassa foi mantida em pH em torno de 7, garantindo com isso que todo o sulfeto estivera na forma gasosa como sulfeto de hidrogênio (H_2S). Para retirar o H_2S do sistema e, simultaneamente, manter a biomassa em estado de anaerobiose borbulhou-se gás argônio, medindo a concentração de sulfeto cada 10 minutos, até que estivesse esgotado. Foram utilizados como ácido regulador de pH o ácido clorídrico (HCl) 0,1M e como base reguladora hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M. A Figura 9 apresenta o tempo necessário para remoção do sulfeto com injeção contínua de gás argônio a partir de uma concentração inicial de aproximadamente 160 mg.L^{-1} .

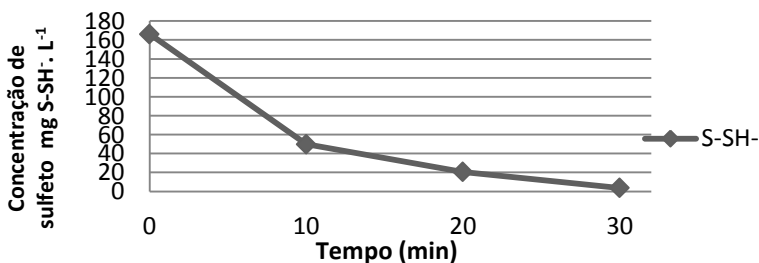


Figura 9: Concentração de sulfeto ao longo do tempo na operação de borbulhamento com gás argônio.

Foi utilizado para os ensaios, o tempo de exposição da biomassa com gás argônio de 30 minutos, mantendo o pH em 7, a fim de garantir com isso a remoção do sulfeto da biomassa.

2.4 Influencia da relação carbono e nitrogênio na produção do sulfeto

Para conhecer a influencia da relação carbono e nitrogênio na produção de sulfeto foram feitos dois ensaios, um primeiro consistiu na mudança de concentrações tanto de carbono como de nitrogênio permitindo relações C:N entre 4,28 e 0,53; e, um segundo, mantendo a concentração de carbono fixa para diferentes concentrações de nitrogênio.

2.4.1 Preparo de biomassa para os ensaios da influencia da relação carbono e nitrogênio na produção de sulfeto.

Foram coletados 2 litros de biomassa dos reatores, mantendo o meio em anaerobiose por meio de injeção de argônio. Posteriormente, estas amostras foram centrifugadas por 5 minutos à velocidade de 4000 *rpm*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente ressuspenso em um litro de água do mar sintética, previamente desaerada com argônio. Na seqüência, foi removido o sulfeto da biomassa conforme descrito no item 2.3 e posteriormente com 30 ml de biomassa foram realizadas as análises de SST, SSF, SSV e fixada a concentração celular em $1gSSV.L^{-1}$.

2.4.2 Ensaio influencia da relação entre carbono e nitrogênio (C:N) variando as concentrações de cada substrato. (E2)

Foram tomadas diferentes concentrações de carbono e nitrogênio, a fim de, obter as relações 4.28, 2.14, 1.07, 0.58; e desta forma, observar qual será a relação C:N que inibiria a produção de sulfeto e, se haveria alguma dependência com a mudança de concentrações de substratos.

Para seleção do meio de cultura utilizado no ensaio foram tomadas concentrações de propionato como fornecedor de carbono e de nitrato como fornecedor do nitrogênio, a fim de, obter as relações C:N em diferentes concentrações.. A Tabela 2 apresenta as relações C:N

utilizadas nos ensaios. Foi usado propionato de cálcio e nitrato de sódio para os ensaios.

Tabela 2: Concentração mássica entre carbono y nitrogênio utilizadas no ensaio influencia da relação entre carbono e nitrogênio (C:N) variando as concentrações de cada substrato. (E2).

<i>Nitrogênio</i> mg N – NO₃⁻. L⁻¹	<i>Carbono mg C – CH₃CH₂COO⁻. L⁻¹</i>		
	60	120	240
14	4,3		
28	2,1	4,3	
56	1,1	2,1	4,3
112	0,5	1,1	2,1
224		0,5	1,1
448			0,5

Para o desarrollo do ensaio foram tomadas três soluções de água do mar sintética: uma com propionato com concentração de 2000 mg.L⁻¹; outra com nitrato com concentração de 5000 mg.L⁻¹; e, uma última só de água de mar sintética como solução diluidora. A Tabela 3 apresenta os volumes adicionados de cada solução para conseguir as concentrações de substrato e relação C:N desejadas. Em total foram testadas 12 condições, com as quatro relações C:N diferentes, em distintas concentrações de carbono e nitrogênio, além disso, foram realizados três ensaios em branco só com propionato para observar a produção de sulfeto.

Tabela 3: Condições utilizadas para o ensaio E2.

Condição	Carbono mgC – $CH_3CH_2COO^- \cdot L^{-1}$	Vol. sol ml $CH_3CH_2COO^-$	Nitrogênio mgN – $NO_3^- \cdot L^{-1}$	Vol. sol ml NO_3^-	C:N	Água mar (ml)
1	60	21,29	14	4,34	4,3	207,70
2	60	21,29	28	8,68	2,1	203,36
3	60	21,29	56	17,36	1,1	194,68
4	60	21,29	112	34,72	0,5	177,32
5	120	42,58	28	8,68	4,3	182,07
6	120	42,58	56	17,36	2,1	173,39
7	120	42,58	112	34,72	1,1	156,03
8	120	42,58	224	69,44	0,5	121,31
9	240	85,17	56	17,36	4,3	130,80
10	240	85,17	112	34,72	2,1	113,44
11	240	85,17	224	69,44	1,1	78,72
12	240	85,17	448	138,8	0,5	9,28
13	60	21,30	0,00	0,00		212,04
14	120	42,58	0,00	0,00		190,75
15	240	85,17	0,00	0,00		148,16

Depois da misturadas soluções, foi borbulhado argônio por cinco minutos para manter o substrato livre de oxigênio, adicionou-se em cada condição 116,67 mL de biomassa preparada conforme item 2.5.1, de modo a obter uma concentração celular de $1 \text{ gSSV} \cdot L^{-1}$. Após, cada solução foi distribuída em 10 frascos de sacrifício com volume útil de 20 mL e, fechada com fita de alta pressão para evitar entrada de oxigênio. Os frascos foram incubados em *shaker* com agitação de 200 rpm a 35°C. As coletadas das amostras dependeram da produção de sulfeto; a cinética durou de 90 horas. A cada coleta, foi feito os análises de sulfeto o restante de amostra coletada foi incubada no *freezer* a -18°C até o momento da análise de nitrato, nitrito, acetato e propionato.

2.4.3 Ensaio cinético influencia das relações C:N ao longo do tempo na produção de sulfeto. (E3)

Um segundo ensaio cinético foi proposto para aprofundar o conhecimento da influência da relação C:N na produção de sulfeto. Para isso, foram avaliadas três relações C:N mantendo uma concentração fixa de carbono, para três de nitrogênio; de tal forma que permitissem observar não só a produção de sulfeto em função da relação C:N, mas também a concentração mínima para não permitir a produção de sulfeto. A metodologia para o preparo da biomassa foi realizada conforme item 2.4.1 e a remoção de sulfeto conforme item 2.3. Para o meio de cultura utilizado na cinética influencia das reações C:N ao longo do tempo na produção de sulfeto foram avaliadas três concentrações distintas de nitrogênio (14, 56 e 112 $\text{mg N} - \text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$) frente à uma única concentração de carbono (60 $\text{mgC} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1}$), obtendo relações C:N acima e abaixo da estequiometria da desnitrificação (4,3, 1,1 e 0,5 respectivamente). A Tabela 4 mostra as concentração mássica de carbono-nitrogênio e as relações avaliadas.

Tabela 4: Concentrações do meio de cultura para o ensaio cinético E3.

Nitrogênio $\text{mg N} - \text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$	Carbono $\text{mgC} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1}$
	60
14	4,3
56	1,1
112	0,5

Para o desenvolvimento do ensaio cinético foram feitas três soluções em água do mar sintética; uma solução com propionato em concentração $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, outra com nitrato com concentração $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e uma última só de água do mar sintética como solução diluidora. Na Tabela 5 são apresentadas as relações C:N avaliadas e os volumes adicionados em cada condição, deixando uma condição como branco para monitoramento da produção de sulfeto. O ensaio foi feito em duplicata e em presença de gás argônio para manter sistema em anaerobiose.

Tabela 5: Volumes adicionados nos ensaios da cinética E3.

Condição	C:N	Vol. sol $CH_3CH_2COO^-$ (mL)	Vol. sol NO_3^- (mL)	Água do mar sintética (mL)
1	4,3	121,67	62,00	545,00
2	1,1	121,67	248,00	297,00
3	0,5	121,67	496,00	49,00
4		121,70	0,000	544,97

Em cada solução foi adicionado 333 ml de biomassa, a fim de, ter numa concentração de $1gSSV.L^{-1}$. Após, foram distribuídos 400 mL de cada solução em frascos de 500 mL com sistema para permitir a coleta das amostras e vedados com fita de alta pressão para manter o sistema em anaerobioses. Os frascos foram incubados em *shaker* com agitação de 200 rpm a 35°C e, as amostras foram coletadas a cada 5 horas durante 45 horas. As análises para quantificação do sulfeto foram feitas imediatamente após a coleta e, o volume restante de cada amostra foi mantido sob refrigeração a -18°C para posterior quantificação dos íons acetato, propionato, nitrato e nitrito.

2.5 Ensaio cinético para verificação da atividade de Bactérias Redutoras de Nitrato Oxidadoras de Sulfeto (BRN-OS) no consorcio estudado. (E4)

O ensaio proposto busca confirmar a presença de Bactérias Redutoras de Nitrato Oxidadoras de Sulfeto (BRN-OS) no consórcio estudado. Para isso, foi feito o preparo da biomassa conforme descrito no item 2.5.3 e utilizadas duas soluções em água do mar sintética: uma com propionato com concentração $60 mg C - CH_3CH_2COO^- . L^{-1}$ e outra com nitrato com concentração de $4000 mg N - NO_3^- . L^{-1}$. Após, à solução de carbono feita, foi adicionada biomassa, a fim de, ter uma concentração de $1gSSV.L^{-1}$ em 1000 mL de solução. 400 mL da solução foram distribuídos em 2 frascos de 500 mL com sistema para permitir a coleta das amostras. Os frascos reatores foram colocados no *shaker*, com agitação de 200 rpm a 35°C. As amostras foram coletadas a cada 5 horas, fazendo as análises para conhecer o consumo do propionato e a produção do sulfeto. Uma vez que todo o propionato foi consumido, foi injetado 10ml da solução de nitrogênio no frasco reator;

continuou-se coletando amostras cada 2 horas até esgotar o sulfeto do sistema.

2.6 Determinações analíticas

2.6.1. Cromatografia de íons

Antes da análise das amostras, estas foram filtradas em membrana 0,22 μm e estocadas em frascos de vidro a -4°C . No momento da injeção, as amostras foram diluídas 80 vezes com água ultra pura para redução da interferência do cloreto na determinação dos demais íons. Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo de íons ICS 5000 (Dionex), equipado com dois sistemas cromatográficos em paralelo para detecção amperométrica e condutivimétrica.

As análises de determinação de concentrações de acetato, propionato, nitrato, nitrito foram realizadas utilizando-se detecção condutivimétrica com supressão eletrolítica. foi utilizada água ultra pura como eluente externo e hidróxido de potássio (KOH) como gerador de eluente interno. Para separação dos ânions, utilizou-se coluna capilar IonPac AS18-Fast (0,4 x 150 mm) e pré-coluna IonPac AG18-Fast (0,4 x 35 mm), ambas da marca Dionex, com volume de injeção de 0,4 μL e vazão do eluente externo de 0,012 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Utilizou-se temperatura de 30°C e 35°C na coluna e detector, respectivamente. O programa de operação para separação dos íons de interesse foi considerado conforme segue:

0 a 5 min – isocrático a 1,5 mM

5 a 16 min – gradiente de 1,5 a 50 mM

16 a 18 min – isocrático a 50 mM

18 a 19 min – gradiente de 50 a 1,5 mM

19 a 35 min – isocrático a 1,5 mM

Para a análise da determinação da concentração de sulfeto foi também utilizada a cromatografia iônica, porém, utilizando-se detecção amperométrica. Neste caso foi utilizado como único eluente uma solução composta de acetato de sódio (400 mM) e hidróxido de sódio (200 mM) à vazão de eluente de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O volume injetado foi de 10 μL e, para separação dos íons empregou-se uma coluna do tipo IonPac AS7 (2 x 250 mm) e pré-coluna IonPac AG7 (2 x 50 mm), ambas da marca Dionex. A temperatura da coluna foi de 40°C . Para

análise de sulfeto as amostras foram diluídas 200 vezes em função da alta sensibilidade do equipamento.

2.6.2. Determinação da série de sólidos - Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Fixos (SSF) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

A concentração de biomassa foi estimada através da determinação de sólidos suspensos voláteis (APHA *et al.*, 1995), com modificação do protocolo originalmente descrito pela utilização de forno microondas para secagem das amostras (TEIXEIRA *et al.*, 2008). A técnica utilizada consiste em filtração das amostras em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 μm de diâmetro, seguida de secagem em microondas (15 min com 20% de potência) para determinação da concentração de SST (sólidos suspensos totais). Após isso, as amostras foram calcinadas em mufla (550°C – 1 hora) para queima da fração orgânica da amostra, permitindo a determinação da concentração de SSF (sólidos suspensos fixos). A concentração de SSV foi estimada pela diferença entre a concentração de SST e SSF encontradas.

2.6.3. Controle do pH e de oxigênio das amostras

Para o controle do pH nos ensaios cinéticos realizados foi utilizado um pHmetro de bancada com eletrodo combinado universal de vidro de referencia Ag/AgCl, e para leitura da concentração de oxigênio utilizou-se um oxímetro de bancada OXI340[®] com sonda CelIOX325. Os equipamentos foram previamente calibrados antes de serem usados.

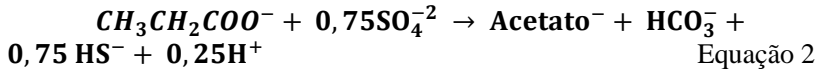
CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio cinético para avaliação de acetato e propionato como doador de elétron para o consórcio estudado (E1).

3.1.1 Determinação da estequiometria teórica da redução biológica do sulfato

Os processos de redução heterotrófica do sulfato a sulfeto podem ser simplificados pelos equações 1 e 2 Muyzer e Stams, (2008):



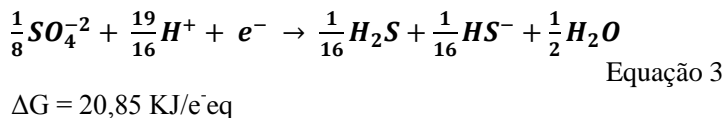
Contudo, para melhor compreensão do processo biológico, foi necessário estimar as equações estequiométricas teóricas para a redução do sulfato de modo a contemplar também a fração de elétrons e de carbono utilizados no crescimento celular. Foram desenvolvidas duas equações, sendo uma para o acetato e outra para o propionato, em ambos os casos considerando o nitrato como fonte de nitrogênio para a formação das células. O procedimento para obtenção das equações estequiométricas para consumo de substrato contemplando o crescimento celular foi realizado conforme descrito por Bruce E. Rittmann e McCarty (2001), conforme segue:

3.1.1.1. *Reação de energia a partir do sulfeto e do acetato*

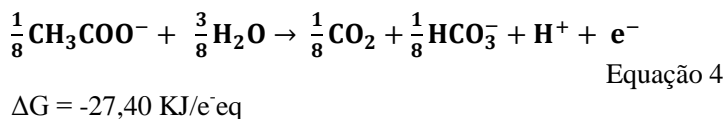
Re – Reação de energia a partir do sulfato e do acetato

A reação de energia (Re) (equação 5) pode ser obtida a partir das semi-reações de redução do sulfato (Ra) (equação 3) e oxidação do acetato (Rd) (equação 4):

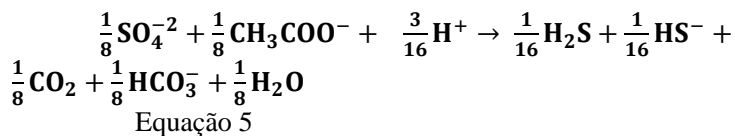
Ra – reação do acceptor de elétrons



Rd – reação do doador de elétrons

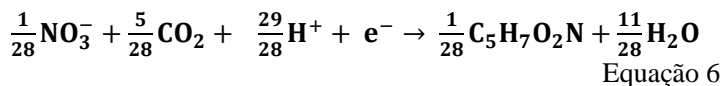


Reação de energia resultante (Re): Re= Ra+Rd

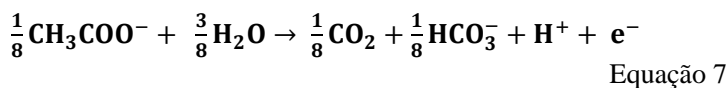


De modo análogo, a reação de crescimento celular (Rs) (equação 8) é obtida a partir das semi-reações da síntese de células (Rc) (equação 6) e do doador de elétrons (Rd) (equação 7), considerando a fórmula geral da célula como (Rs) (equação 8):

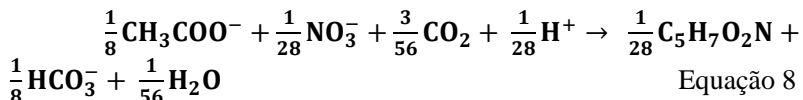
Rc – reação de síntese de células a partir do nitrato



Rd – reação do doador de é / fonte de carbono

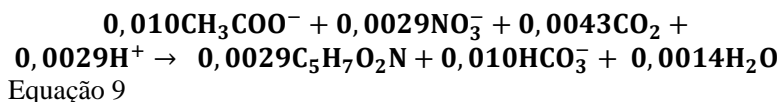


Reação de síntese resultante (Rs): Re= Rc+Rd

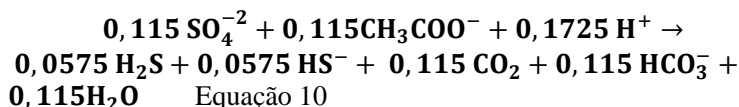


Considerando-se um coeficiente de partição de elétrons $f_e=0,08$ para o crescimento celular a partir da redução de sulfato com acetato como fonte de carbono (Bruce E. Rittmann e McCarty, 2001), pôde-se então determinar a equação global (R) (equação 12) para redução biológica do sulfato conforme segue abaixo:

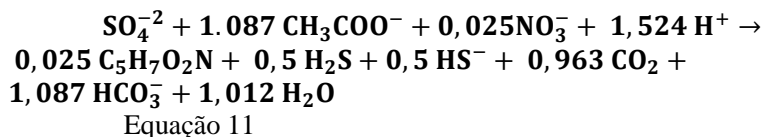
Rs x 0,08



Re x 0,92



R = Rs + Re

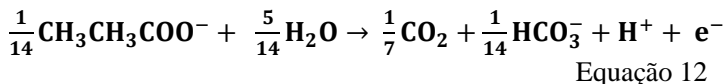


3.1.1.2. *Reação de energia a partir do sulfeto e do propionato*

Re – Reação de energia a partir do sulfato e do propionato

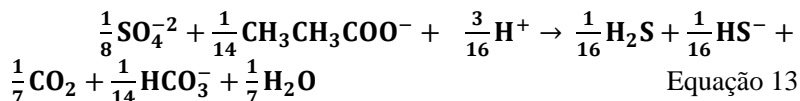
A reação de energia para o propionato como doador de elétron (Re) (equação 14) pode ser obtida a partir das semi-reações de redução do sulfato (Ra) (equação 3) e oxidação do propionato (Rd) (equação 12):

Rd – reação do doador de elétrons



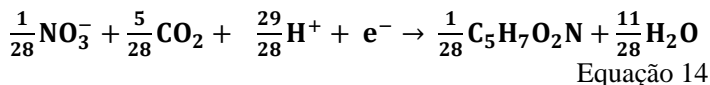
$$\Delta G = -27,63 \text{ KJ/e}^- \text{ eq}$$

Reação de energia resultante (Re): Re=Ra + Rd

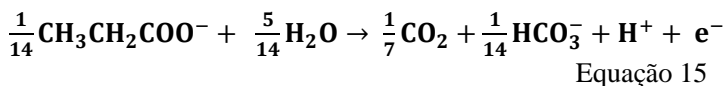


De modo análogo, a reação de crescimento celular (Rs) (equação 16) é obtida a partir das semi-reações da síntese de células (Rc) (equação 14) e do doador de elétrons (Rd) (equação 15).

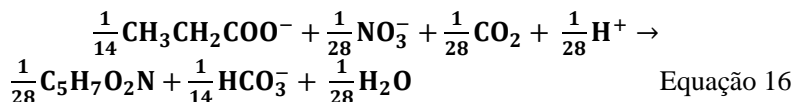
Rc – reação de síntese de células a partir do nitrato



Rd – reação do doador de elétrons / fonte de carbono



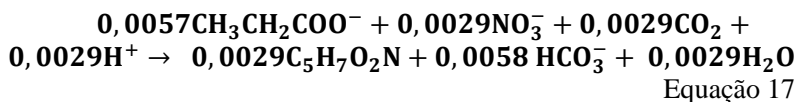
Reação de síntese resultante (Rs): Rs=Rc + Rd



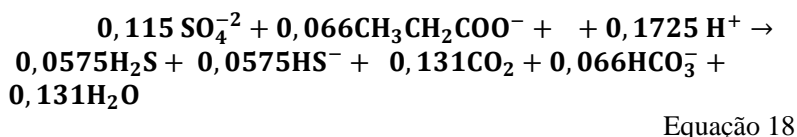
Foi considerado um coeficiente de partição de elétrons $f_e=0,08$ para o crescimento celular a partir da redução de sulfato com acetato como fonte de carbono (RITTMANN e MCCARTY, 2001), por que na literatura não existe um coeficiente para o propionato; porém, as energias de Gibbs do acetato e propionato são similares. Com isso,

pôde-se então determinar a equação global (R) (equação 19) para redução biológica do sulfato conforme segue abaixo:

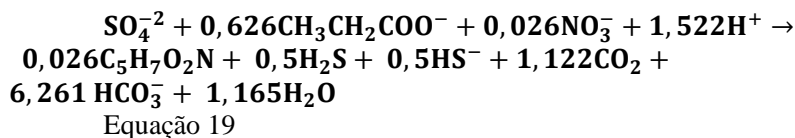
Rs x 0,08



Re x 0,92



R = Rs + Re



Com base nas equações de estequiométricas para a redução do sulfato desenvolvidas para acetato e propionato como doadores de elétrons, conforme procedimento descrito por Bruce Rittmann e Mccarty (2001), Espera-se uma produção máxima de $0,51 \text{ mgS} - \text{SH}^- \cdot \text{mg}^{-1}\text{C} - \text{CH}_3\text{COO}^-$ e $0,72 \text{ mgS} - \text{SH}^- \cdot \text{mg}^{-1}\text{C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$. Note-se que esta produção é para degradação completo do propionato até o dióxido de carbono (CO_2) e nesse caso o propionato estequiometricamente fornece mais sulfeto do que o acetato; porém, também pode ocorrer degradação incompleta do propionato até acetato o qual deixaria um residual de acetato no sistema.

3.1.2 Resultados obtidos no ensaio cinético de avaliação do acetato e o propionato como doador de elétrons.

Para compreensão dos resultados do ensaio cinético foi apresentado primeiro a produção de sulfeto para cada uma das três

condições avaliadas e segundo, o consumo do acetato e/ou propionato relacionada com a produção de sulfeto em cada condição testada.

A Figura 10 mostra os resultados de produção de sulfeto obtidos para cada doador de elétrons adicionado. Note-se que o procedimento para preparo da biomassa realizado conforme item 2.2.1 não conseguiu remover o sulfeto gerado nos reatores de cultura mãe, é por isso, que no início dos ensaios cinéticos existe um remanente de sulfeto de $50 \text{ mg S} - \text{SH}^- \cdot \text{L}^{-1}$. Observa-se que no ensaio com acetato a produção de sulfeto cessou após 8 horas num patamar de concentração muito inferior ao dos outros ensaios. Já no ensaio com propionato, a produção de sulfeto continuou até o final da cinética em 20 horas, mostrando tendência à estabilização. O ensaio com adição de acetato + propionato teve uma produção de sulfeto variável, porém, com tendências parecidas àquelas obtidas com o propionato. Uma análise mais detalhada deste comportamento é apresentada a seguir avaliando a cinética dos ácidos orgânicos adicionados em cada um dos ensaios, em conjunto com as curvas de produção de sulfeto.

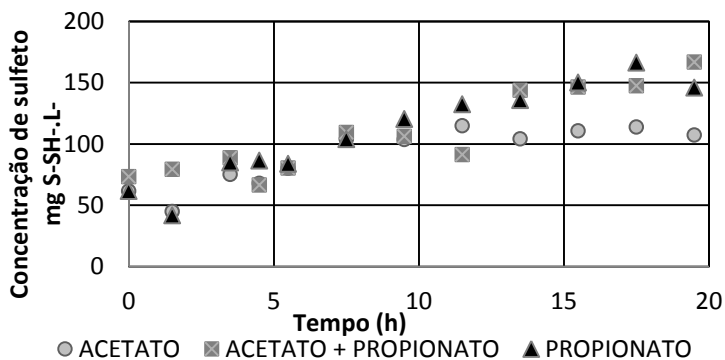


Figura 10: Concentração de sulfeto obtido nas três condições avaliadas nos ensaio cinético realizado (E1).

A Figura 11 mostra a concentração do acetato e a produção do sulfeto no ensaio onde só havia acetato como única fonte de carbono; note-se que o consumo da concentração de acetato teve uma queda das 5 as 10 horas (linha marcada em X na gráfica); esta queda não pode ser explicada só com os ensaios feitos, porém, pode ter sido ocasionada por desequilíbrio ou stress dos microrganismos, ou ser um efeito decorrente do procedimento de lavagem da biomassa pra retirar as cargas do substratos da alimentação.

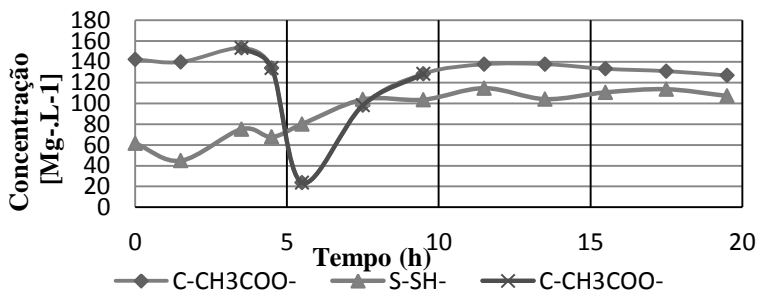


Figura 11: Concentração de sulfeto e de acetato na condição onde só tem acetato como doador de elétrons (E1).

A relação entre a produção de sulfeto e o consumo do acetato medida após da queda do acetato (depois de 10 horas de cinética), foi de $0,65 \text{ mgS} - \text{SH}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{C} - \text{CH}_3\text{COO}^-$. Porém, após das 10 horas, as variações tanto de velocidade de produção de sulfeto como de velocidade de consumo de acetato não são significativas.

Já na condição onde só apenas o propionato foi adicionado (Figura 12) a produção de sulfeto com relação ao consumo do propionato foi de $5,12 \text{ mgS} - \text{SH}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$; a qual é, muito superior à relações estequiométricas teóricas desenvolvidas. A velocidade de produção de sulfeto foi de $5,07 \text{ mgH} - \text{HS}^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Vale ressaltar que no ensaio se evidencia que mesmo tendo um residual de $20,3 \text{ mgC} - \text{CH}_3\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato (proveniente do meio de cultura) este tem uma geração de acetato, produzido possivelmente da oxidação incompleta do propionato.

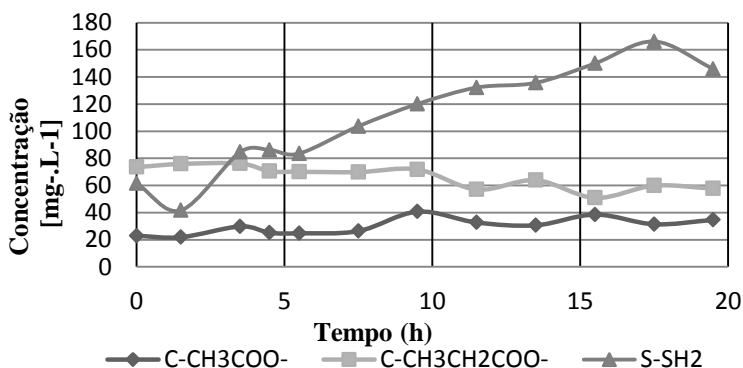


Figura 12: Concentração de sulfeto, propionato e de acetato na condição onde só tem propionato como doador de elétrons (E1).

Na condição em que a mesma quantidade de acetato foi fornecida juntamente com o propionato (Figura 13), observa-se a mesma queda temporária do acetato nas primeiras horas a qual foi repetitiva em todas os ensaios realizados com acetato como substrato. No entanto, sem ter em conta a queda na curva, a concentração de acetato foi praticamente constante ao longo do ensaio, o que indicaria que a velocidade de consumo do acetato seria equivalente à de produção a partir do propionato, uma vez que o propionato pode ser convertido numa degradação incompleta até acetato. A relação entre a produção de sulfeto e o consumo do propionato foi de $3,75 \text{ mgS} - \text{SH}^- . \text{mg}^{-1} \text{C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$. Cabe destacar que a produção de sulfeto neste ensaio não foi constante, tendo duas quedas às 5 e 12 horas do ensaio, possivelmente por erros analíticos no tratamento das amostras. Esta variabilidade na produção do sulfeto dificultou a análise da velocidade real de produção sulfeto.

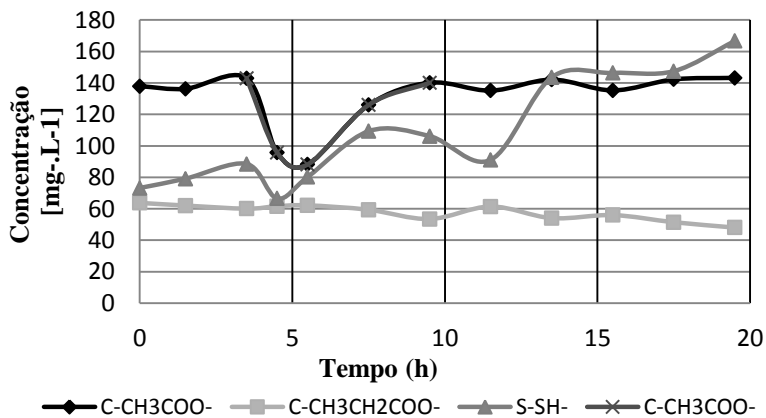


Figura 13: Produção de sulfeto e consumo dos substratos na condição onde tem acetato e propionato como substrato (E1).

Note-se que as relações de consumo de acetato ou propionato com a produção de sulfeto obtidos na prática são superiores à relações obtidas nas equações de estequiometria teóricas desenvolvidas. Esta produção de sulfeto excedente não pode ser explicada por não ter uma

caracterização microbiológica completa do consórcio estudado, sugerindo que o sulfeto pode ser gerado por outras rotas metabólicas e não só pela degradação do acetato e/ou propionato.

No entanto, observou-se que nos ensaios que tinham o propionato como substrato existe uma produção de acetato o que confirma que o consórcio esta degradando parte do propionato de forma incompleta até acetato. Com este fato os ensaios posteriores para o estudo da relação C:N foram feitos apenas com o propionato como doador de elétrons, garantindo desta forma a atividade dos metabolismos que utilizam propionato e dos que utilizam acetato como doadores de elétrons.

3.2 Influencia da relação carbono e nitrogênio na produção do sulfeto.

3.2.1 Resultados obtidos no ensaio influencia da relação entre carbono e nitrogênio (C:N) variando as concentrações de cada substrato. (E2)

Para avaliar a influência da relação C:N sobre a atividade das BRS foram testadas 12 condições distintas em relação à disponibilidade de carbono (propionato) e nitrogênio (nitrato), de modo a repetir relações C:N com diferentes concentrações de carbono e nitrato, conforme descrito no item 2.4.2. Os resultados apresentados na Tabela 6 correspondem às concentrações de sulfeto, nitrito, propionato e acetato, no final do ensaio (96 horas); não foi apresentada a concentração de nitrato por que já tinha sido consumido totalmente.

Tabela 6: Valores das concentração de íons para cada relação C:N testada no ensaio E2. (Relações C:N 4,3, 2,1, 1,1 e 0,5 em sobrescrito)

		Propionato inicial (mg C.L ⁻¹)		
		60	120	240
		Sulfeto (mg S-SH.L⁻¹)		
Nitrato inicial (mg N-NO₃.L⁻¹)	14	390 ^(4,3)	-	-
	28	242 ^(2,1)	217 ^(4,3)	-
	56	101 ^(1,1)	83 ^(2,1)	111 ^(4,3)
	112	0 ^(0,5)	6 ^(1,1)	68 ^(2,1)

		Propionato inicial (mg C.L ⁻¹)		
		60	120	240
	224	-	0 ^(0,5)	0 ^(1,1)
	448	-	-	0 ^(0,5)

Nitrito (mg N-NO ₂ ⁻ .L ⁻¹)				
Nitrato inicial (mg N-NO ₃ .L ⁻¹)	14	0 ^(4,3)	-	-
	28	0 ^(2,1)	0 ^(4,3)	-
	56	0 ^(1,1)	0 ^(2,1)	0 ^(4,3)
	112	31,5 ^(0,5)	0 ^(1,1)	0 ^(2,1)
	224	-	111,6 ^(0,5)	0 ^(1,1)
	448	-	-	243,2 ^(0,5)

Propionato (mg C-CH ₃ CH ₂ COO ⁻ .L ⁻¹)				
Nitrato inicial (mg N-NO ₃ .L ⁻¹)	14	0 ^(4,3)	-	-
	28	22,3 ^(2,1)	66 ^(4,3)	-
	56	8,4 ^(1,1)	46 ^(2,1)	142,6 ^(4,3)
	112	0 ^(0,5)	8,8 ^(1,1)	96,3 ^(2,1)
	224	-	0 ^(0,5)	0 ^(1,1)
	448	-	-	0 ^(0,5)

Acetato (mg C-CH ₃ COO ⁻ .L ⁻¹)				
Nitrato inicial (mg N-NO ₃ .L ⁻¹)	14	39 ^(4,3)	-	-
	28	17 ^(2,1)	24 ^(4,3)	-
	56	14 ^(1,1)	19 ^(2,1)	18 ^(4,3)
	112	0 ^(0,5)	14 ^(1,1)	
	224	-	0 ^(0,5)	19 ^(1,1)
	448	-	-	0 ^(0,5)

Observe-se que as condições onde a relação C:N testada foi de 0,5 apresentaram um consumo completo da matéria orgânica (Tabela 6), apresentando um residual variado de nitrito, aparentemente inibindo a produção de sulfeto pela indisponibilidade de matéria orgânica. Para as condições onde as relações C:N foram de 4,3; 2,2; 1,1 houve formação de sulfeto em todas, porém, a quantidade total de sulfeto formada não foi proporcional ao consumo de matéria orgânica. Isso ocorreu como era esperado, porque houve residual de propionato e acetato em todas as condições, de modo que a produção de sulfeto esteve aparentemente relacionada apenas ao tempo de formação de sulfeto a partir do ponto de término do nitrito. A Figura 14 apresenta a produção de sulfeto acumulada em 96 horas de ensaio para as três concentrações de

propionato ($C - CH_3CH_2COO^-$), nas diferentes concentrações iniciais de nitrato ($N - NO_3^-$).

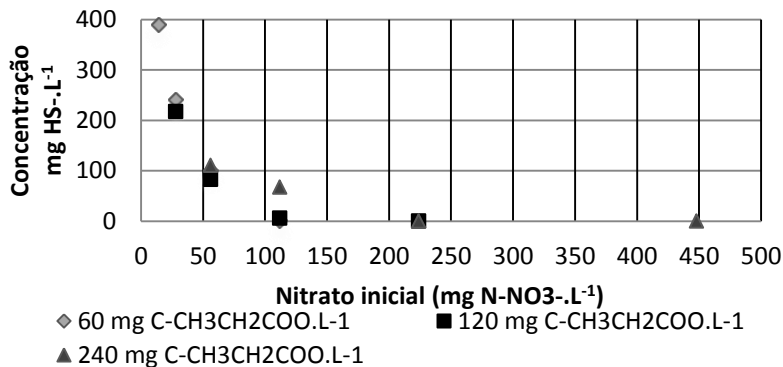


Figura 14: Concentração de sulfeto acumulada do ensaio em função da concentração de nitrato inicial para cada concentração de propionato (E2).

É evidente que, mesmo mudando a relação C:N, a produção de sulfeto continua sendo igual (ponto na Figura 14 onde a concentração inicial de nitrato é 56 mg $N - NO_3^- \cdot L^{-1}$). Desta forma, pode-se afirmar que independentemente das concentrações de carbono utilizadas, a produção de sulfeto pode ser limitada pela quantidade de nitrato ou nitrito no sistema. Além disso, pode-se dizer que a relação C:N propriamente dita, não é um fator que resulte na inibição ou estímulo das BRS; mas, sim a influência da presença ou ausência de nitrato, ou nitrito, independentemente da concentração de matéria orgânica no meio.

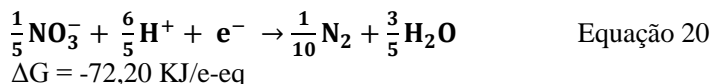
3.2.2 Determinação da estequiometria de redução biológica do nitrato por desnitrificação heterotrófica.

Para melhor compressão dos resultados do ensaio cinético de influencia das relações C:N; foram desenvolvidas as estequiometrias de redução biológica do nitrato conforme descrito por Rittman e McCarty (2001), para isso, utilizou-se a reação de energia a partir do nitrato e do propionato conforme segue:

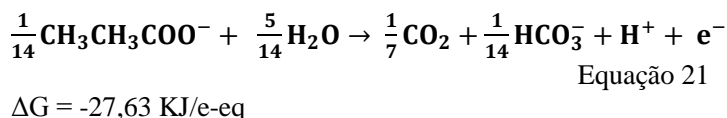
Re – Reação de energia a partir do nitrato e do propionato

A reação de energia (Re) (equação 22) pode ser obtida a partir das semi-reações de redução do nitrato (Ra) (equação 20) e oxidação do propionato (Rd) (equação 21):

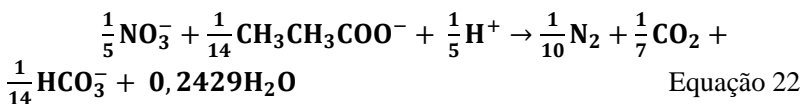
Ra – reação do acceptor de elétrons



Rd – reação do doador de elétrons

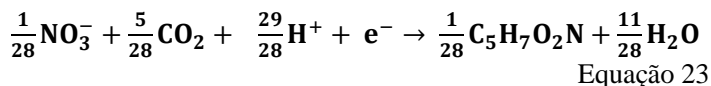


Reação de energia resultante (Re): Re=Ra+Rd

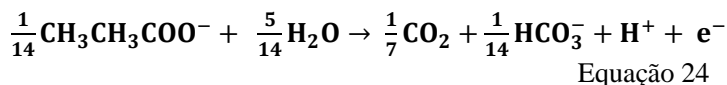


De modo análogo, a reação de crescimento celular (Rs) (equação 25) é obtida a partir das semi-reações da síntese de células (Rc) (equação 23) e do doador de elétrons (Rd) (equação 24):

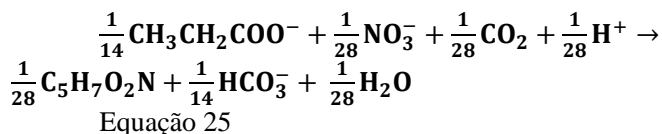
Rc – reação de síntese de células a partir do nitrato



Rd – reação do doador de elétrons / fonte de carbono

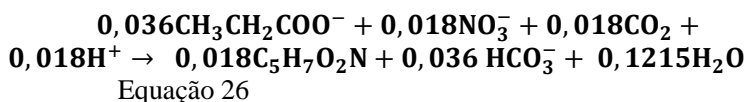


Reação de síntese resultante (Rs): Rs=Rc+Rd

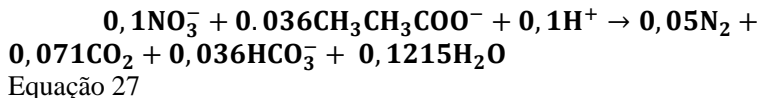


Considerando-se um coeficiente de partição de elétrons de 0.5 para o crescimento celular a partir da redução de nitrato com propionato como fonte de carbono (RITTMANN e MCCARTY, 2001), pôde-se então determinar a equação global para redução biológica do sulfato (R) (equação 28), conforme segue abaixo:

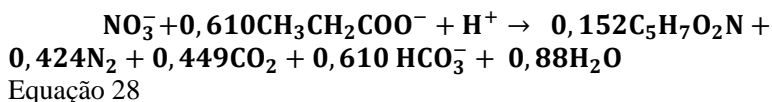
Rs x 0,5



Re x 0.5



R = Rs + Re



Com base nas equações estequiométricas para a redução do nitrato com propionato como doador de elétrons desenvolvidas conforme procedimento descrito por Bruce Rittmann e Mccarty (2001), Espera-se relação entre consumo de nitrato e propionato de 0,72 mg $\text{C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- . \text{mg}^{-1} \text{N} - \text{NO}_3^-$. Note-se que esta equação estequiométrica é para redução completa do nitrato até gás nitrogênio (N_2). Madigan (2004) afirma que na redução completa do nitrato existem intermediários como nitrito (NO_2), óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O).

3.2.3 Resultados ensaio cinético de influencia das relações C:N ao longo do tempo na produção de sulfeto. (E3)

A Figura 15 apresenta o resultados da cinética para uma relação C:N de 4,3. Note-se que a formação de sulfeto, mesmo em presença de matéria orgânica, começa 3 horas após de ter terminado o nitrato, não houve acumulo de nitrito ao longo do tempo.

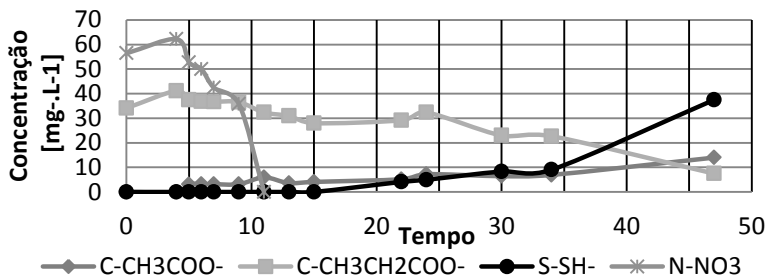


Figura 15: Concentração de íons ao longo da cinética numa relação C:N 4.3 (E3).

A relação entre o consumo do propionato e do nitrato para a relação C:N de 4,3 foi de $0,57 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{ N} - \text{NO}_3^-$; note-se que esta relação é inferior à obtida nas estequiometrias teóricas desenvolvidas que foi de $0,72 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{ N} - \text{NO}_3^-$. Porém, esta estequiometria foram propostas para reação completa do propionato até dióxido de carbono (CO_2) e nos ensaios, quando esgotou-se o nitrato ainda existe um acetato no sistema produto da redução incompleta do propionato. A velocidade de consumo do propionato até o esgotamento do nitrato (11 horas) foi de $0,964 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A Figura 16 apresenta as resultados obtidos no ensaio onde a relação C:N era de 1,1. Cabe dizer, que o sulfeto aparece após 10 horas do esgotamento do nitrito acumulado (30 horas), o que evidencia que na medida em que aumenta a concentração de nitrato aumenta também a faixa entre o fim da degradação das fontes nitrogenadas e o começo da produção de sulfeto.

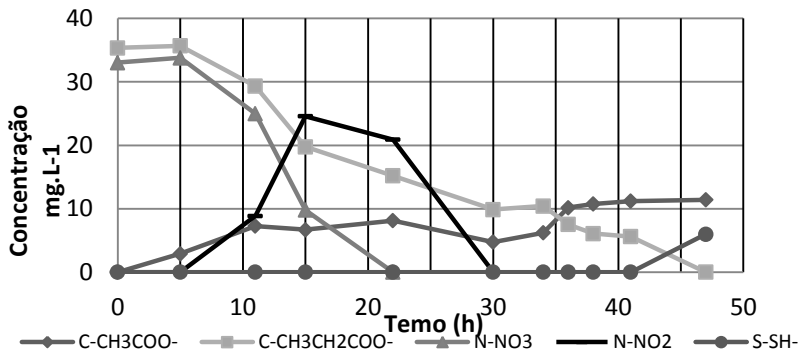


Figura 16:Concentração de íons ao longo da cinética numa relação C:N de 1,1 (E3).

A velocidade de consumo do propionato até o esgotamento do nitrito (30 horas) foi de $0,985 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, porém uma parte do propionato foi convertido em acetato o qual não foi consumido. A relação entre o consumo do propionato e do nitrato foi de $0,58 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{N} - \text{NO}_3^-$; porém, a parte do propionato foi convertido até acetato. Note-se também que, havendo nitrato ou nitrito no meio a atividade de redução do sulfato ficou inibida, sendo restabelecida uma vez que estes compostos nitrogenados (nitrato e/ou nitrito) foram consumidos e haja ainda matéria orgânica disponível para sustentar a atividade das BRS.

Os resultados do ensaio da relação C:N de 0.5 são apresentados na Figura 17. Note-se que a o propionato e o nitrato foram esgotados do sistema ao mesmo tempo (22 horas), deixando um residual de nitrito no sistema que não permite a produção de sulfeto.

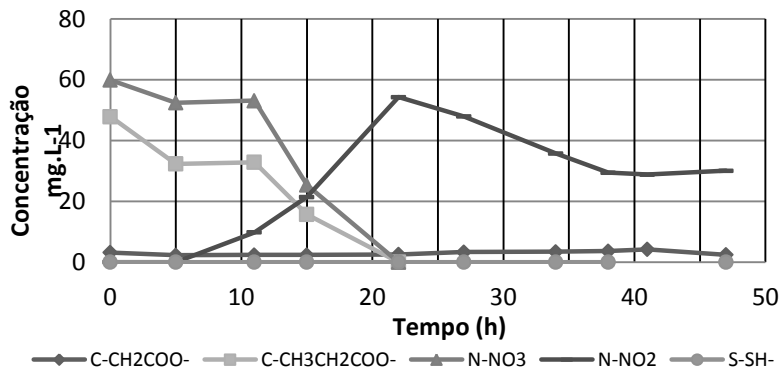


Figura 17: Concentração de íons ao longo da cinética numa relação C:N de 0,5 (E3).

A relação entre o consumo do propionato e do nitrato para a relação C:N de 0,5 foi de $0,76 \text{ mg C} - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{N} - \text{NO}_3^-$ a qual é, um pouco superior à obtidas nas estequiometrias teóricas desenvolvida, porém não foi levado em conta o nitrito que foi gerado e que ficou como remanente no meio. além disso, cabe destacar que nesta relação todo o propionato foi até dióxido de carbono (CO_2) e não como nas outras dos relações C:N (4,3 e 1,1) que foi gerado acetato e ficou como remanente no sistema.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios pode-se evidenciar que a produção de sulfeto é inibida pela presença do nitrato ou nitrito, além disso, na medida que a concentração de nitrato inicial é maior, também a faixa de restabelecimento da geração de sulfeto aumenta uma vez o nitrato e nitrito é esgotado do sistema. Isso pode dever-se ou por que o nitrito gerado produto da desnitrificação desassimilativa do nitrato, é um inibir enzima sulfito redutase desassimilativa (Drs) das bactérias redutoras de sulfato (BRS); ou por que os produtos intermediários da redução de nitrato (nitrito oxido nítrico e oxido nítrico) aumentam o potencial redox por acima de -100 mV tornando o sistema impróprio para crescimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS). (GREENE *et al.*, 2003).

Outro fato importante é que para manter uma inibição da produção de sulfeto ao longo do tempo, é necessária uma relação C:N máxima de 0,5; já que esta relação além de garantir o consumo de matéria orgânica, também, mantém um remanente de nitrato que inibe o metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS) o qual é o

principal gerador de sulfeto. (DAVIDOVA *et al.*, 2001; HUBERT *et al.*, 2003). Deste modo, para manter a supressão da atividade de redução do sulfato, deve-se ter nitrato suficiente para que o mesmo não seja totalmente consumido durante a passagem da água de injeção pela zona biótica.

Como em reservatórios de petróleo a matéria orgânica pode ser considerada um substrato praticamente inesgotável, visto que algumas espécies de bactérias redutoras de sulfato (BRS) são boas degradadoras de hidrocarbonetos, a abordagem para inibição do *souring* através do uso de nitrato deve levar em conta questões como o tempo de retenção da água injetada na zona biótica do reservatório, de modo que, é necessária uma relação C:N de 0,5 até o final desta zona. Reservatórios com temperaturas mais baixas obviamente irão necessitar concentrações maiores de nitrato para controlar a atividade das BRS, visto que irão ter uma zona biótica mais ampla. Também deve ser considerado o crescimento da biomassa ao longo do tempo. Com a introdução de nutrientes no poço a biomassa enriquece em BRN-h junto à zona de injeção, acelerando ainda mais o consumo do nitrato. Deste modo, espera-se que seja necessário um incremento contínuo na concentração do nitrato para garantir que o mesmo não seja totalmente consumido até o final da zona biótica.

3.3 Ensaio cinético verificação da atividade de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS) no consorcio estudado (E4).

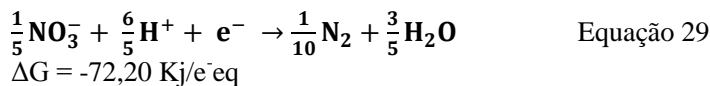
3.3.1 Determinação da estequiometria teórica de redução biológica do nitrato por desnitrificação autotrófica.

O procedimento para obtenção das equações estequiométricas teóricas redução biológica do nitrato com oxidação do sulfeto contemplando o crescimento celular foi realizado conforme descrito por Bruce E. Rittmann e Mccarty (2001), conforme segue:

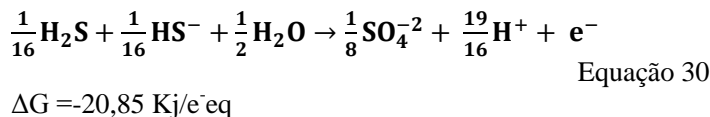
Re – Reação de energia a partir do nitrato e do sulfeto

A reação de energia (Re) (equação 31) pode ser obtida a partir das semi-reações de redução do nitrato (Ra) (equação 29) e oxidação do sulfeto (Rd) (equação 30):

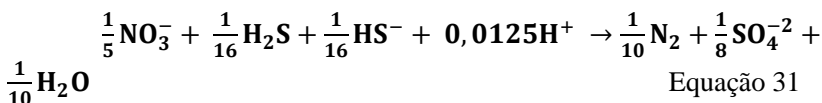
Ra – reação do acceptor de elétrons é



Rd – reação do doador de elétrons é

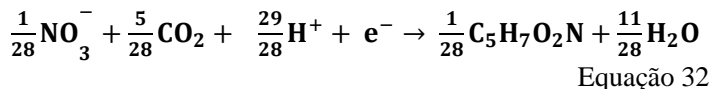


Reação de energia resultante (Re): Re=Ra- Rd

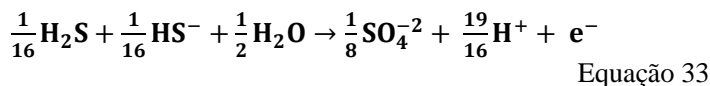


De modo análogo, a reação de crescimento celular (Rc) (equação 34) é obtida a partir das semi-reações da síntese de células (Rc) (equação 32) e do doador de elétrons (Rd) (equação 33):

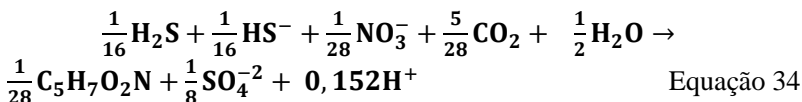
Rc – reação de síntese de células a partir do nitrato



Rd – reação do doador de elétrons é

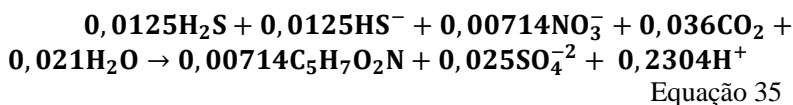


Reação de síntese resultante (Rs): Rs=Rc- Rd

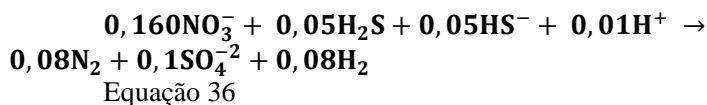


Considerando-se um coeficiente de partição de elétrons de $fe=0.2$ para o crescimento celular a partir da redução de nitrato com sulfeto como fonte de elétrons (RITTMANN e MCCARTY, 2001), pôde-se então determinar a equação global (R) (equação 37) para redução biológica do sulfeto conforme segue abaixo:

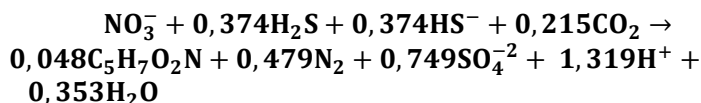
Rs x 0,2



Re x 0.8



R = Rs + Re



Com base nas estequiometrias teóricas de redução biológica do nitrato com oxidação do sulfeto (desnitrificação autotrófica) desenvolvidas observa-se que a relação entre o consumo do sulfeto e o consumo do nitrato foi de $0,42 \text{ mgS} - SH^- . \text{mg}^{-1} N - NO_3^-$. Na literatura Campos e Carvalho (2008) falam de uma relação entre o consumo do sulfeto e o consumo do nitrato de $0,47 \text{ mg S} - SH^- . \text{mg}^{-1} N - NO_3^-$.

3.3.2 Resultados do ensaio cinético verificação da atividade de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (E4).

Para avaliar a atividade de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS) no consórcio estudado, foi feito um ensaio em duas etapas; numa primeira etapa foi colocado só propionato

como substrato para garantir a produção de sulfeto; e numa segunda etapa, após o término do propionato foi adicionado nitrato (metodologia escrita no item 2.5).

Na Figura 18 estão apresentados os resultados obtidos no ensaio cinético de verificação da atividade de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto. O nitrato foi injetado após 70 horas de ensaio quando todo o propionato tinha sido consumido (primeiras 55 horas do ensaio). A concentração de acetato presente no sistema após do termino do propionato ficou estabilizada sem ser consumida.

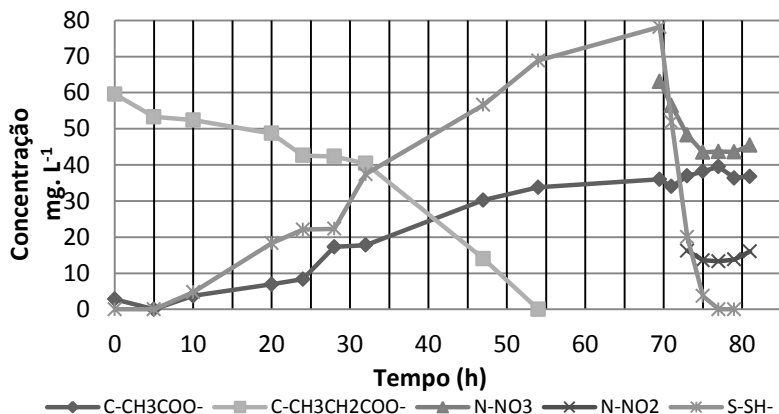


Figura 18: Resultado obtidos da cinética de presença de BRN-OS (E4).

Note-se que após da injeção do nitrato (70 horas) houve uma queda imediata na concentração de sulfeto até ser esgotado completamente. a relação entre o consumo de sulfeto e o consumo do nitrato foi de $0,34 H - HS^- . mg^{-1} N - NO_3^-$. O valor obtido na cinética é inferior ao proposto tanto na estequiometria desenvolvida como na literatura, porém, é inferior por que no ensaio a redução do nitrato foi incompleta chegando só até nitrito. Este fato confirma a presença ativa de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS) no consórcio.

CONCLUSÕES

- O consórcio estudado foi testado com acetato e propionato como doadores de elétron; concluiu-se que quando foi utilizado propionato, uma parte deste é oxidado incompletamente até acetato, fornecendo deste modo acetato a o sistema e favorecendo os metabolismos sulfato redutores que utilizam acetato como doador de elétrons. Desta forma, o uso do propionato mantém os dos metabolismos ativos é por isso é um melhor doador de elétrons para o consorcio estudado. Cabe ressaltar que o consumo de acetato pelas BRS só é evidenciado quando não tem mais propionato disponível.
- Os ensaios permitiram concluir que a produção de sulfeto é inibida pela presença de nitrato ou nitrito no sistema de forma independente da concentração de matéria orgânica; ou seja, havendo nitrato ou nitrito no meio a produção do sulfato ficará inibida, sendo restabelecida uma vez que estes compostos nitrogenados sejam consumidos e haja ainda matéria orgânica disponível para sustentar a atividade das bactérias redutoras de sulfato (BRS). Porém, para inibição do *souring* através do uso de nitrato em reservatórios deve ser levado em conta o tempo de retenção da água injetada na zona biótica, de modo que seja garantida uma relação C:N de 0,5 ou menor até o final desta zona.
- O consorcio microbiano estudado têm uma presença ativa de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS), mesmo assim, não foi comprovado que elas estejam atuando durante a inibição observada nos experimentos, porém, os resultados do ensaio cinético de verificação da atividade de bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (BRN-OS), demonstrou que o metabolismo de desnitrificação autotrófico têm uma melhor finidade pelo consumo de nitrato com relação

ao metabolismo de desnitrificação heterotrófico quando só se tem acetato como fonte de carbono.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar em bateladas alimentadas a concentração mínima de nitrato ou nitrito que inibe a produção de sulfeto no consórcio por tempos de ensaios de maior duração.
- Desenvolver cinéticas em coluna com meio de suporte em presença de petróleo para verificar se ainda em presença deste existe uma concentração mínima de nitrato ou nitrito que iniba a produção de sulfeto.

BIBLIOGRAFIA

ADKINS JP, TANNER RS, UDEGBUNAM EO, MCINERNEY MJ e KNAPP RM. Microbially Enhanced Oil-Recovery from Unconsolidated Limestone Cores. **Geomicrobiology Journal** **10**, 1992, p. 77-86.

ALVES DE SOUSA K. Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato. **Dissertação de doutorado**, Universidade federal de rio de janeiro. 2009.

APHA, AWWA e WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American public health association** **19**, washington, DC. 1995.

ARMSTRONG RT e WILDENSCHILD D. Investigating the mechanisms of microbial enhanced oil recovery **Journal of Petroleum Science and Engineering****94–95**, 2012, p.155–163.

BHUPATHIRAJU VK, MCINERNEY MJ e SUBLETTE KL. Microbial Control of Hydrogen-Sulfide Production. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society** **204**, 1992, p. 57-Fuel.

BODTKER G, THORSTENSON T, LILLEBO BLP, THORBJORNSEN BE, ULVOEN RH, SUNDE E e TORSVIK T. The effect of long-term nitrate treatment on SRB activity, corrosion rate and bacterial community composition in offshore water injection systems. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology** **35**, 2008, p.1625-1636.

BRUCE E. RITTMANN e MCCARTY PL. Environmental Biotechnology: Principles and Applications. **McGraw-Hill Book Co**, New York, 2001, p.126-206.

CAMPOS J e CARVALHO S. "Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds." **Bioresource Technology** **99(5)**, 2008, p.1293-1299.

CHANG Y, CHANG YT e CHEN HJ. A method for controlling hydrogen sulfide in water by adding solid phase oxygen. **Bioresource Technology** **98**, 2007, p. 478-483.

COLLERAN E, FINNEGAN S e LENS P. Anaerobic Treatment of Sulfate-Containing Waste Streams. Antonie Van Leeuwenhoek **International Journal of General and Molecular Microbiology** **67**, 1995, p.29-46.

DA SILVA ML, SOARES HM, FURIGO A, JR., SCHMIDELL W & CORSEUIL HX. Effects of nitrate injection on microbial enhanced oil recovery and oilfield reservoir souring. **Appl Biochem Biotechnol** **174**, 2014, p.1810-1821.

DALSGAARD T e BAK F. Nitrate Reduction in a Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfovibrio-Desulfuricans*, Isolated from Rice Paddy Soil - Sulfide Inhibition, Kinetics, and Regulation. **Applied and Environmental Microbiology** **60**, 1994, p.291-297.

DAVIDOVA I, HICKS MS, FEDORAK PM e SUFLITA JM. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** **27**, 2001, p.80-86.

DINNING AJ, OLIPHANT D, VIK EA e BRUÅS L. Initial Souring Monitoring and Souring-Mitigation Testing Using an Online Souring-Mitigation Cabinet (SMC) Prior to Live Produced Water Reinjection (PWRI) and Nitrate-Based Souring-Mitigation Treatment on Norske Shell's Draugen Platform. **Society of Petroleum Engineers**. The Woodlands, Texas, 2005. SPE International Symposium on Oilfield Chemistry,

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

DONALDSON EC, CHILINGAR GV e YEN TF. Microbial enhanced oil recovery. **Elsevier science publishers**, Amsterdam, New York, 1989.

DUNSMORE B e EVANS P. Produced water re-injection and its impact on reservoir souring. **Produced Water Club/Nel Meeting**. 2005.

DUNSMORE B, YOULDON J, THRASHER DR e VANCE I. Effects of nitrate treatment on a mixed species, oil field microbial biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** **33**, 2006, p. 454-462.

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

FAUQUE GD e BARTON LL. Hemoproteins in Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. **Advances in Microbial Physiology****60**, 2012, p. 1-90.

GENTIL V. Corroção, **Livros Tecnicos e Cientificos** **4**, Rio de Janeiro, 2003.

GREENE EA, HUBERT C, NEMATI M, JENNEMAN GE e VOORDOUW G. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. **Environmental Microbiology** **5**, 2003, p. 607-617.

GRIGORYAN AA, CORNISH SL, BUZIAK B, LIN S, CAVALLARO A, ARENSDORF JJ e VOORDOUW G. Competitive oxidation of volatile fatty acids by sulfate- and nitrate-reducing bacteria from an oil field in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology** **74**, 2008, p. 4324-4335.

HITZMAN D.O e DENNIS DM. Sulfide removal and prevention in gas wells. **Spe Reservoir Evaluation & Engineering****1**, 1998, p.367-371.

HITZMAN D.O e SPERL GT. A new microbial technology for enhanced oil recovery and sulfide prevention and reduction. **Symposium on improved oil recovery**.1994, p. 171-179.

HUBERT C, NEMATI M, JENNEMAN G e VOORDOUW G. Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. **Biotechnology Progress** **19**, 2003, p. 338-345.

HUBERT C e VOORDOUW G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Appl Environ Microbiol** **73**, 2007, p.2644-2652.

KASTER KM, GRIGORIYAN A, JENNEMAN G e VOORDOUW G. 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****75**, 2007, p.195-203.

KNIGHT A. Enhanced oil recovery : methods, economic benefits and impacts on the environment. **Nova Science Publishers inc**,New York, 2014.

KREKELER D e CYPIONKA H. The Preferred Electron-Acceptor of *Desulfovibrio-Desulfuricans* Csn. *Fems Microbiology Ecology* **17**, 1995, p. 271-277.

KUANG F, WANG J, YAN L e ZHANG D. Effects of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of carbon steel. **Electrochimica Acta****52**, 2007, p.6084-6088.

LABAS MD, MARTIN CA e CASSANO AE. Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium. **Chemical Engineering Journal** **114**, 2005, p. 87-97.

LARSEN J, SANDERS PF e TALBOT RE. Experience with the use of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) for the control of downhole hydrogen sulfide, **NACE International corrosion conference, corrosion**, Orlando, FL, 2000, p. 26-31.

LENS PNL e KUENEN JG. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. **Water Science and Technology** **44**, 57-66.

MADIGAN MT, MARTINHO JM e PARKER J. Brock biology of microorganisms. **Prentice-Hall International**, London. 2004, p. 986.

MANSFELD F. The interaction of bacteria and metal surfaces, **Elsevier: Electrochimica Acta** **52**, 2007, p. 7670 -7680.

MATEJU V, CIZINSKA S, KREJCI J e JANOCH T. Biological Water Denitrification - a Review. **Enzyme and Microbial Technology****14**, 1992, p.170-183.

MCCAULEY CA, O'SULLIVAN AD, MILKE MW, WEBER PA e TRUMM DA. Sulfate and metal removal in bioreactors treating acid mine drainage dominated with iron and aluminum. **Water Research** **43**, 2009, p. 961-970.

MCINERNEY MJ, WOFFORD NQ e SUBLETTE KL. Microbial control of hydrogen sulfide production in a porous medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology** **57-8**, 1996, p. 933-944.

MOHAN SV, RAO NC, PRASAD KK e SARMA PN. 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****40**, 2005, p.2849-2857.

MUYZER G e STAMS AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology****6**, 2008, p.441-454.

NEMATI M, JENNEMAN GE e VOORDOUW G. Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. **Biotechnology and Bioengineering** **74**, 2001, p. 424-434.

POSTGATE JR. The sulphate-reducing bacteria. **Syndics of the cambridge university**, 1984, p. 641-705.

REMPEL CL, EVITTS RW e NEMATI M. Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. **Microbiol Biotechnol** **33**, 2006, p.878-886.

SCHWEITZER P (2010) Fundamentals of Corrosion: Mechanisms, Causes, and Preventative Methods, **CRC Press**, 2010, p. 5-30.

SIMON R. Enhanced Oil-Recovery - Definitions, Fundamentals, Applications, and Research Frontiers. **Physics and Chemistry of the Earth 13-4**,1981, p. 447-460.

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

TEIXEIRA J, SCHMIDELL W e ZDRADEK CP. Metodologia para determinação de sólidos suspensos totais (SST), para sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, utilizando microondas. **Congresso Brasileiro de Química**, Rio janeiro, 2008.

THAUER RK, JUNGERMANN K e DECKER K. Energy-Conservation in Chemotropic Anaerobic Bacteria. **Bacteriological Reviews**41, 1977, p. 100-180.

THOMAS JE. Fundamentos da engenharia do petróleo. **Interciência**, Rio de Janeiro, 2004, p.271.

TONY Y. RIZK, JAMES F.D. STOTT, ROBERT D. EDEN, ROY A. DAVIS, JOHN E. MCELHINEY, CLARA DI IORIO e JO. The Effect of Desulphated Seawater Injection on Microbiological Hydrogen Sulphide Generation and Implication for Corrosion Control. **NACE Conference Papers**,Houston, TX, 1998, p. 298.

TUCKER J e HITZMAN D (1994) Detailed Microbial Surveys Help Improve Reservoir Characterization. **Oil & Gas Journal 92**, p.65.

VIEIRA. D.S. Avaliação da biodegradação anaeróbia no tratamento de água de produção. **Escola de Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

VOORDOU WG e JACK T. (Proposal for NSERC industrial research chair in petroleum microbiology. development of a competency cluster within ISEEE at the University of Calgary), **Industrial Research Chair**, Calgary Canada, 2005.

WIDDEL HU. Correlations between Atomic Oxygen Airglow and Radiowave Absorption in Winter. **Journal of Atmospheric and Terrestrial Physics** **42**, 1980, p.331-337.

WILKES H, BOREHAM C, HARMS G, ZENGLER K e RABUS R. Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. **Organic Geochemistry** **31**, 2000, p. 101-115.

ZARASVAND KA e RAI VR. Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation** **87**, 2014, p.66-74.

ANEXOS

ANEXO 1

1.1 Água do mar sintética utilizada nos experimentos

1.1.1 Enriquecimento da microbiota

Para a definição da água do mar utilizada nos ensaios, utilizou-se de informações cedidas pela Petrobras com relação a composição iônica da água do mar de Marlim, que constam na Tabela 1. A partir destes dados, bem como de dados da literatura (NEMATATI *et al.*, 2001; MYHR *et al.*, 2002; KASTER *et al.*, 2007), foi possível propor um meio de cultura específico, chamado água do mar sintética, que encontra-se apresentado na Tabela 2, que será utilizado como base tanto para o enriquecimento como para os ensaios de cinética. Ao meio de cultura será adicionado ainda uma solução de elementos traços, apresentada na Tabela 3, uma solução de ácido acético com 1.000 mg/L do mesmo, e 1% (p/p) de petróleo bruto.

O objetivo do uso de água do mar sintética é o de se obter a menor variabilidade possível nos resultados, visto que estaremos tentando mimetizar ao máximo as condições naturais.

Tabela 1. Composição iônica da água do mar (fornecida pela Petrobras).

Íon	Quantidade (g/L)
Na	11,500
K	0,458
Ca	0,433
Mg	1,170
Fe	0,005
Sr	0,001
Cl	20,300
SO ₄	2,990
HCO ₃	0,144
Br	0,051
Iodo	0,010
Boro	0,017
Oxygen	Não fornecido (estimado em 8 mg/L)
PO ₄	Não fornecido (estimado em 0,062 mg/L)

Íon	Quantidade (g/L)
P	Não fornecido

Tabela 2. Composição da água do mar sintética desenvolvida nos nossos laboratório para atender a composição iônica da água mar (da Tabela 1)

Componente	Quantidade (g/L)
KH_2PO_4	0,088
Na_2SO_4	4,408
NaCl	24,861
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9,786
KCl	0,820
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,588
NaHCO_3	0,198
KBr	0,076
KI	0,013
BO	0,042
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,030
Acetato de Na	1,389
NaNO_3	0,607
Solução de elementos-traço (Tabela 3)	1 ml

Tabela 3. Solução de elementos-traço (MYHR *et al.*, 2002):

Componente	mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5
H_3BO_3	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70
MoO_3	10
Água destilada	1 L

ANEXO 2

Resultados das cinéticas apresentadas

2.1 Dados obtidos na cinética de doador de elétron

Tabela 4: Ensaio com acetato como doador de elétron

Tempo do ensaio	Consumo acetato mg.L⁻¹	Produção Sulfeto mg.L⁻¹
0	142,203	61,57526
1,5	139,8001	44,80369
3,5	153,3041	75,16936
4,5	134,0182	67,67004
5,5	23,54352	80,05613
7,5	98,11974	103,7063
9,5	128,5313	103,5358
11,5	137,5704	114,6312
13,5	137,7162	104,082
15,5	133,2397	110,6279
17,5	131,006	113,5792
19,5	126,8073	107,1545

Tabela 5: Ensaio com propionato como doador de elétron.

Tempo do ensaio (h)	Consumo Acetato mg.L⁻¹	Produção Propionato mg.L⁻¹	Produção Sulfeto mg.L⁻¹
0	22,9314	73,51766	61,52441
1,5	21,86032	75,85227	41,6953
3,5	29,81292	76,18122	84,63215
4,5	25,14872	70,50585	86,15692
5,5	24,76256	70,11347	83,57371
7,5	26,3793	69,85793	103,6687
9,5	40,68998	71,79507	120,0952
11,5	32,69234	56,99129	132,1938
13,5	30,65884	63,9071	135,7059

Tempo do ensaio (h)	Consumo Acetato mg.L⁻¹	Produção Propionato mg.L⁻¹	Produção Sulfeto mg.L⁻¹
15,5	38,54994	50,84745	149,9897
17,5	31,42842	59,87958	166,1835
19,5	34,61788	57,71031	145,9122

Tabela 6: Ensaio com acetato + propionato como doador de elétron.

Tempo do ensaio (h)	Consumo Acetato mg.L⁻¹	Produção propionato mg.L⁻¹	Produção sulfeto mg.L⁻¹
0	137,9428	63,73127	73,20955
1,5	136,2757	62,02093	79,13089
3,5	143,0201	60,04913	88,501
4,5	95,77554	61,61457	66,52709
5,5	88,10852	62,16656	80,17166
7,5	125,9789	59,35934	109,3327
9,5	140,0981	53,48426	106,1909
11,5	135,1221	61,41067	91,1251
13,5	142,0987	54,05173	143,6197
15,5	135,2601	55,96307	146,3587
17,5	142,2482	51,43289	147,4884
19,5	143,2272	48,02426	166,6675

2.2 Dados obtido na cinética de relação entre o carbono e o nitrogênio, relação c:n mudando concentrações de nitrogênio

Tabela 7: Relação C:N = 4.3

T (h)	C-Ac	C-Prop	N-NO3	N-NO2	S-SH
0	0	34,12	12,75	0	0
4	0	41,19	14,05	0	0
5	3,12	37,47	11,92	0	0
6	3,16	36,83	11,29	0	0
7	3,16	36,71	9,58	0	0

T (h)	C-Ac	C-Prop	N-NO3	N-NO2	S-SH
9	3,16	36,56	8,08	0	0
11	5,92	32,37	0	0	0
13	3,58	30,95	0	0	0
15	4,08	28,00	0	0	0
22	5,18	29,18	0	4,11	7,66
24	7,23	32,34	0	4,97	11,18
30	6,42	22,99	0	8,34	24,86
34	6,93	22,69	0	9,05	27,72
47	13,99	7,48	0	37,52	134,54

Tabela 8: Relação C:N = 1.1

T (h)	C-Ac	C-Prop	N-NO3	N-NO2	S-SH
0	0	35,37	33,04	0	0
5	2,91	35,69	33,79	0	0
11	7,27	29,34	24,98	8,86	0
15	6,68	19,75	9,78	24,58	0
22	8,12	15,20	0	20,90	0
30	4,75	9,86	0	0	0
34	6,19	10,41	0	0	0
36	10,16	7,53	0	0	0
38	10,76	6,08	0	0	0
41	11,20	5,59	0	0	0
47	11,41	0	0	0	5,98

Tabela 9: Relação C:N =0.5

T (h)	C-Ac	C-Prop	N-NO3	N-NO2	S-SH
0	6,36	47,85	59,91	0	0
5	2,26	32,34	52,44	0	0
11	2,38	32,84	53,13	9,80	0
15	2,38	15,66	25,39	21,45	0
22	2,54	0	0	54,28	0
27	3,31	0	0	47,92	0
34	3,43	0	0	35,77	0
38	3,65	0	0	29,44	0

T (h)	C-Ac	C-Prop	N-NO3	N-NO2	S-SH
47	4,23	0	0	28,78	0
53	2,40	0	0	30,05	0

2.3 Dados obtidos na cinética de presença da atividade das BRN-OS.

Tabela 10: resultados obtidos no ensaio (E4)

T (h)	C-Ac	C-Prop	N-NO3	N-NO2	S-SH
0	2,83	59,59			0
5	0,00	53,29			0
10	3,75	52,42			4,74
20	6,91	48,70			18,31
24	8,34	42,61			22,08
28	17,28	42,36			22,30
32	17,77	40,38			37,43
47	30,26	14,04			56,61
54	33,80	0			68,90
70	42,59	0	63,07		78,20
71	34,01	0	56,45		51,82
73	36,92	0	48,30	16,24	20,00
75	38,20	0	43,50	13,58	3,70
77	39,49	0	43,70	13,30	0
79	36,36	0	43,59	13,81	0
81	38,76	0	45,50	16,07	0