



# UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

JOALENE DE AZEVEDO SANTOS FERREIRA

CONTROLE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE  
SULFATO E SUA ATIVIDADE SULFETOGENICA  
EM BIORREATOR ANAERÓBICO DE  
LEITO FIXO E FLUXO ASCENDENTE



**SALVADOR**  
**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA POLITÉCNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA**  
**INDUSTRIAL – PEI**

**DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL**

**JOALENE DE AZEVEDO SANTOS FERREIRA**

**CONTROLE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E SUA**  
**ATIVIDADE SULFETOGENICA EM BIORREATOR**  
**ANAERÓBICO DE LEITO FIXO E FLUXO ASCENDENTE**

Salvador

2018

**JOALENE DE AZEVEDO SANTOS FERREIRA**

**CONTROLE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E SUA  
ATIVIDADE SULFETOGENICA EM BIORREATOR  
ANAERÓBICO DE LEITO FIXO E FLUXO ASCENDENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial - PEI, Faculdade Politécnica, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Industrial.

Orientadores: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Salvador

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ferreira, Joalene de Azevedo Santos

Controle de bactérias redutoras de sulfato e sua  
atividade sulfetogênica em biorreator anaeróbico de  
leito fixo e fluxo ascendente / Joalene de Azevedo  
Santos Ferreira. -- Salvador, 2018.

132 f. : il

Orientador: Paulo Fernando de Almeida e Fábio  
Chinalia .

Tese (Doutorado - Engenharia Industrial (PEI)) --  
Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2018.

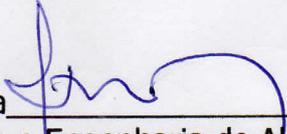
1. Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS). 2.  
Produção de Sulfeto. 3. Biocida. 4. Biorreator. 5. Óleo  
Essencial. I. , Paulo Fernando de Almeida e Fábio  
Chinalia. II. Título.

**CONTROLE DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO E SUA ATIVIDADE SULFETOGENICA EM BIORREATOR ANAERÓBICO DE LEITO FIXO E FLUXO ASCENDENTE.**

**JOALENE DE AZEVEDO SANTOS FERREIRA**

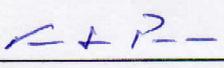
Tese submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutora em Engenharia Industrial.

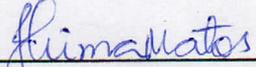
Examinada por:

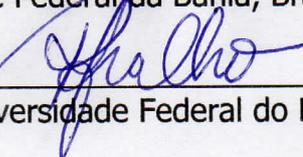
Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida   
Doutor em Microbiologia, Tecnologia e Engenharia de Alimentos, pela Universidade FEA/UNICAMP, Brasil, 1992.

Prof. Dr. Fabio Alexandre Chinalia   
Doutor em Environmental Microbiology. Pela University of Aberdeen, ABDN, Escócia, 2002

Prof. Dr. Elias Silva dos Santos   
Doutor em Biotecnologia Industrial, pela Universidade Estadual do Ceara, Brasil, 2011

Prof. Dr. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa   
Doutor em Engenharia Química, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1992

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Josilene Borges Torres Lima Matos   
Doutora em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2007

Prof. Dr<sup>a</sup> Rosana Lopes Lima Fialho   
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1998

Salvador, BA - BRASIL  
Outubro/2018

Dedico esta tese a minha filha Daniela e meu marido Everton, pela paciência, amor e apoio constante.

## **AGRADECIMENTOS**

Obrigado MESTRE JESUS pela realização de mais um sonho, por estar sempre comigo em todos os momentos, e por colocar pessoas no meu caminho que contribuíram para essa maravilhosa conquista.

Agradeço a minha filha Daniela, pelo carinho, compreensão, incentivo e excelente exemplo de dedicação aos estudos. Meu esposo, Everton Ferreira, pelo incentivo, carinho e muita paciência. Minha mãe, Marlene Azevedo, pelas palavras de conforto e bênçãos. Meu irmão, Vanilson Azevedo, pelo exemplo de determinação e fé. A minha querida avó, Roberta Azevedo (In memoriam) por todas as coisas boas que sempre fez por mim.

Gostaria de agradecer imensamente aos orientadores e professores, Paulo Almeida e Fábio Chinalia, pela excelente orientação, ajuda e ensinamentos. Muito obrigado pela oportunidade de transformar em realidade um sonho. Sou eternamente grata por tudo.

Ao meu amigo, Silvio Fernandes, por ter me apresentado ao professor Paulo Almeida, que em conjunto com o professor Fábio Chinalia, conduziram-me ao encantado mundo da Ciência. Neste mundo, foi possível juntar a minha experiência da indústria com projetos, máquinas, processos, produtos... etc, aos experimentos em bateladas de laboratório, biorreator, produção de artigos, patentes e etc. Ver microrganismos tão pequenos produzir diversos bioprodutos que podem ser utilizados em diversas áreas da indústria, enfim, aprendi muito nesse fantástico mundo de descobertas científicas.

Aos estudantes de iniciação científica, Leonardo Mattos, Laís França, Igor Nascimento, Ygor Sousa, Daniel Tereska, Gustavo Coqueiro e Jéssica Gaspar.

Ao Programa de Engenharia Industrial (PEI).

A Petrobras por ter cedido água produzida para o desenvolvimento do meu trabalho, e a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos amigos, Jacson Nunes, Elias Santos, Igor Sampaio e Edmundo, por toda ajuda e atenção. Aos colegas e companheiros do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismo (LABEM), muito obrigado.

## RESUMO

Injeções de biocidas são frequentemente usadas em campos de petróleo maduros como uma tentativa de controlar bactérias redutoras de sulfato (BRS) e a produção de sulfeto (acidificação). Falha ou resultados imprevisíveis de tais práticas têm sido associados com o aumento da resistência metabólica das BRS *in situ*. No entanto, como as concentrações de biocidas e as estratégias de monitoramento são tipicamente baseadas em testes estáticos, a relação dinâmica entre a diluição e a recuperação metabólica não é testada para tais experiências. As BRS são as responsáveis pela produção biológica de sulfeto, porém, poucos testes de inibição são realizados com culturas mistas crescidas em biofilme de reator com meio poroso em condições que mimetizam o equilíbrio dinâmico de um reservatório de petróleo. Esse tipo de teste apresenta vantagens sobre experimentos realizados em bateladas de tubos de ensaios em laboratórios, pois, oferecem a oportunidade de medir a resposta do biofilme *in situ* e em tempo real. Para resolver este problema, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver um sistema biológico anaeróbio em equilíbrio dinâmico, em relação ao consumo de substratos orgânicos, para testar e quantificar o efeito de quatro novas substâncias inibidoras ao processo sulfetogênico (*souring*) e um conhecido biocida, dentro de um sistema dinâmico (biorreator de leito fixo). O biorreator foi operado por 591 dias em bateladas de 72 horas. Os resultados mostraram que as (BRS) tem a capacidade de se recuperar e voltar a produzir sulfeto em um período que pode variar de 15 a 60 dias após a injeção do biocida testado. O óleo de neem (NO) (1,5% v/v) e o biocida Dazomet, (DZ) (0,5% v/v) foram os mais eficientes no controle da atividade das BRS. O óleo (NO) foi 1,2 vezes mais eficiente no controle da atividade de BRS do que o Dazomet, que é um biocida comumente usado na indústria do petróleo. Os resultados sugerem que os biocidas NO e DZ devem ser reaplicados no sistema no período antes de 60 e 48 dias, respectivamente. Os biocidas imiscíveis parecem ter um efeito mais prolongado. Portanto, os dados indicam que o controle do consórcio de BRS em sistemas de biofilme em equilíbrio dinâmico não depende apenas da concentração das substâncias aplicadas, e nem está associado apenas à toxicidade dos compostos. Depende também das características químicas das mesmas e da frequência de aplicação. Os biocidas imiscíveis mataram as células, e controlaram as taxas de recuperação das BRS.

**Palavras-chave:** Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), Produção de Sulfeto, Biocida, Biorreator, Óleo Essencial

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dados de produção de óleo e gás natural do Campo Dom João (1999 a 2015).	24
Figura 2	Desenho representativo da Estação Dom João: a) Reservatórios no mar, b) estação Marapé, c) mapa mostrando a localização dos reservatórios nos campos Dom João Terra e Mar, d) Esquema ilustrativo da estação de recebimento de óleo da produção dos Campos Dom João Mar e Terra (▲) reservatórios de produção de óleo.	25
Figura 3	Diagrama mostrando as fases dos experimentos no biorreator: (Fase 1) Modelagem molecular e Determinação da (MIC) dos compostos químicos; (Fase 2) Montagem e manutenção do biorreator; (Fase 3) Operação do biorreator e Hidrodinâmica	45
Figura 4	Biorreator de leito fixo em fases de manutenção, melhorias e montagem: a) desenho esquemático de uma célula do biorreator descrevendo as dimensões do sistema e pontos de amostragens; b) biorreator desmontado do suporte de fixação para melhorias e manutenção; c) célula do biorreator em manutenção; d) tampa frontal do biorreator e acessórios (manômetro e válvulas ) em manutenção; e) biorreator liberado para operação; f) comissionamento do biorreator (primeiros testes)	47
Figura 5	Diagrama com as etapas operacionais do biorreator	48
Figura 6	Estrutura tridimensional da enzima Sulfito Redutase (SIR) em complexo com o íon sulfito. A estrutura da enzima é composta por seis cadeia, no entanto foram simuladas as cadeias A, B e C, devido a simetria da estrutura.	54
Figura 7	Estruturas Tridimensionais: A) 1,8 cineol, B) $\alpha$ -Terpineno, C) $\gamma$ -Terpineno, D) Terpinen-4-ol, E) $\alpha$ -pineno, F) Camphor, G) Ácido linoleico, H) Ácido Oleico, I) Ácido esteárico, J) Ácido palmítico, K) lauril glicosídeo, and L) dazomet. Todas as substâncias estão representadas em formato de haste.	54
Figura 8	Resíduos que compõem o sitio ativo da SIR. O $\text{SO}_3$ introduzido no sitio ativo é mostrado em vermelho, enquanto a estrutura que representa sua posição cristalográfica é representada em branco, amarelo e laranja.	55

Figura 9	Experimento em triplicata para identificar a concentração mínima inibitória (MIC) cor negra indica crescimento e cor clara não crescimento: a) LG – Lauril-glicosídeo, b) RO – <i>Rosmarinus officinallis</i> , c) TO – Tea-tree, d) MIX LG e RO; NO – Neem e f) DZ – Dazomet.	57
Figura 10	Instantâneo mostrando os inibidores no local de ligação, sendo: A) representação dos inibidores ácido esteárico e ácido palmítico, respectivamente, na ausência do substrato e B) mostra os mesmos inibidores na presença do substrato. 1) refere-se ao ácido esteárico enquanto 2) o ácido palmítico. Os centros de ferro-enxofre são mostrados na representação de esferas de van der Waals, enquanto o centro catalítico (sirohemo), inibidores e sulfetos são representados em licorices.	60
Figura 11	Desenho esquemático mostrando as etapas de montagem e testes no biorreator. (a) retirada do biorreator do suporte de fixação para manutenção; (b) conjunto difusor e tela de proteção; (c) calibração dos instrumentos indicadores de pressão (manômetros); (d) célula do biorreator com meio poroso preenchido por pérolas de vidros de diâmetro irregular que servem de suporte físico para a formação de biofilme de BRS; (e) teste de estanqueidade no reator através da injeção de ar comprimido produzido por um compressor de ar de pequeno porte; (f) biorreator instalado e liberado par uso.	69
Figura 12	Desenho esquemático do sistema que apresenta a inserção da segunda tela no difusor para evitar a obstrução dos canais de deslocamento do fluido no biorreator. A primeira tela instalada no difusor é formada por uma placa de aço inoxidável com perfurações de diâmetro similares ao meio poroso, facilitando o encaixe destes na placa e a obstrução da injeção do fluido. A segunda tela tem diâmetro de 1 mm, é menor que o meio poroso e evita a obstrução para injeção do fluido.	70
Figura 13	Teste com injeção de ar comprimido em todas as conexões e pontos de acesso ao biorreator, e uso de espumas de sabão para identificar possíveis vazamentos.	72
Figura 14	Avaliação da perda de carga no biorreator	73
Figura 15	Uso de equipamentos de segurança - EPI's	74
Figura 16	Desenho esquemático da esterilização do biorreator com vapor. Utilizado uma unidade de autoclave com potência elétrica de 3 kW para gerar vapor, e abastecer o biorreator através da conexão com uma mangueira de alta resistência capaz de suportar até 5 kgf/cm <sup>2</sup> de pressão e temperatura de até 300 °C.	76
Figura 17	Indicador biológico para avaliar a efetividade da esterilização do reator.	77
Figura 18	Dispositivo tipo shot para abrigar o indicador biológico	78

Figura 19	Suporte tipo capsula para abrigar o indicador biológico. O suporte foi instalado no ponto de amostragem com maior resistência ao deslocamento de fluido (P1).	79
Figura 20	Diagrama metodológico para os testes hidrodinâmicos no biorreator. Fase experimental: Injeção no biorreator da solução traço tipo pulso num curto intervalo de tempo (10 s); utilizou-se três condições diferentes de vazão (3, 9 e 15 ml/min); coleta nos pontos de amostragem num intervalo de 15 minutos; determinação das curvas de pH versus tempo e utilização da curva de calibração adaptada (Borin, 2008) para gerar as curvas de pH versus concentração. Modelagem matemática: Testes com os modelos de dispersão e CSTR. Método numérico: Simpson 3/8 nas integrações numéricas e comparação com as curvas dos modelos.	84
Figura 21	Curva de calibração pH em função da concentração (g/L)	86
Figura 22	Curvas de variação do pH de hipoclorito para vazão 3 mL. (P4, P3, P2 e P1) pontos de coletas do afluente do biorreator.	89
Figura 23	Curvas de variação do pH de hipoclorito para vazão 9 mL. (P4, P3, P2 e P1) pontos de coletas do afluente do biorreator.	90
Figura 24	Curvas de variação do pH de hipoclorito para vazão 15 mL. (P4, P3, P2 e P1) pontos de coletas do afluente do biorreator	90
Figura 25	Detalhes dos pontos de amostras do biorreator com possíveis ocorrências (P1, P2, P3 e P4)	91
Figura 26	Curvas de DTR para as vazões de 3 e 9 (sem ajuste) mL/min, utilizando os modelos matemáticos de dispersão axial (PD e GD), e N-tanques em série (CSTR): dado espúrio (valor discrepante fora da curva).	96
Figura 27	Curvas de DTR para as vazões de 9 (com ajuste) e 15 mL/min, utilizando os modelos matemáticos de dispersão axial (PD e GD), e N-tanques em série (CSTR): dado espúrio (valor discrepante fora da curva).	97
Figura 28	Esquema para alimentação do biorreator. O meio de cultura é injetado através de uma bomba peristáltica a vazão constante, e o efluente é coletado no mesmo instante que ocorre a injeção do meio no afluente. O volume de trabalho do biorreator é 1400 mL, sendo que a cada batelada de 72 h somente 700 mL é retirado do efluente. Nitrogênio é injetado no meio de cultura durante a injeção para manter a anaerobiose do sistema.	106

- Figura 29 Taxa de remoção de DQO (a) e sulfato ■ ou sulfeto □ consumo e produção, respectivamente (b). O biorreator foi operado por um período de 591 dias com um tempo de retenção hidráulica de 72 horas e uma carga orgânica de DQO de  $2,4 \text{ g/L}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ . Os dados mostram um período de aproximadamente 45 ciclos de *start-up*, 34 ciclos em estado estacionário e 118 ciclos de testes com substâncias inibitórias. A sequência dos testes inibitórios foi a seguinte: (1) LG a 1%; (2) LG a 1,5%; (3) RO a 1%; (4) TO 1,5%; (5) MIX-GR 1,5%; (6) NO a 1,5%; e (C) DZ a 0,5%. A figura indica que o procedimento de injeção foi realizado nos Ciclos 78, 87, 99, 117, 138, 154 e 177. O último composto, comumente utilizado pela indústria do petróleo, foi considerado o controle experimental. 111
- Figura 30 Perfil químico caracterizando um ciclo completo de 72 h obtido no período de estabilidade dinâmica do biorreator antes e após os testes de biocidas. O gráfico (a) mostra as variáveis químicas antes e depois dos testes de biocida como taxas de remoção de DQO (■ e □) e potenciais redox (▲ e Δ), respectivamente. O gráfico B mostra antes e depois das taxas de remoção de sulfato (■ e □) e taxas de produção de sulfeto (▲ e Δ), respectivamente. O gráfico C mostra variações de densidade das BRS nas amostras do biorreator (■ e □). 119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais Substâncias e Concentrações contidas nos Óleos Essenciais.	53
Tabela 2	Distância relativa de sulfeto para Fe de siroheme (SRM) e distância de Fe do cluster 1 para Fe de siroheme (SRM).	59
Tabela 3	Perfil de energia livre vinculado a enzima-ligante, enzima-substrato-complexo inibidor e enzima-inibidor-substrato.	60
Tabela 4	Componentes da energia livre de ligação de cada complexo proteína-ligante na presença e ausência de substrato.	62
Tabela 5	Concentração inibitória mínima (MIC) valores obtidos por seis testes com biocidas e mistura. Os testes foram conduzidos em culturas anaeróbicas em bateladas <i>in vitro</i> incubadas por 28 dias.	64
Tabela 6	Métodos de Esterilização.	75
Tabela 7	Modelos matemático utilizados na hidrodinâmica do biorreator	87
Tabela 8	Equações para determinação da presença de zonas mortas, curto-circuito e eficiência hidráulica.	88
Tabela 9	Resultados dos parâmetros obtidos com os ajustes dos dados experimentais sob diferentes condições de vazão: 3, 9 e 15 mL/min.	92
Tabela 10	Parâmetros para análise de desvio no biorreator.	99
Tabela 11	Caracterização cinética de DQO ou taxas de remoção de sulfato e produção de sulfeto durante o período de recuperação do estado estacionário do biorreator (definido acima de 85% a taxa de remoção de DQO), após o impacto provocado por injeções de biocidas distintas. Além disso, a tabela também mostra a cinética de remoção de DQO, taxas da remoção de sulfato e produção de sulfeto, caracterizando o ciclo de 72 h observado antes e após os testes com biocidas.	113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
API	<i>American Petroleum Institute</i>
BRS	Bactéria Redutora de Sulfato
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSTR	<i>Continous stirred tank reactor</i>
DTR	Distribuição do tempo de residência
DQO	Demanda química de oxigênio
DZ	Biocida Dazomet
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EPI	Equipamento para proteção individual
LABEM	Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos
LG	Surfactante lauril glicosídeo
MIX-GR	Mistura do surfactante com óleo <i>Rosmarinus officinalis</i>
NO	Óleo essencial de Neem
NR-15	Norma Regulamentadora (Atividades e operações insalubres)
RO	Óleo essencial <i>Rosmarinus officinalis</i>
SIR	Enzima Sulfito-Redutase
TO	Óleo essencial Tea-tree

## NOMENCLATURAS PARA OS MODELOS

$v$  Vazão

$t$  Tempo

$\tau$  Tempo espacial

$t_m$  Tempo médio de residência

$\theta$  Tempo adimensional

$\Delta t$  Intervalo de tempo

$x$  Posição axial de um ponto de referência em relação à entrada do reator

$L$  Altura total do reator

$z$  Posição axial adimensional de um ponto de referência em relação à entrada do reator

$u$  Velocidade axial média do fluido dentro do reator

$N_0$  Quantidade total de matéria injetada no reator

$C(t)$  Concentração do traçador no tempo  $t$

$C(\theta)$  Concentração do traçador no tempo adimensional  $\theta$

$E(t)$  Função de distribuição de tempo de residência

$E(\theta)$  Função de distribuição de tempo de residência normalizada

$\sigma^2$  Variância

$D$  Coeficiente de difusão molecular

$\frac{D}{u.L}$  Número de dispersão do reator

$R^2$  Coeficiente de determinação

$\Delta N$  Quantidade de matéria saindo do reator que permaneceu uma quantidade de tempo entre  $t$  e  $t+\Delta t$

## **PARÂMETROS DAS ANOMALIAS USANDO O MODELO CSTR**

$ds$  Espaço morto

$Vd$  Volume morto

$Vt$  Volume total

$\theta_m$  Tempo adimensional

$tm$  Tempo médio teórico (minutos)

$tn$  Tempo médio de observação ( $V/v$ )

$\Psi$  Curto circuito

$\lambda$  Eficiência hidráulica

$e$  Volume efetivo (%)

$N$  Número de tanques teóricos

## SUMÁRIO

Capítulo 1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
1.1	OBJETIVOS	19
1.2	ORGANIZAÇÃO DA TESE	19
1.3	HIPÓTESES DA TESE	21
Capítulo 2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	INTRODUÇÃO	23
<b>2.1.1</b>	<b>Apresentação do Campo Dom João (local de coleta da água produzida)</b>	24
2.2	RECUPERAÇÃO SECUNDÁRIA DE PETRÓLEO E ACIDIFICAÇÃO BIOGÊNICA ( <i>SOURING</i> )	26
<b>2.2.1</b>	<b>Metabolismo e Classificação das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)</b>	26
<b>2.2.2</b>	<b>Controle e Prevenção do <i>Souring</i></b>	28
<b>2.2.3</b>	<b>Uso de Biocidas em Sistemas Estáticos</b>	28
2.2.3.1	Estudo de caso utilizando biocidas em sistema estático	29
<b>2.2.4</b>	<b>Uso de Óleos Essenciais como Alternativa para Controle de <i>Souring</i></b>	31
2.3	BIORREATORES	32
<b>2.3.1</b>	<b>Generalidades</b>	32
<b>2.3.2</b>	<b>Operação de Reatores</b>	33
2.3.2.1	Processo descontínuo ou batelada	34
<b>2.3.3</b>	<b>Reatores de Leito Fixo e Fluxo Ascendente</b>	34
2.3.3.1	Estudo de caso em reatores de leito fixo e fluxo ascendente	35
2.4	HIDRODINÂMICA DE REATORES	36
2.5	CONCLUSÃO	37
2.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
Capítulo 3	MATERIAIS E METODOS	45
3.1	Etapa 1 – Modelagem Molecular dos Compostos Químicos	46
3.2	Etapa II - Montagem do Biorreator	46
3.3	Etapa III - Operação do Biorreator	47
Capítulo 4	TESTES DE ACOPLAMENTO MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA MIC	49
4.1	INTRODUÇÃO	50
4.2	MATERIAIS E METODOS	51

<b>4.2.1</b>	<b>Preparação do Receptor e Ligantes</b>	51
<b>4.2.2</b>	<b>Docagem de Proteína-Ligante</b>	56
4.3	TESTES PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)	56
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
<b>4.4.1</b>	<b>Testes de Acoplamento Molecular</b>	58
<b>4.4.2</b>	<b>Concentração Mínima Inibitória (MIC)</b>	63
4.5	CONCLUSÃO	64
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
Capítulo 5	MONTAGEM DO BIORREATOR	67
5.1	INTRODUÇÃO	67
5.2	MATÉRIAS E METODOS	68
<b>5.2.1</b>	<b>Estrutura do Biorreator</b>	68
5.3	AVALIAR O FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR EFETUAR REPAROS, MANUTENÇÃO NO SISTEMA E EQUIPAMENTOS ACESSÓRIOS	69
5.4	IMPLANTAÇÃO DE PONTOS DE MELHORIAS	70
<b>5.4.1</b>	<b>Instalação de Tela de Aço Inoxidável</b>	70
5.5	SEGURANÇA DE PROCESSO E PESSOAS ENVOLVIDAS NA OPERAÇÃO DO SISTEMA	71
5.6	ESTERILIZAÇÃO DO BIORREATOR	74
<b>5.6.1</b>	<b>Parâmetros Utilizados para Avaliar a Esterilização do Biorreator</b>	76
<b>5.6.2</b>	<b>Métodos para avaliar a eficiência dos parâmetros utilizados na esterilização do biorreator</b>	77
5.7	ANÁLISES DOS RESULTADOS	79
<b>5.7.1</b>	<b>Análise dos resultados de esterilização no biorreator</b>	79
5.8	CONCLUSÃO	80
5.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
Capítulo 6	TESTES HIDRODINÂMICOS NO BIORREATOR	82
6.1	INTRODUÇÃO	83
6.2	MATERIAS E METODOS	84
<b>6.2.1</b>	<b>Ensaio Hidrodinâmico</b>	85
6.2.1.1	Ensaio estímulo-resposta	85
<b>6.2.2</b>	<b>Modelos Matemáticos</b>	86
6.2.2.1	Verificação de possíveis anomalias no biorreator	87
<b>6.2.3</b>	<b>Método de Integração Numérica</b>	88

6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
6.3.1	<b>Curvas experimentais pH em função do tempo sem ajustes (antes da normalização com os modelos matemáticos)</b>	89
6.3.2	<b>Curvas experimentais normalizadas com os modelos de dispersão axial e N-Tanques em série</b>	92
6.3.3	<b>Curvas de distribuição do tempo de residência (DTR)</b>	94
6.3.4	<b>Análise de parâmetros para avaliar as possíveis anomalias no biorreator utilizando o modelo N-Tanques em série</b>	98
6.4	CONCLUSÃO	100
6.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
Capítulo 7	OPERAÇÃO DO BIORREATOR	103
7.1	INTRODUÇÃO	104
7.2	MATERIAIS E METODOS	105
7.2.1	<b>Condições Operacionais do Biorreator</b>	105
7.2.2	<b>Procedimentos Analíticos</b>	106
7.2.3	<b>Quantificação de BRS por NMP</b>	107
7.2.4	<b>Cultura Microbiana</b>	107
7.3	AVALIAÇÃO OPERACIONAL DO BIORREATOR	108
7.3.1	<b>Testes de biocidas e perfil da atividade de BRS</b>	108
7.3.2	<b>Substâncias testadas para controlar a atividade BRS</b>	109
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
7.4.1	<b>Avaliação da injeção dos biocidas no biorreator</b>	110
7.4.2	<b>Caracterização Cinética</b>	112
7.4.3	<b>Caracterização da atividade microbiana</b>	117
7.5	CONCLUSÃO	120
7.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
Capítulo 8	CONCLUSÃO GERAL	124
8.1	Avaliação do sucesso das concentrações estimadas pela MIC para o controle da atividade das BRS no biorreator	125
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
10.	ANEXOS	130

## Capítulo 1

### INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A acidificação biológica é um problema a ser controlado na produção de óleo e gás natural pelas indústrias petrolíferas. Injeção de fluidos durante a recuperação secundária de óleo pode estimular o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e a produção de gás sulfídrico ( $H_2S$ ) em reservatórios de petróleo maduros (NEMATI et al., 2001; GIEG et al., 2011; XUE e VOORDOUW, 2015). Essa substância possui propriedades corrosivas que afetam os sistemas de produção, transporte e de armazenamento, assim como pode afetar a qualidade do petróleo produzido (CHEN et al., 1994; NEMATI et al., 2001; GOMEZ DE SARAIVA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006), além de expor os operadores de campo, as populações circunvizinhas e o meio ambiente aos possíveis efeitos dos compostos destas substâncias (ALMEIDA et al., 2006).

Diversos tipos de biocidas têm sido utilizados na tentativa de controlar a produção biológica de sulfeto por BRS (NEMATI et al., 2001; GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005; XUE e VOORDOUW, 2015). Há muitos anos a indústria de petróleo utiliza biocidas na tentativa de controlar a atividade de BRS, mas, em muitos casos sem resultados permanentes (GAYLARDE e VIDELA, 1994; CHEN et al., 1994; DOS SANTOS et al., 2010; LAVANIA et al., 2011; RAMADAN et al., 2015). No entanto, o controle a longo prazo depende da frequência de aplicação e dosagem do biocida (RAMADAN et al., 2015; XU et al., 2017; FERREIRA et al., 2018). Por outro lado, há um crescente número de relatos associando a falha do controle de sulfeto biológico à presença de BRS resistentes a biocidas (NEMATI et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2010; LAVANIA et al., 2011; LI et al., 2016; XU, et al., 2017). Segundo esses autores, quando esses microrganismos estão presentes, muitas vezes é necessário aumentar as frequências de aplicação de biocidas ou o uso de substância mais poderosa, elevando os custos de operação e de controle do processo por exigir maiores concentrações de aplicação, ou o uso de produtos mais caros (NEMATI et al., 2001; VIDELA, 2003; DOS SANTOS et al., 2010; LAVANIA et al., 2011; LI et al., 2016; XU, et al., 2017).

Estudos sobre a redução microbiana de sulfato são qualitativamente reportados por diversos autores (CHEN, et al., 1994; VIDELA, 2002; LAVANIA et al., 2011; XUE e VOORDOUW, 2015; DE JESUS, 2015). Apesar desses experimentos testarem o efeito de variáveis como pH, temperatura, tipo e disponibilidade do doador de elétrons, concentração de sulfato e efeitos inibitórios de íons metálicos, estes testes são comumente realizados em bateladas de tubos de ensaios (GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005; KJELLERUP et al., 2005; LAVANIA et al., 2011; STREET e GIBBS, 2010).

As comunidades microbianas sulfetogênicas presentes em reservatórios de petróleo apresentam uma alta diversidade de espécies com um potencial de interações ecofisiológicas que não são exploradas em bateladas *in vitro* (sistema estático). Para se aproximar das condições ambientais é necessário contemplar a atividade de uma comunidade de BRS mista, complexa e, muitas vezes, em forma de biofilme (FERREIRA et al., 2018). Esse tipo de comunidade não é apenas característica de ambientes naturais, os biorreatores operados em equilíbrio dinâmico de consumo de DQO apresentam condições semelhantes (FERREIRA et al., 2018). Portanto, apesar de testes com biorreatores contendo comunidade complexa de BRS não sejam comumente encontrados em literatura, esta é, possivelmente, a melhor metodologia para caracterizar esse processo ambiental (CHEN et al., 1994; GIEG et al., 2011; FERREIRA et al., 2018).

Nesta pesquisa foram utilizados seis diferentes agentes químicos com potencial para controlar as populações de BRS. Os agentes químicos testados foram: Surfactante, óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis*, óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* (Tea tree), óleo de Neem (azadiractina) e um biocida (Dazomet). O surfactante utilizado foi o lauril glicosídeo que é biodegradável, de fácil acesso e de menor custo quando comparado as alternativas de mercado. Outra vantagem do lauril é devido à sua miscibilidade, que pode ser injetado nas linhas de produção ou diretamente nos reservatórios produtores de petróleo. As preocupações ambientais incentivam a substituição de biocidas tóxicos por outros menos agressivos ao meio ambiente, aos operadores e aos equipamentos (GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005). Os agentes químicos geralmente usados para controle da produção de H<sub>2</sub>S e prevenção ou proteção da corrosão das estruturas metálicas do sistema de produção, transporte e armazenamento de petróleo e seus derivados são altamente tóxicos e, após utilização, pode ter um impacto negativo no

ambiente (GUIAMET, et al., 2003; DOS SANTOS, et al., 2010; STREET e GIBBS, 2010). Uma alternativa para reduzir os efeitos negativos dos biocidas pode ser a utilização de compostos produzidos naturalmente, como os óleos essenciais que são ambientalmente aceitáveis, biodegradáveis e são considerados de baixo risco para o desenvolvimento de resistência a microrganismos (GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005; BHOLA et al., 2014; FERREIRA, et al., 2018). Na literatura existem diversos estudos utilizando extratos e óleos essenciais de plantas com potencial para controle da corrosão em tubulações, equipamentos industriais e população de BRS (CARSON e RLLEY 1995; GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005; PAPADOPOULOS et al., 2006; BHOLA et al., 2014; PATEL e VASHI, 2015; FERREIRA, et al., 2018). Uma vantagem adicional dos compostos naturais, é ausência de resíduos após o tratamento e a sua característica lipofílica que interage com a membrana microbiana, facilitando a inibição dos microrganismos (REDDY et al., 1998; VIANA, 2009). Já o biocida utilizado como controle, é uma solução composta por Dazomet e hidróxido de sódio que é amplamente aplicado em reservatórios de produção e tanques de armazenamento de óleo, devido a fatores como solubilidade, facilidade de degradação e preservação dos reservatórios de óleo do fraturamento hidráulico.

Diante desse contexto, este trabalho propõe o uso de um biorreator de leito fixo com redução de sulfato, para testar e quantificar o efeito de seis compostos químicos que visam a redução da atividade de BRS em um ambiente dinâmico diferente do teste de laboratório *in vitro* (estático). A fim de obter um controle confiável para os testes, um consórcio de bactérias redutoras de sulfato obtido a partir de amostras de água produzida de um campo de petróleo maduro foi utilizado para inocular o biorreator, que foi operado em torno de 230 dias antes de início dos testes. O objetivo era obter um processo confiável da comunidade microbiana em estado estacionário (equilíbrio dinâmico do sistema), conforme avaliado pela demanda química de oxigênio, consumo de sulfato e produção de sulfeto (consumo de DQO,  $SO_4$  e produção  $H_2S$ ), antes dos testes com injeção dos biocidas.

## 1.1 OBJETIVOS

Desenvolver um sistema biológico anaeróbico em equilíbrio dinâmico em relação ao consumo de substratos orgânicos e aceptores de elétrons (DQO e sulfato), para possibilitar testes de seis substâncias inibidoras, e identificar os fatores operacionais de relevância para o melhor controle do processo sulfetogênico “*souring*” *in situ* pela indústria do petróleo. Para tanto, testes em bancada de laboratório (estáticos) e no biorreator (dinâmicos) foram necessários para atender aos objetivos específicos:

- i) Realizar testes de acoplamento molecular baseado na estrutura tridimensional da enzima Sulfito Redutase (SIR) em complexo com íon sulfito;
- ii) Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) de seis compostos químicos para testes no biorreator;
- iii) Avaliar o funcionamento da unidade experimental do biorreator, efetuar reparos, manutenção, melhorias e esterilização do sistema e equipamentos acessórios tornando-a apta para uso;
- iv) Analisar o comportamento hidrodinâmico do biorreator através de ensaios estímulo-resposta tipo pulso, utilizando hipoclorito de sódio como elemento traço, modelar e avaliar as características hidrodinâmicas;
- v) Explorar a cinética de controle de BRS com o uso dos seis compostos químicos no biorreator, e quantificar os impactos na atividade das BRS.

## 1.2 ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese está organizada em 8 capítulos, na introdução geral que faz parte do capítulo 1, aborda-se o impacto inovador e quais os problemas que esta pesquisa pode resolver. Inicia-se com um resumo sobre a operação dos reservatórios maduros para extração de óleo e gás natural. Faz-se um breve comentário sobre a produção de H<sub>2</sub>S como um todo (produção de óleo e gás, meio ambiente, saúde ocupacional, etc.). Em seguida cita-se exemplos de diversos trabalhos utilizando biocidas na tentativa de controlar a produção

biológica de sulfeto por BRS, no entanto, os testes são explorados em bateladas *in vitro* (sistema estático) que não mimetizam a realidade *in situ*. Por fim, é apresentado a proposta desta pesquisa, o uso de um biorreator de leito fixo com redução de sulfato, para testar e quantificar o efeito de seis compostos químicos (entre esses compostos, óleos essenciais, surfactante e biocida) que visam a redução da atividade das BRS em um ambiente dinâmico diferente do teste de laboratório *in vitro* (estático).

No capítulo 2, faz-se a revisão da literatura apresentando dados sobre estudos recentes na prevenção e controle das BRS. É apresentado um Desenho ilustrativo mostrando alguns detalhes da Estação Dom João, local onde foi coletado o consórcio microbiano de BRS para inocular o biorreator sulfetogênico com características semelhantes a um reservatório de petróleo e testar biocidas no controle das BRS. O capítulo 3, mostra as etapas metodológicas utilizadas nesta pesquisa através da confecção de um diagrama (Figura 3).

O capítulo 4, apresenta em formato de artigo os resultados dos testes de acoplamento molecular e determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos compostos químicos utilizados no biorreator para controle das BRS. Nesta pesquisa utilizou-se a enzima sulfito redutase (SIR) que é a responsável pela transformação do sulfito ( $\text{SO}_3$ ) em gás sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ). O capítulo 5, descreve com riqueza de detalhes as fases de manutenção, melhorias e esterilização no biorreator antes de ser liberado para uso. Três ensaios de estímulo-resposta de injeção tipo pulso, utilizando-se hipoclorito de sódio para determinação de curvas de concentração versus tempo, modelos matemáticos para avaliar o comportamento hidráulico e prováveis anomalias no biorreator, são apresentados no capítulo 6.

O capítulo 7 mostra as fases para avaliação operacional do biorreator: partida, equilíbrio dinâmico de consumo de DQO, sulfato e produção de sulfeto, apresentado no formato de artigo. Testes com injeção de biocidas e a quantificação dos impactos da atividade das BRS. A conclusão geral é apresentada no capítulo 8.

### 1.3 HIPÓTESES DA TESE

- i) Um biorreator sulfetogênico de leito fixo em “equilíbrio dinâmico” em relação ao consumo de DQO, sulfato e produção de H<sub>2</sub>S é um instrumento mais adequado para testar e quantificar substâncias controladoras do processo sulfetogênico do que testes em batelada;
- ii) Testes de batelada *in vitro* em sistema estático para identificar a MIC (Concentração Mínima Inibitória), pode ter comportamento diferente dos dinâmicos, e não ser eficiente como método de monitoramento do controle da atividade de BRS;
- iii) A produção de sulfeto de hidrogênio por BRS em reservatórios de petróleo, pode ser controlada através da adição óleos essenciais (RO), (TO) e (NO);
- iv) Os biocidas não missíveis quando introduzidos nos sistemas dinâmicos controlam a atividade das BRS por períodos mais longos do que os solúveis em água.
- v) Biocida altamente tóxico diminui rapidamente a biomassa das BRS, mas não interferem no processo de recolonização do sistema dinâmico.

## Capítulo 2

### REVISÃO DA LITERATURA

#### Resumo

Este capítulo apresenta a revisão da literatura abordando alguns itens relevantes a esta pesquisa. Inicia-se com um breve comentário sobre o processo de recuperação avançada de petróleo, e as consequências desta técnica devido a produção de gás sulfídrico que impacta negativamente em setores como (produção, operação, equipamentos e meio ambiente), adicionando custos no processo para controle de BRS. Os riscos associados a toxicidade do sulfeto de hidrogênio e os limites de tolerância adotados pela Norma Regulamentadora (NR 15) também são comentados. Em seguida, são apresentados alguns meios de controle e prevenção do *souring*: uso de óleos essenciais como agentes inibidores de BRS, metodologia para construção de modelos tridimensionais de uma proteína-alvo, a Sulfito Redutase (SIR), e análise das possíveis interações com as substâncias inibidoras distintas (surfactante, óleos essenciais e o biocida). Ademais, são explorados a descrição de biorreatores, tipo de operação, recentes estudos de caso de experimentos realizados em reatores de leito fixo, e por fim, a hidrodinâmica de reatores.

**Palavras chaves:** Biorreator, Bactérias Redutoras de Sulfato, Biocidas, Teste de Acoplamento Molecular

## 2.1 INTRODUÇÃO

Conforme relatado por alguns autores como (Sousa, 2009; Gieg, et al., 2011; XU, et al., 2017; Okpala, 2017), a acidificação biogênica implica em alguns fatores negativos para os reservatórios de petróleo, cujos problemas mais relatados, destacam-se: a) redução da produtividade e qualidade do óleo; b) elevação dos custos com refino; c) obstrução dos reservatórios injetores e produtores pela geração de sulfeto de ferro (FeS); d) utilização de compostos químicos para controle do gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S); e) corrosão em equipamentos de manutenção, produção, tanques, tubulações etc., f) problemas relacionados à segurança e meio ambiente. Segundo Sousa (2009), os itens acima destacados justificam a inclusão de tecnologia para o controle preventivo do processo de acidificação em reservatórios de petróleo, pois, trata-se de um problema de grande relevância e que possivelmente acontece em diversos campos de produção de óleo e gás.

Alguns órgãos internacionais como a EPA (Environmental Protection Agency) e API (American Petroleum Institute), regulam o percentual de H<sub>2</sub>S nos fluidos de petróleo e gás natural (SOUSA, 2009; NASCIMENTO, 2006; ROCHA et al., 2011; WITTER et al., 2014). Os riscos associados a toxicidade do sulfeto de hidrogênio são avaliados através de limites de exposição TLV-TWA – (Threshold Limit Value - Time Weighted Average). TWA é o limite de tolerância a qual o trabalhador está exposto durante a jornada diária de trabalho (expressa a média aritmética da concentração de H<sub>2</sub>S) que não provoca danos à saúde, ou seja, para uma exposição diária de 8 horas, a média não deve ultrapassar 10 mg/L (ROCHA, 2006; SOUSA, 2009; WITTER, et al., 2014). No Brasil, a Norma Regulamentadora (NR-15) estabelece limites de tolerância de 8 ppm referente a exposição de 8 horas de trabalho. No entanto, existem relatos que em determinadas áreas de produção de petróleo do Recôncavo Baiano a concentração de H<sub>2</sub>S ultrapassa os limites determinados pela NR-15 (informação verbal, 2015). Esta pesquisa utilizou um consórcio microbiano de BRS coletadas numa estação de petróleo do Campo Dom João, localizado na cidade de São Francisco do Conde, região da Bacia do Recôncavo da Bahia considerada com elevada concentração de H<sub>2</sub>S na produção de óleo e gás, para inocular um biorreator sulfetogênico com características semelhantes a um reservatório de petróleo e testar biocidas no controle das BRS.

### 2.1.1 Apresentação do Campo Dom João (local de coleta da água produzida)

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2016), a área de concessão do Campo Dom João engloba campos de Produção marítima e terrestre, uma estação coletora e pontos de coleta de reservatórios isolados. Atualmente a Estação Coletora de Dom João tem capacidade de processamento primário de petróleo de 4.300 m<sup>3</sup>/dia (ANP, 2016). A produção é escoada através de linhas e carretas até a estação de coleta e tratamento de óleo de Dom João. Nesta estação realiza-se a quebra da emulsão, o óleo é transportado por carretas a outra estação “Parque São Paulo”, e enviado por oleoduto a Refinaria Landulfo Alves, em Mataripe (RLAM). Toda água produzida é injetada nos reservatórios injetores existentes, dentro do processo de recuperação secundária do campo (ANP, 2016). A figura 1 mostra dados de produção de óleo e gás, e o esquema ilustrativo de produção do campo Dom João (marítimo e terrestre) é apresentado na figura 2.

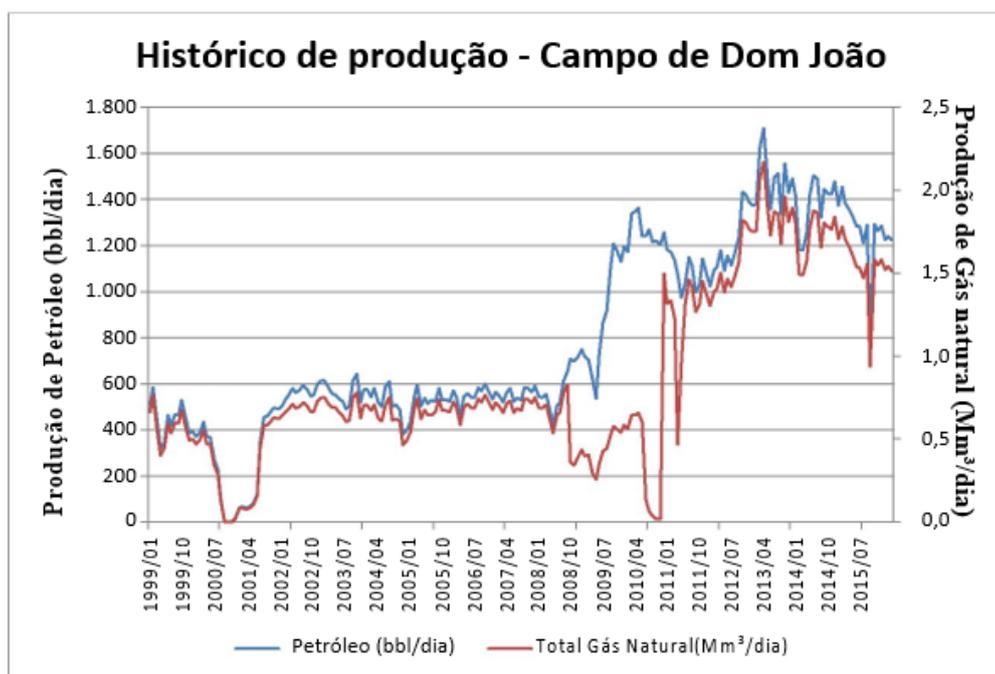


Figura 1: Dados de produção de óleo e gás natural do Campo Dom João (1999 a 2015)  
Fonte: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2016)

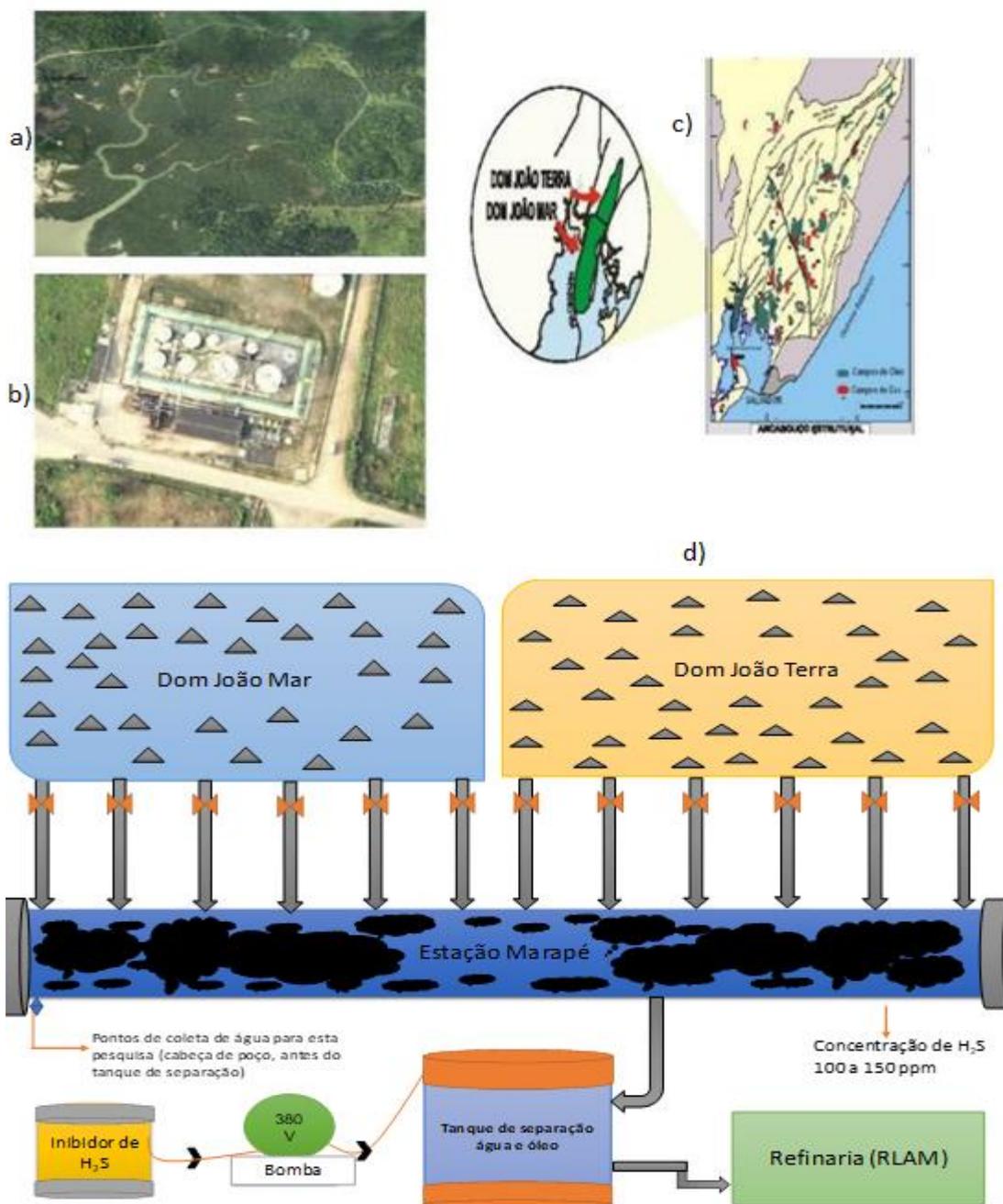


Figura 2: Desenho Representativo da Estação Dom João: a) Reservatórios no mar, b) Estação Marapé, c) mapa mostrando a localização dos reservatórios nos campos Dom João Terra e Mar, d) Esquema ilustrativo da estação de recebimento de óleo da produção dos Campos Dom João Mar e Terra (▲) reservatórios de produção de óleo

Fonte: Produção própria

## **2.2 RECUPERAÇÃO SECUNDÁRIA DE PETRÓLEO E ACIDIFICAÇÃO BIOGÊNICA (*SOURING*)**

A injeção de água no reservatório é considerada o principal método de recuperação secundária para extrair parte do óleo deixado no reservatório após a recuperação convencional (ROSA, et al., 2011; GIEG, et al., 2011; OKPALA, 2017). A injeção de água representa um recurso para a otimização da extração do petróleo, aplicável quando a energia estocada no reservatório é gasta sendo utilizada para aumentar a pressão interna e deslocar o óleo existente no reservatório em direção aos poços produtores (HUBERT e VOORDOUW, 2007; ROSA, et al., 2011; OKPALA, 2017). Este método apresenta vantagens sobre demais mecanismos de recuperação secundária, devido a disponibilidade da água e custo operacional menor quando comparados com outros métodos de recuperação avançada (ROSA, et al., 2011). No entanto, a injeção de água produzida para produção de óleo e gás deve ser controlada devido aos efeitos negativos do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) que é gerado pelas BRS que utilizam o sulfato como acceptor final de elétrons na redução microbiana do sulfato para gerar acidificação no reservatório (HUBERT e VOORDOUW, 2007; GIEG, et al., 2011). A produção de sulfeto pela atividade microbiana estimulada pela recuperação secundária do petróleo resulta na acidificação do óleo (*souring*). Esse é um importante problema a ser mitigado pelas empresas exploradoras dos campos de petróleo. (SOUSA, 2009; DOS SANTOS et al., 2010; GIEG, et al., 2011; XU, et al., 2017; FERREIRA, et al., 2018).

### **2.2.1 Metabolismo e Classificação das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)**

As BRS constituem um grupo variado de bactérias, relacionadas por aspectos fisiológicos e ecológicos (VIDELA, 2003). Algumas podem utilizar, alternativamente, como receptor de elétrons o nitrato, fumarato ou o piruvato. São classificadas em diversos gêneros, sendo de destaque o *Desulfovibrio* spp. e o *Desulfotomaculum* spp., segundo a capacidade de formação de esporos, respectivamente (VIDELA, 2003; SOUSA, 2009). As fontes de carbono orgânico são limitadas ao lactato, piruvato ou ao maleato (POSTGATE, 1984; VIDELA, 2003). Morfologicamente se apresentam como bacilos (em forma e vírgula), as vezes espiralados, tendo entre 0,5 a 1,0 µm de diâmetro

e 3,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento (VIDELA, 2003). São anaeróbicos estritos, crescem melhor sob condições levemente alcalinas, numa faixa de pH ótimo de 7,0 a 7,8, mas apresentam tolerância à faixa de 5,5 a 9,0. São reportados alguns casos em que as BRS apresentam crescimento em condições severas de pH ácido (2,5 a 4,5), como as existentes nos efluentes de mineração (SOUSA, 2009).

As BRS utilizam o sulfato, como acceptor final de elétrons para o processo de respiração anaeróbia. Desenvolvem-se em ambientes em que o potencial de oxi-redução ( $E_h$ ) esteja abaixo de  $-100$  mV. (POSTGATE, 1984; VIDELA, 2003; SOUSA, 2009). Quanto à temperatura, a maioria das BRS é classificada como mesófila, com crescimento ótimo entre 25 e 40 °C, mas algumas espécies podem tolerar até  $-5^\circ\text{C}$  (psicrófilas), enquanto outras podem apresentar crescimento ótimo em temperaturas superiores a  $75^\circ\text{C}$  (hipertermofílas) (SOUSA, 2009). Vários compostos inorgânicos sulfurados constituem importantes aceptores de elétrons para as BRS. Mais de 20 gêneros são conhecidos coletivamente pela capacidade de reduzir sulfato ou compostos reduzidos de enxofre (como por exemplo, sulfito e tiosulfato) e são divididos em dois grupos: Grupo 1 - BRS que utilizam o lactato, piruvato, etanol e determinados ácidos graxos como doadores de elétrons, sendo o produto final da oxidação o acetato, onde se destacam os gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobotulus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Thermodesulfobacterium* e Grupo 2 - BRS que oxidam ácidos graxos, particularmente o acetato, na redução do sulfato a sulfeto, sendo destacados os representantes dos gêneros *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* e *Desulfosarcina* (SOUSA, 2009). Na redução assimilativa o sulfato é incorporado como fonte de enxofre para os processos de biossíntese, enquanto que na redução desassimilativa o sulfato é utilizado como acceptor final de elétrons para a geração de energia, com consequente excreção de  $\text{H}_2\text{S}$  (POSTGATE, 1984; SOUSA, 2009).

As BRS são bactérias heterotróficas que utilizam uma fonte de carbono orgânico, para obter a energia necessária para reduzir o íon sulfato a sulfeto. Como resultado dessa redução, ocorre a produção de sulfetos, bissulfetos e hidrogênio sulfetado, e outros produtos metabólicos intermediários (VIDELA, 2003; SOUSA, 2009).

### 2.2.2 Controle e Prevenção do *Souring*

Para reduzir os prejuízos gerados pela acidificação de reservatórios as empresas investem em pesquisas na busca de medidas de controle e prevenção do *souring*, as quais destacam-se: remoção de íons sulfato (dessulfatação) por membranas de nanofiltração, tratamento da água do mar com radiação ultravioleta (UV), aplicação de biocidas e agentes bioestáticos, controle dos níveis de oxigênio na água injetada, uso de inibidores de corrosão (VIDELA, 2003; SOUSA, 2009; DOS SANTOS, 2010). No entanto, a injeção de biocidas é o método mais utilizado no controle da acidificação de reservatórios maduros de petróleo (*souring*). Esse método é criticado por alguns autores, pois causa impactos econômicos e ambientais, e pode resultar na seleção indesejável de microrganismos resistentes a biocidas (VOORDOUW et al., 2009; BRADLEY et al., 2011; MCGINLEY et al., 2011). Outro método utilizado é a exclusão biocompetitiva de BRS por BRN (GITTEL et al., 2012; CALLBECK et al., 2013; XUE e VOORDOUW, 2015). Enfim, alguns autores relatam que controlar a acidificação em campos de petróleo maduros é uma atividade muito complexa. A indústria mostra interesse em descobrir substâncias com controle eficaz, menor custo e mais ecológicas.

### 2.2.3 Uso de Biocidas em Sistemas Estáticos

Conforme reportado por Videla (2003) os requisitos mais importantes para medir a eficiência de um biocida de uso industrial são: i) Seletividade para os microrganismos a eliminar; ii) capacidade de manter o efeito inibidor diante de outras substâncias presentes no meio em condições semelhantes às de operação; iii) não ser corrosivo para os metais do sistema; iv) apresentar adequada biodegradabilidade; v) ser seguro no manuseio durante a utilização e dosagem e vi) baixo custo. É importante ressaltar que o tipo e a dose de biocida usado para controlar as BRS *in situ* é frequentemente decidido com base em experimentos laboratoriais de teste de batelada (GOMEZ DE SARAIVA et al., 2003; KJELLERUP et al., 2005; STREET E GIBBS, 2010; LAVANIA et al., 2011). Segundo Ferreira et al. (2018), em tais testes, as células de BRS são expostas diretamente ao biocida em uma situação significativamente diferente do que ocorre *in situ*. Por

exemplo, as BRS podem crescer em biofilmes ou mesmo residir em microcanais menos alcançáveis dentro da estrutura da formação rochosa. Assim, o biocida aplicado pode não ter esse efeito observado em testes de laboratório para todas as células de BRS presentes *in situ*, por não poder alcançá-las igualmente. Algumas células de BRS freqüentemente sobreviverão e servirão como inóculo para o repovoamento da formação rochosa (FERREIRA et al., 2018).

No entanto, esses problemas podem ser minorados em experimentos em cilindros de aço e mais especificamente em cilindros de porcelana ou até mesmo em testemunhos, os chamados amostras padrão de cortes de rocha do reservatório de petróleo. Da mesma forma, ainda é preciso selecionar microrganismos padrão para os experimentos em laboratório, como aqueles que são utilizados no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM) que emprega um consórcio de BRS contendo 9 isolados, representantes dos gêneros *Dessulfovibrio* (*D. vulgaris*, *D. dechloracetivorans*, *Desulfovibrio alaskensis*, *D. capilatus*), *Desulfobacter* (*D. postgatei*), uma espécie de *Desulfotomaculum* (*D. acetoxidans*), duas BRS não identificadas (amostras do LABEM BA001 e AV004) e uma amostra da espécie *Thermonovirga lienii* (bactéria redutora de sulfeto) (ROSÁRIO, 2014). Todos esses organismos foram isolados de amostras de água produzida de diversos campos de petróleo da bacia do Recôncavo Baiano e que apresentaram resistência aos compostos como gluronaldeído, hipoclorito e formaldeído em ensaios com concentrações de 10 a 200 mg.L<sup>-1</sup> em experimentos estáticos.

### 2.2.3.1 Estudo de caso utilizando biocidas em sistema estático

Wen et al (2009) relata o resultado de vários testes em sistema estático com BRS planctônico e sésil. Células sésseis mostraram serem mais resilientes do que as células planctônicas no teste de curta exposição ao biocida. Deve-se destacar, que os testes de monitoramento de BRS na indústria de petróleo, na maioria das vezes são realizados usando células planctônicas em experimentos em bateladas (GIEG et al., 2011). Estas questões metodológicas podem, portanto, superestimar significativamente o efeito de biocidas no controle da atividade de BRS *in situ*. Por exemplo, foi descrito que a concentração eficaz de Tetrakis hidroximetil fosfônio sulfato (THPS), cloreto de benzil

trimetilamônio (BTAC), glutaraldeído e formaldeído pode variar entre 10 e 200 mg/l. Esta é uma variação significativa na faixa de concentração de biocidas, particularmente quando são considerados seus efeitos colaterais no meio ambiente. Por essa razão, vários autores classificam o uso de alguns biocidas como insatisfatório ou mesmo imprevisível (GIEG et al., 2011; LAVANIA, et al., 2011).

Para avaliar o efeito de diferentes soluções químicas no controle do crescimento de BRS sésseis, planctônicas e a desorganização de biofilmes bacterianos, Cavalcanti (2001) em parceria com a Petrobras (Brasil) reavaliaram a eficiência de alguns biocidas utilizados na indústria do petróleo: THPS, ácido dietilenotriaminopentacético - DTPA, glutaraldeído - GA, molibdato e nitrito de sódio). Dentre as soluções avaliadas, o ácido (DTPA) foi a de melhor desempenho nos testes estáticos, seguido pela solução de glutaraldeído. Todos os produtos testados foram mais efetivos contra bactérias planctônicas do que sésseis. Segundo Videla (2003) o primeiro passo para o controle dos problemas associados as BRS na indústria do petróleo é a monitoração desses microrganismos no local atingido. Entretanto, é comum o monitoramento somente de populações planctônicas. Portanto, observou-se que o tratamento com biocidas contra microrganismos planctônicos, não é necessariamente eficiente para o controle das mesmas populações na forma de biofilme e em equilíbrio dinâmico de crescimento. Esta subestimação do controle pode gerar enormes gastos em tratamentos ineficazes, pois, nem todo o biofilme é atacado de uma só vez. Devido a caminhos preferenciais e/ou bolsões preservados na matriz rochosa, significativa quantidade de BRS pode não ser afetada pelo controle químico. As BRS não afetadas acabam servindo como fonte de inóculo para a repopulação das regiões da matriz onde o biofilme foi afetado negativamente. Portanto, quando o objetivo é o controle de BRS *in situ*, os agentes antibacterianos devem ser testados em sistemas que mimetizam as condições de biofilme e não apenas em testes com bactérias planctônicas (VIDELA, 2003; FERREIRA, 2018). Nesse contexto, vale ressaltar que os testes realizados em laboratório devem alcançar o máximo possível as condições de equilíbrio dinâmico encontrados no campo. Essas condições podem ser atingidas no sistema de biorreatores encontrados no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos da Universidade Federal da Bahia, local onde será realizado esse trabalho.

#### 2.2.4 Uso de Óleos Essenciais como Alternativa para Controle de *Souring*

Embora alguns biocidas sejam eficientes no controle de BRS, eles são altamente tóxicos à segurança das pessoas e ao meio ambiente e, muitas vezes, são caros e não-biodegradáveis. Portanto, o uso de produtos não-tóxicos e naturais como inibidores de BRS, torna-se importante por serem biodegradáveis, menos poluentes e oriundos de fontes renováveis (GOMEZ DE SARAIVA, et al., 2003; GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005; ABIOLA, 2007; ABDEL-GABER et al., 2008). Como alternativa aos compostos tóxicos, alguns produtos derivados de plantas têm mostrado grande potencial no controle de corrosão em aços e BRS. Entre os diferentes tipos de óleos essenciais, destacam-se o óleo australiano Tea-tree (TO), obtido de *Melaleuca Aternifolia* (CARSON et al., 2000). O TO é o óleo essencial mais conhecido, freqüentemente usado para tratar infecções da pele, vias aéreas, orais, ou usado como anti-séptico e desinfetante (GIROLAMO, et al., 2006); O óleo de neem (NO) é originário da Índia, é amplamente distribuído em regiões tropicais, subtropicais, semi-áridas e úmidas-tropicais (DUA et al., 2009). Partes da planta, incluindo raízes, caules, cascas, folhas, sementes, flores e frutas têm substâncias quimicamente bioativas. Essas substâncias são peptídeos, alcalóides, taninos, fenóis, esteróis, flavonóides e glicosídeos que contribuem no combate às bactérias (SANDANASAMY et al., 2013). Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (RO) é uma espécie nativa da Europa, mas é cultivada em todos os estados brasileiros (TAKAYAMA et al., 2016). Existem diversos estudos referentes a utilização de extratos e óleos derivados de plantas no controle de microrganismos redutores de sulfato (KLISKIC et al., 2000; CHAIEB et al., 2004; VALEK e MARTINEZ, 2007; BHOLA et al., 2014; PATEL e VASHI, 2015). No entanto, os testes foram realizados em bateladas de laboratório in vitro (estático), diferente de um ambiente dinâmico.

Foi relatado por Abiola (2007) que o extrato de Aloe vera inibe a corrosão do zinco em soluções de HCl 2M, com uma eficiência de inibição de 67% a 10% . Kliskic et al. (2000) analisaram extrato de *Rosmarinus Officinalis* (RO) como inibidor de corrosão de alumínio com uma solução de HCl. Chaieb et al. (2004) avaliaram óleo essencial de RO para aço-carbono e foi observada uma eficiência de aproximadamente 73% na concentração de 16 g/L<sup>-1</sup> de inibidor. Valek e Martinez (2007) também estudaram o óleo de Neem como inibidor de corrosão.

## 2.3 BIORREATORES

### 2.3.1 GENERALIDADES

Os biorreatores também são conhecidos como reatores bioquímicos ou biológicos, nos quais ocorrem diversas reações químicas que utilizam biocatalisadores que podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais) (FOGLER, 2002; SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Raghavarao et al (2003) descrevem o biorreator como o coração do bioprocesso, onde as matérias-primas em condições adequadas, são convertidas no produto desejado. De acordo com Sarti et al (2006), biorreatores são aparelhos utilizados para otimizar o crescimento microbiano e/ou acelerar reações biológicas com um objetivo definido para a produção e tratamento. Ainda segundo Sarti et al (2006) para atingir o objetivo a otimização é feita principalmente através das seguintes variáveis: i) Garantir pureza do processo ii) Aumentar a transferência de massa (substrato/microrganismo) e iii) Possibilitar o controle de fatores limitantes do processo como: aeração, concentração de substrato e controle de pH. De acordo com Oliveira-Lopes e Da Cunha (2008) biorreatores ou reatores bioquímicos são termos utilizados para descrever um recipiente contendo uma reação biológica, ou seja, representam todo e qualquer local onde células e enzimas realizam a conversão de substrato em produto. Os fermentadores foram os primeiros reatores desenvolvidos.

Schmidell e Facciotti (2001) classificam os biorreatores como: enzimáticos, onde as reações correm na ausência de células vivas; e não enzimáticos, as reações ocorrem com células vivas. O uso de células vivas na produção de diversos produtos químicos, tornou-se uma realidade promissora tanto nas indústrias químicas, agroindústrias e de alimentos (FOGLER, 2002). Tanto os microrganismos como as células de mamíferos estão sendo usadas para produzir uma variedade de produtos, como a insulina e a maioria dos antibióticos e polímeros (FOGLER, 2002; SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Na biossíntese, as células, também chamadas de biomassa, consomem nutrientes para crescer e produzir mais células e demais produtos importantes (FOGLER, 2002). Internamente, a célula utiliza seus nutrientes para produzir energia e mais células. Esta transformação dos nutrientes em energia e bioprodutos é realizada através de várias enzimas (catalisadores) que as células utilizam numa série de reações para produzir metabolitos

(FOGLER, 2002; INGRAHAM, 2010). Estes produtos podem permanecer na célula (intracelular), como também podem ser secretados para fora das células (extracelular).

Segundo Schmidell e Facciotti (2001), na categoria dos reatores com células vivas, os reatores com microrganismos são os mais utilizados, e são empregados desde a década de 1940 para a produção industrial de diversos produtos, como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, ou ainda no tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos. No entanto, a depender do tipo de microrganismo utilizado, alguns reatores podem ter características bastante distintas no que se refere aos fenômenos de transporte que ocorrem no reator: calor, massa e quantidade de movimento (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001; FOGLER, 2002).

Reatores que operam com organismos unicelulares como bactérias e leveduras possuem, em geral, um comportamento reológico diferente daqueles que empregam fungos filamentosos (bolores). Os que utilizam células animais ou vegetais, em geral possuem várias particularidades, devido as diferentes características apresentadas por este tipo de células em relação às células microbianas, destacando-se entre elas a elevada sensibilidade ao cisalhamento, característica que, em casos extremos, leva à necessidade da utilização de biorreatores não convencionais, como reatores “air-lift”, ou ainda os reatores com membranas, nos quais não se tem agitação mecânica e, conseqüentemente as tensões e cisalhamento são menores (SCHMIDELL E FACCIOTTI, 2001).

### **2.3.2 Operação de Reatores**

Segundo Schmidell & Facciotti (2001), existem diversas formas de se conduzir um reator biológico, dependendo das características próprias do microrganismo, meio de cultivo e dos objetivos específicos do processo que se pretende executar. Existe uma enorme flexibilidade de operação que depende das características próprias de cada processo. No geral os reatores podem ser operados das seguintes formas: i) Descontínuo ou batelada; ii) Descontínuo alimentada ou batelada alimentada; iii) Contínuo; iv) Semicontínuo.

### **2.3.2.1 Processo Descontínuo ou Batelada**

De acordo com Carvalho e Sato (2001), na operação descontínua pode ocorrer baixos rendimentos, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam. Os autores ainda relatam a possibilidade de “tempos mortos”, período em que o biorreator está indisponível, como tempo de carga e descarga, lavagem e esterilização. No entanto este tipo de operação apresenta menores riscos de contaminação (se comparados com processos contínuos de fermentação), grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto, o que é vital para a indústria farmacêutica. Nesta pesquisa foi utilizado um biorreator de leito fixo e fluxo ascendente com meio poroso para suportar o biofilme de BRS, a operação ocorreu em bateladas de 72 h.

### **2.3.3 Reatores de Leito Fixo e Fluxo Ascendente**

Devido à semelhança do meio poroso com as rochas reservatório, reatores de leito fixo e fluxo ascendente são frequentemente utilizados na microbiologia do petróleo para o estudo da cinética do crescimento bacteriano de BRS e estratégias no controle da acidificação biológica. Consumo de substrato, geração de  $H_2S$ , simulação das condições de campo, avaliação da efetividade da aplicação de biocidas e agentes inibidores alternativos como óleos essenciais e o nitrato e nitrito, são fatores avaliados em geral (CHEN et al., 1994; HUBERT et al., 2005; HUBERT e VOORDOUW, 2007; GIEG et al., 2011; BERNARDEZ et al., 2012; DEV et al., 2016). Apesar desses estudos apresentarem diversas opções para o controle de BRS, observa-se raras informações em relação a hidrodinâmica dos reatores e à influência do perfil de escoamento dos fluidos nos resultados obtidos (BERNARDEZ et al., 2012; DE JESUS, 2015). O desempenho do reator pode ser afetado pelo tempo de residência da solução, devido a variações na taxa de adesão e desprendimento das bactérias na superfície do meio poroso, além de afetar a

resistência na transferência de massa entre a fase líquida e o biofilme formado (CHANDER et al., 2001; BERNARDEZ et al., 2012; DE JESUS, 2015). A presença de zonas de estagnação no meio poroso pode interferir no regime de fluxo de nutrientes ou inibidores, promovendo a redução local da atividade bacteriana ou dificultando o acesso do inibidor nessas zonas (BERNARDEZ et al., 2012; DE JESUS, 2015).

### 2.3.3.1 Estudo de Caso em Reatores de Leito Fixo e Fluxo Ascendente

Hubert et al. (2003) utilizaram biorreatores de leito embalado com fluxo ascendente colunas de vidro de diâmetro (D) 4,5 cm e altura (H) 64 cm, para testar a eficiência de 17,5 mM de nitrato no controle de *souring*. As colunas foram preenchidas com areia e inoculados com 15 ml de água produzida, e operados em bateladas 21 dias durante os quais a atividade microbiana foi monitorada através das determinações das concentrações de sulfeto, sulfato e o potencial redox ambiental (Eh). A adição de nitrato não inibiu as BRS suficientemente para causar mudanças na composição da comunidade.

Mitchell et al. (2008) estudaram um reator de fluxo com colunas preenchidas por 70g de areia e diâmetro de 2 mm. O reator foi inoculado com cultura de *Bacillus mojavensis*, em uma matriz de suporte de areia em condições de baixo fluxo. O sistema era composto por reservatório de meio de cultivo, bomba peristáltica, conexão de entrada abaixo da coluna (funcionalmente vertical com deslocamento ascendente do material circulante) e reservatório. Para monitoramento do biofilme utilizou-se a análise do número de células viáveis no efluente do sistema e das bactérias aderidas na matriz da coluna (biofilme). As culturas de biofilmes e planctônicas de *Bacillus mojavensis*, foram expostas a CO<sub>2</sub> supercrítico em fluxo a 136 atm e 35 °C durante 19min e lentamente depressurizadas após o tratamento. As culturas suspensas mostraram uma redução de 3log10, enquanto as culturas de biofilme apresentaram uma redução de 1log10 no número de células viáveis. Esses dados demonstraram que as culturas de biofilmes de *B. mojavensis* são mais resistentes ao SC-CO<sub>2</sub> do que as comunidades planctônicas suspensas. O CO<sub>2</sub> funciona como um desinfetante no controle de alguns microrganismos.

Naquele experimento o tempo de residência do biofilme do *Bacillus mojavensis* com o meio poroso foi de apenas seis dias.

De Jesus (2015) avaliou o efeito da aplicação de molibdato como agente inibidor na cinética de redução biogênica de sulfato e geração de sulfeto. Os ensaios foram realizados em meio sintético, em modo descontínuo em reatores agitados a 38°C, com um consórcio de BRS isoladas a partir de água produzida de um campo de petróleo. Um modelo fenomenológico foi proposto para descrever o transporte da fase líquida e usado para simular a inibição da atividade das BRS no biorreator de fluxo ascendente submetido à injeção de molibdato. Um modelo de reservatório de petróleo *onshore* foi estabelecido e simulações foram realizadas para investigar a efetividade da adição de molibdato no controle e prevenção da acidificação. Simulações do transporte do molibdato no biorreator mostraram que a inibição da atividade das BRS é alcançada após 168 h do início da injeção contínua de molibdato.

Xue e Voordouw (2015) realizaram testes com injeção combinada de nitrato e biocidas para prevenção e controle da acidificação biológica dos reservatórios utilizando biorreatores embalados em areia, de fluxo ascendente, injetados com 2 mM de nitrato e ácidos voláteis (VFA, 3 mM de acetato, propionato e butirato) a uma taxa de fluxo de 3 ou 6 volumes porosos (PV) por dia. A injeção pulsada dos biocidas glutaraldeído (Glut), cloreto de benzalcônio (BAC) e cocodiamina foi utilizada para controlar o *souring*. Os autores relataram sinergia entre o nitrato e os ácidos voláteis, e na aplicação contínua de biocidas (Glut e BAC) em conjunto com nitrato. No entanto, não houve controle de *souring* quando o nitrato foi injetado sozinho.

## 2.4 HIDRODINÂMICA DE REATORES

Na literatura são encontrados diversos estudos utilizando os modelos matemáticos de dispersão axial e n-tanques em série, para avaliar o comportamento hidrodinâmico de reatores através das curvas de distribuição do tempo de residência. Dentre os diversos estudos, cita-se o trabalho de Botinha et al. (2015), que avaliou a fração de desvio e zonas mortas a partir das curvas de distribuição de tempos de residência (DTR) em um reator

CSTR; Souza (2012) avaliou o comportamento hidrodinâmico de reatores UASB através do TDH e modelagem N-CSTR; Silveira et al. (2016) estudou a hidrodinâmica de um reator anaeróbio de leito fluidizado. Um trabalho muito interessante é o de Sarathai et al. (2010) para investigar as características hidráulicas do reator. O autor faz análises da distribuição do tempo de residência e utiliza o modelo de N-CSTR para descrever o comportamento do equipamento, através de novos parâmetros com base no volume útil e tempos de retenção hidráulico para verificar a ocorrência de anomalias hidrodinâmicas. Com os parâmetros de Sarathai et al. (2010) foi possível verificar as anomalias de escoamento e verificar o comportamento hidrodinâmico proposto com o modelo de N-CSTR nesta pesquisa.

## 2.5 CONCLUSÃO

Entre as diversas estratégias de controle e mitigação da acidificação biogênica (*souring*), os biocidas e os antimetabolitos como o nitrato são as mais utilizadas (NEMATI et al., 2001; VILCAEZ et al., 2007). Na categoria dos biocidas, o glutaraldeído, cloreto de benzalcônio e THPS são os mais utilizados em operações de campos de petróleo (MCGINLEY et al., 2011; ENZIEN e YIN, 2011). A injeção de nitrato estimula o crescimento de bactérias redutoras de nitrato (BRN) que inibem o crescimento de microrganismos redutores de sulfato, através da exclusão biocompetitiva de BRS por BRN (GITTEL et al., 2012; CALLBECK et al., 2011). No entanto, em determinados reservatórios de petróleo, o nitrato e os produtos de sua redução são tão corrosivos como o sulfeto, sendo inclusive suspenso o seu uso em experimento de campo na Noruega (Beeder et al., 2007). Vik et al. (2007) pesquisadores da empresa Norske Shell realizaram testes com injeção de nitrato para avaliar a mitigação do *souring* através da utilização de nitrato na água de injeção como parte de um estudo de gerenciamento da água produzida no campo de petróleo Draugen, localizado em Haltenbanken na Noruega. A aplicação de nitrato foi testada usando um sistema especialmente desenvolvido para mimetizar a atividade microbiana no reservatório de petróleo próximo ao poço de injeção. No entanto, após três meses de testes, foram observados aumentos significativos nas taxas de corrosão no sistema e baixo controle da atividade microbiana de BRS. Devido aos

efeitos negativos observados ao aplicar nitrato na água de injeção, a Norske Shell reavaliou a necessidade de mitigar a acidificação com nitrato, e continuou o uso de biocidas no controle da atividade bacteriana nas instalações de superfície. A proliferação de BRS em campos de petróleo maduros é baseada na presença de compostos orgânicos (derivados de petróleo), sulfato (formação de rocha e/ou água do mar) e água de formação. Uma parcela significativa da população BRS em tais ambientes pode sobreviver ao efeito de injeções de biocidas devido à existência de canais preferenciais na formação rochosa, diluição por difusão diferencial e/ou proteção celular pela formação de biofilme. Esta pesquisa mostra que quando os testes são realizados dentro de um sistema dinâmico, é possível contabilizar esses efeitos.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOLA. O. K. 2007. Studies on the inhibition of aluminium alloy (3SR) corrosion by (4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl methylthio) acetic acid and its precursor in hydrochloric acid (HCl) solution, *Corrosion and Materials* 32, p. 10–15.

ABDEL-GABER. A.M., E. Khamis, H. Abo-ElDahab, Sh. Adeel, 2008. Inhibition of aluminium corrosion in alkaline solutions using natural compound, *Materials Chemistry and Physics* 109, p. 297–305.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

ASTANI, A., REICHLING, J., SCHNITZLER, P. 2010. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research*, 24, 673-679.

BEEDER, J., ANDERSEN, T., LIENGEN, T., TORSVIK, T., DRONEN, A.K. 2007. Corrosion as a side effect during nitrate treatment of produced water and aquifer water injection. NACE Corrosion Conference, paper 07512.

BERNARDEZ, L. A., DE ANDRADE LIMA, L. R. P., RAMOS, C. L., ALMEIDA, P. F. 2012. A kinetic analysis of microbial sulfate reduction in an upflow packed-bed anaerobic bioreactor. *Mine Water and the Environment*, v. 26, n. 3, p. 62 – 68.

BHOLA, S.M., ALABBAS, F.M., BHOLA, R., SPEAR, J.R., MISHRA, B., OLSON, D.L., KAKPOVIA, A.E., 2014. Neem extracts as an inhibitor for biocorrosion influenced by sulfate reducing bacteria: A preliminary investigation. *Engineering Failure Analysis* 36 p.92-103

BRADLEY, G. J., MCGINLEY, H. R., & HERMSEN, N. L. 2011. A global perspective on biocides regulatory issues, in OTC 21806 (Houston, TX: Offshore Technology Conference), 1-5.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora NR 15 – Atividades e operações insalubres. Portaria SIT n.º 13, de 21 de junho de 2007. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <<http://www.mte.gov.br>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

CALLBECK, C. M., DONG, X., CHATTERJEE, I., AGRAWAL, A., CAFFREY, S. M., SENSEN, C. W., & VOORDOUW, G. 2011. Microbial community succession in a bioreactor modeling a souring low-temperature oil reservoir subjected to nitrate injection. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(3), 799-810.

CHAIIB, E.L., BOYANZER, A., HAMMOUTI, B., BENKADDOUR, M. AND BERRABAH, M. 2004. “Corrosion inhibition of steel in hydrochloric acid solution by rosemary oil”, *Transactions of the SAEST*, vol. 39, pp. 58-60 (PDF) *A review: Plant extracts and oils as corrosion inhibitors in aggressive media*.

CHANDER, A., KUNDU, A., BEJ, S. K., DALAI, A. K., VOHRA, D. K. 2001. Hydrodynamic characteristics of cocurrent upflow and downflow of gas and liquid in a fixed bed reactor. *fuel*, v. 80, p. 1043 – 1053.

CAVALCANTI, GUARANI DE HOLLANDA. 2001. Efeito de biocidas sobre biofilmes bacterianos envolvidos em processos de biocorrosão em plataformas marítimas da PETROBRAS. 142f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, BR.

CARSON, C.F., HAMMER, K.A, RILEY, T.V., 2006. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 19: p.50–62; [doi:10.1128/CMR.19.1.50-62.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006).

CARVALHO, KARINA Q. DE; SALGADO, MONIQUE T.; PASSIG, FERNANDO H.; PIRES, EDUARDO C. Avaliação hidrodinâmica de reator UASB submetido à variação cíclica de vazão. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 13, nº 2, p. 226-235. Abr./Jun. 2008.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. 2001. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blucher. p. 205-222. (Biotecnologia Industrial; v.2).

CHEW, Y. L., CHAN, E. W., TAN, P. L., LIM, Y. Y., STANSLAS, J., GOH, J. K. 2011. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 11, 1-10.

CHEN, C. I.; MUELLER, R. F.; GRIEBE, T. 1994. Kinetic analysis of microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in an upflow porous media biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 267 – 274.

D'ARRIGO, M., GINESTRA, G., MANDALARI, G., & BISIGNANO, G. 2010. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* *Phytomedicine*, v. 17, 317-322.

DE JESUS, ERISVALDO BITENCOURT. Redução Microbiológica de Sulfato: Cinética, Inibição com Molibdato e Simulação de Estratégias de Controle. Tese (Doutorado em Energia e Ambiente) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2015.

DEV, SUBHABRATA., ROY, SHANTONU., BHATTACHARYA, JAYANTA. 2016. Understanding the performance of sulfate reducing bacteria based packed bed reactor by growth kinetics study and microbial profiling. *Journal of Environmental Management*. v.177, 101-110.

DOS SANTOS, ELIAS S., GRITTA, DERMEVAL. S., TAFT, CARLTON A., ALMEIDA, P. F., RAMOS-DE-SOUZA, ELIAS., 2010. Molecular dynamics simulation of the adenylylsulphate reductase from hyperthermophilic *Archaeoglobus*. *Molecular Simulation* (Print), v. 36, p. 199-203.

DUA, V. K., PANDEY, A. C., RAGHAVENDRA, K., GUPTA, A., SHARMA, T., & DASH, A. P. 2009. Larvicidal activity of Neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. <http://www.springerlink.com/content/1475-2875/> *Malaria Journal*, 8, 124.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Compilation of Air Pollutant Emission Factors, AP42. Vol. I, Cap. 5.2: Transportation and marketing of petroleum liquids. Research Triangle Park, North Caroline, 2008. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttn/chief/>>. Acessado em: 03 de outubro de 2017.

ENZIEN, M. V., & YIN, B. 2011. New Biocide Formulations for Oil and Gas Injection Waters with Improved Environmental Footprint. Offshore Technology Conference. <http://doi:10.4043/21794-MS>.

FERREIRA, J. A. S., ALMEIDA, P. F., NUNES DOS SANTOS, J., SAMPAIO, I. C., FRANÇA FIGUEIRÊDO, L., TERESKA, D., & CHINALIA, F. A. 2018. Bioreactor for

Accurately Assessing Biocide Effectiveness in Controlling Biogenic Souring in Mature Oil Wells. Society of Petroleum Engineers. <http://doi:10.2118/191128-PA>.

FOGLER, H.S., 2002. Elementos de Engenharia das Reações Químicas. 3a Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.

GIEG, L. M., JACS, T. R., AND FOGHT, J. M. 2011. Biological *Souring* and Mitigation in Oil Reservoirs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92 (2): 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>.

GITTEL, A., KOFOED, M. V. W., SØRENSEN, K. B., INGVORSEN, K., AND SCHRAMM, A. 2012. Succession of deferribacteres and epsilonproteobacteria through a nitrate-treated high-temperature oil production facility. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 165–174. <http://doi:10.1016/j.syapm.2012.01.003>.

GOMEZ DE SARAIVA, S. G., GUIAMET, P. S., AND VIDELA, H. A. 2003. Prevention and Protection of the Effects of Biocorrosion and Biofouling Minimizing the Environmental Impact. *Rev. Metal.* 39: 49–54. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2003.v39.iExtra.1096>.

GUIAMET, P.S., & GÓMEZ DE SARAVIA, S. G., (2005). Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. *Latin American Applied Research*, 35(4), p.295-300.

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

ROSÁRIO, M. O. H. V. 2014. Isolamento e identificação molecular de bactérias redutoras de sulfato de amostras de água produzida em campo de petróleo. Dissertação Mestrado – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde.

KLISKIC, M., RADOSERVIC, J., GUDIC, S., KATALINIC, V. 2000. Aqueous extract of *Rosemarium officinalis* L. as inhibitor of Al-Mg alloy corrosion in chloride solution. *J.Appl.Electrochem.* 30: 823 - 830.

KJELLERUP, B. V., VEEH, R. H., SUMITHRARATNE, P. et al. 2005. Monitoring of Microbial *Souring* in Chemically Treated, Produced-Water Biofilm Systems Using Molecular Techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (4): 163–170. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0222-5>.

LAVANIA, M., SARMA, P. M., MANDAL, A. K. et al. 2011. Efficacy of Natural Biocide on Control of Microbial Induced Corrosion in Oil Pipelines Mediated by

Desulfovibrio Vulgaris and Desulfovibrio Gigas. *J. Environ. Sci.* 23 (8): 1394–1402. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9).

MCGINLEY, H. R., ENZIEN, M. V., JENNEMAN, G., & HARRIS J. 2011. Studies on the chemical stability of glutaraldehyde in produced water, in SPE 141449, SPE International Symposium on Oilfield Chemistry (Woodlands, TX: Society of Petroleum Engineers), 1–8.

MITCHELL, A. C.; PHILLIPS, A. J.; HAMILTON, M. A.; GERLACH, R.; HOLLIS, W. K.; KASZUBA, J. P.; CUNNINGHAM, A. B. 2008. Resilience of planktonic and biofilm cultures to supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids*, 47 (2), 318–325.

NEMATI, M., JENNEMAN, G. E., AND VOORDOUW, G. 2001. Mechanistic Study of Microbial Control of Hydrogen Sulfide Production in Oil Reservoirs. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 424–434. <https://doi.org/10.1002/bit.1133>.

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

OKPALA, G.N., CHEN, C., FIDA, T. AND VOORDOUW, G. 2017. Effect of Thermophilic Nitrate Reduction on Sulfide Production in High Temperature Oil Reservoir Samples. *Front. Microbiol.* 8:1573. doi: 10.3389/fmicb.2017.01573

OLIVEIRA-LOPES, L. C., DA CUNHA, M.B. 2008. Simulação de Biorreatores Contínuos com Células Imobilizadas para a Produção de Etanol. *Horizonte Científico* (Uberlândia), v. 2, p. 1-20.

PASSIG, FERNANDO. H.; BLUNDI, CARLOS. E. Caracterização hidrodinâmica de um filtro anaeróbico de fluxo ascendente. 1999.

PATEL, K.K., VASHI, R.T. 2015. Azadirachta Indica Extract as corrosion Inhibitor for Copper in Nitric Acid Medium. *Research Journal of Chemical Sciences* Vol. 5(11), p.59-66.

POSTGATE, J. R. 1984. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 29: 425–441.

ROCHA, J. R.; QUELHAS, O. L. G.; GOMES, R. S. 2011. Análise Crítica da Legislação Brasileira de Segurança e Saúde Ocupacional. O Caso da Exposição a Agentes Químicos. VII Congresso Nacional de Excelência em Gestão. ISSN 1984-9354. Artigo, 47 p.

ROSA, A. J., CARVALHO, R. S., XAVIER, J.A.D. Engenharia de Reservatórios de Petróleo. Editora Interciência, Petrobras, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

RAGHAVARAO, K. S. M. S., RANGANATHAN, T. V., & KARANTH, N. G. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 127-135.

INGRAHAM, J.L., INGRAHAM, C.A. Introdução a microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de caso. Editora Cengage Learning, 3ª edição, 2010.

SANDANASAMY, J. D/O., HAMID NOUR, A., BIN TAJUDDIN, S. N., & HAMID NOUR, A. 2013. Fatty Acid Composition and Antibacterial Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Oil. *The Open Conference Proceedings Journal*, 2013, 4, (Suppl-2, M11) 43-48.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. *Biotecnologia Industrial*, v2, p. 179-187, 2001.

SOUSA, K. A. 2009. Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato. Rio de Janeiro: UFRJ. 141 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SALGADO, MONIQUE T. Modelo matemático para avaliação hidrodinâmica em reatores tubulares operando em regime não-permanente, 2008. 167 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SARTI, A., POZZI, E., CHINALIA, F.A., ZAIAT, M., FORESTI, E. 2006. The performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage colonized by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemosphere*, 62, 1437-1443.

STREET, C. N. AND GIBBS, A. 2010. Eradication of the Corrosion-Causing Bacterial Strains *Desulfovibrio Vulgaris* and *Desulfovibrio Desulfuricans* in Planktonic and Biofilm Form Using Photodisinfection. *Corros. Sci.* 52 (4): 1447–1452. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2009.12.022>.

TAKAYAMA, C., MEIRA DE-FARIA, F., ALVES DE ALMEIDA, A. C., DUNDER, R. J., MANZO, L. P., RABELO SOCCA, E. A., BATISTA, L. M., SALVADOR, M. J., MONTEIRO SOUZA-BRITO, A. R., & FERREIRA, A. L. 2016. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 8, 677–681.

WEN, J., ZHAO, K., AND GU, T. 2009. A Green Biocide Enhancer for the Treatment of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) Biofilms on Carbon Steel Surfaces Using Glutaraldehyde. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63 (8): 1102–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.007>.

WITTER, R. Z.; TENNEY, L.; CLARK, S.; NEWMAN, L. S. 2014. Occupational Exposures in the Oil and Gas Extraction Industry: State of the Science and Research Recommendations. *American Journal of Industrial Medicine*. Am. J. Ind. Med.

VALEK, L., MARTINEZ, S. 2007. Copper corrosion inhibition by *Azadirachta indica* leaves extract in 0.5 M sulphuric acid, *Materials Letters*. v 61, p. 148–151.

VIDELA, H.A., 2003. “Detecção e Monitoramento da Biocorrosão”, em: *Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais*, p. 103, Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo.

VIDELA, H.A., 2003. “Prevenção e Controle, Metodos Físico-Químicos e Biocidas”, em: *Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais*, p. 126, Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo.

VIK, E. A., JANBU, A. O., GARSHOL, F. K., HENNINGE, L. B., ENGBRETSSEN, S., KUIJVENHOVEN, C., HENDRIKS, W. P. 2007. Nitrate Based Souring Mitigation of Produced Water - Side Effects and Challenges from the Draugen Pproduced Water re-Injection Pilot. *Society of Petroleum Engineers*. <https://doi:10.2118/106178-MS>.

VILCÁEZ, J., MIYAZAWA, S., SUTO, K., INOUE, C. 2007. Numerical evaluation of biocide treatment against sulfate reducing bacteria in oilfield water pipelines. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, Vol. 50, No.4, pp. 208-217. <https://doi.org/10.1627/jpi.50.208>.

VOORDOUW, G.; GRIGORYAN, A. A.; LAMBO, A.; LIN, S.; PARK, H. S.; JACK, T. R.; COOMBE, D.; CLAY, B.; ZHANG, F.; ERTMOED, R.; MINER, K.; ARENSDORF, J. J. 2009. Sulfide remediation by pulsed injection of nitrate into a low temperature Canadian heavy oil reservoir. *Environmental Science and Technology*, v. 43, p. 9512 – 9518.

XUE, Y., AND VOORDOUW, G. 2015. Control of Microbial Sulfide Production with Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating Bioreactors. *Frontiers Microbiology* 6:1387. [doi: 10.3389/fmicb.2015.01387](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01387).

XU, D., JIA, R., LI, Y. et al. 2017. Advances in the Treatment of Problematic Industrial Biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2203-4>.

## Capítulo 3

### MATERIAIS E METODOS

Neste capítulo são apresentadas as etapas metodológicas adotadas para o desenvolvimento deste trabalho. O diagrama mostrado na figura 3 descreve a lógica dos experimentos.



Figura 3: Diagrama mostrando as fases dos experimentos no biorreator: (Fase 1) Modelagem molecular e Determinação da (MIC) dos compostos químicos; (Fase 2) Montagem e manutenção do biorreator; (Fase 3) Operação do biorreator e Hidrodinâmica.

Fonte: Produção própria

Esta pesquisa foi realizada em três etapas, sendo:

### **3.1 ETAPA I – MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPOSTOS QUÍMICOS**

Testes de acoplamento molecular dos compostos químicos (moléculas bioativas com função inibitória de H<sub>2</sub>S), e ensaios microbiológicos *in vitro* para identificar a concentração mínima inibitória (MIC) para os seis biocidas (testes estáticos).

**Acoplamento Molecular:** Docagem Molecular, também conhecida como Acoplamento molecular, Ancoragem molecular ou Docking, é um método usado na Modelagem Molecular (MM) para prever a orientação preferencial de uma molécula (ligante) a uma segunda (alvo), quando ligados entre si para formar um complexo estável. O conhecimento da orientação preferida, pode ser utilizado para prever a energia livre de ligação ou a afinidade de ligação entre essas moléculas ( DOS SANTOS, 2011).

**Ensaio microbiológico *in vitro* – Sistema Estático:** As concentrações efetivas mínimas (MIC) de cada biocida em função do crescimento de BRS foram determinadas usando um consórcio microbiano obtido a partir de reservatórios de petróleo maduros.

### **3.2 ETAPA II - MONTAGEM DO BIORREATOR**

A segunda fase foi a montagem e manutenção de um biorreator de leite empacotado para a redução de sulfato (Figura 4).

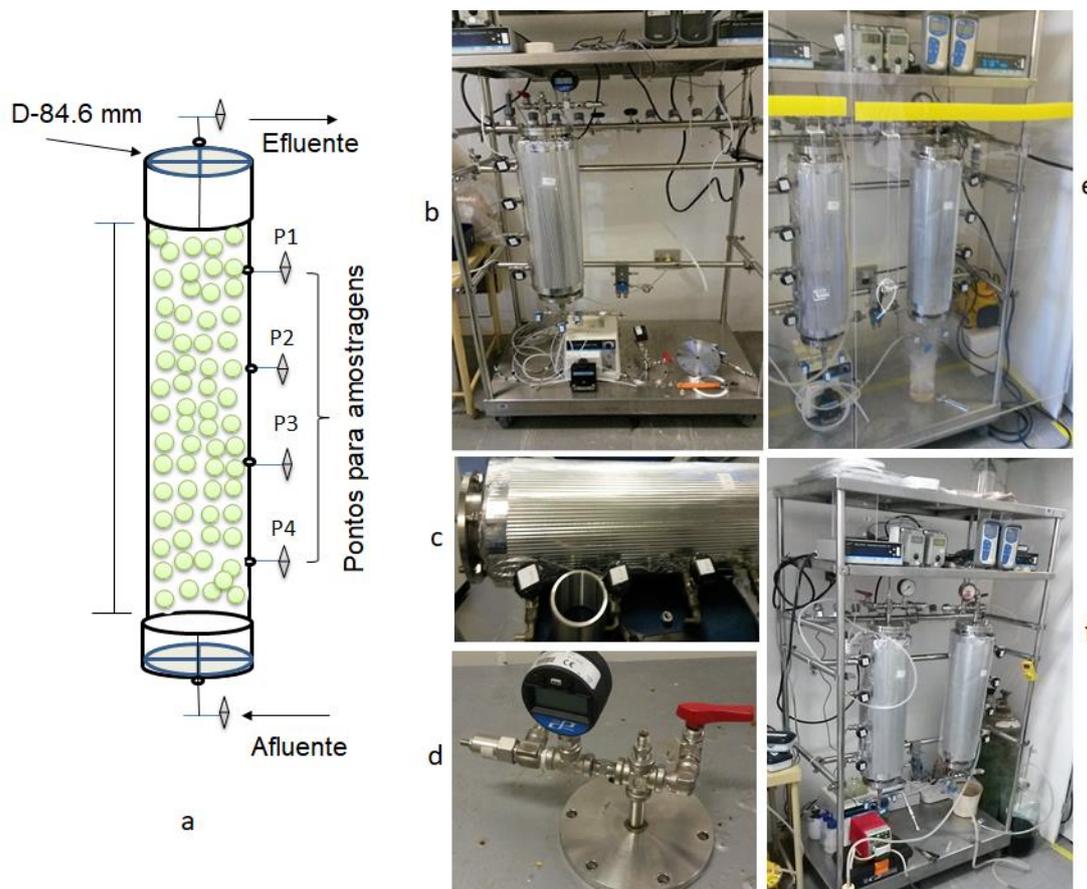


Figura 4: Biorreator de leito fixo em fases de manutenção, melhorias e montagem: a) desenho esquemático de uma célula do biorreator descrevendo as dimensões do sistema e pontos de amostragens; b) biorreator desmontado do suporte de fixação para melhorias e manutenção; c) célula do biorreator em manutenção; d) tampa frontal do biorreator e acessórios (manômetro e válvulas) em manutenção; e) biorreator liberado para operação; f) comissionamento do biorreator (primeiros testes)

Fonte: Produção própria

### 3.3 ETAPA III - OPERAÇÃO DO BIORREATOR

**Hidrodinâmica:** Nesta etapa realizou-se ensaios no biorreator através de testes estímulo-resposta tipo pulso utilizando como traçador uma solução de hipoclorito de sódio, para determinar o comportamento hidrodinâmico através do perfil de escoamento. Os modelos matemáticos de dispersão axial e N-tanques em séries foram utilizados para avaliar o perfil do biorreator.

**Avaliação Operacional:** Início de operação (*start-up*) do biorreator e equilíbrio dinâmico (determinado através do consumo de DQO, sulfato e produção de  $H_2S$ ).

**Teste das substâncias inibitórias de BRS:** Após aferida a estabilidade dinâmica do biorreator de BRS, o sistema foi utilizado para os testes das substâncias inibidoras ou controladoras do processo sulfetogênico (LG, RO, TO, MIX-GR, NO e DZ-controle).

A Figura 5 apresenta as metas e etapas de operação do biorreator que explicam a lógica de formação de biofilme de BRS e o monitoramento da atividade sulfetogênica de comunidade complexa de BRS. A primeira meta foi alcançar o equilíbrio-dinâmico na produção de sulfeto e consumo de DQO que acontece no final da partida do reator (*Start-up*). Após a definição dessa etapa de partida esses dados foram utilizados como controle para os testes de inibição do processo sulfetogênico. Portanto, é imprescindível alcançar e definir a estabilidade dinâmica da atividade sulfetogênica no sistema dinâmico porque essa situação é utilizada como controle do processo.

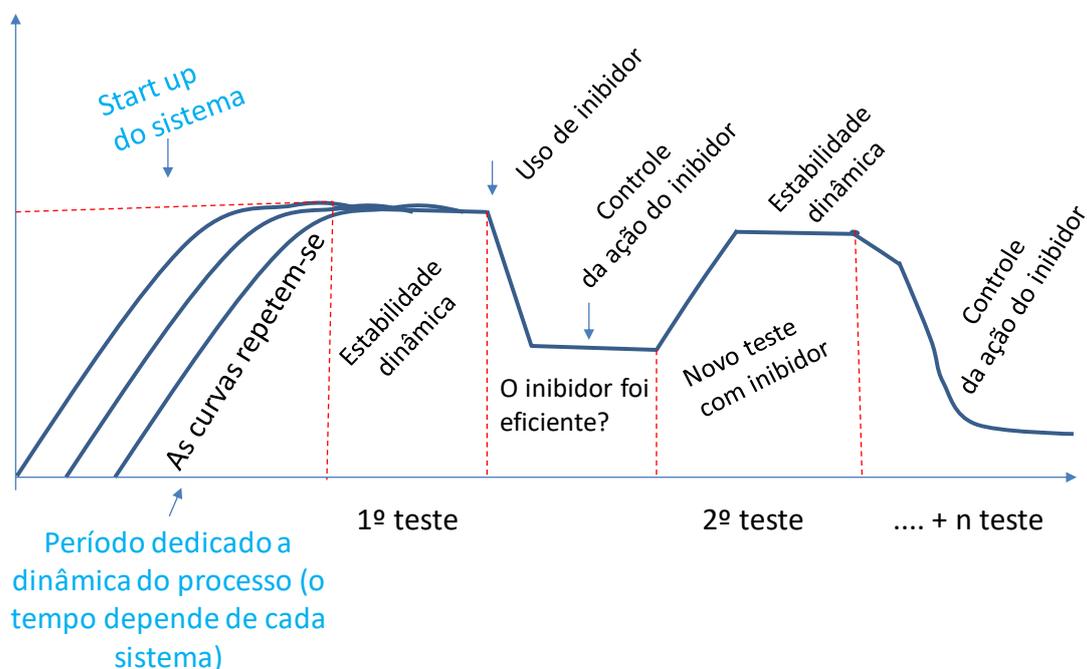


Figura 5: Diagrama com as etapas operacionais do biorreator

Fonte: Produção própria

## Capítulo 4 - Artigo submetido (em fase de análise)

### TESTES DE ACOPLAMENTO MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA MIC

#### Resumo

A acidificação biológica em reservatórios maduros de petróleo é comumente associada as bactérias redutoras de sulfato (BRS). O acúmulo de sulfeto pode afetar a qualidade do óleo desde a produção até o armazenamento. A sulfito redutase (SIR) é a enzima que converte íon sulfito em sulfeto e várias substâncias podem interferir em sua atividade. Tal interferência pode impedir o crescimento das BRS e o acúmulo de sulfeto *in situ*. O objetivo deste capítulo é aplicar técnicas de modelagem molecular com experimentos *in vitro* para quantificar o potencial de três óleos essenciais como inibidor da atividade da SIR. Os resultados da modelagem matemático molecular indicam que os óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis*, Neem e Tea-tree atuam como inibidores da enzima sulfito redutase, que foi confirmado por testes *in vitro*. O óleo de Neem obteve melhor desempenho dentre os óleos testados tendo em vista a ação dos ácidos palmítico e esteárico.

Palavras Chaves: SIR, Acidificação Biológica, Óleos Essenciais, Acoplamento Molecular

## 4.1 INTRODUÇÃO

A produção de gás sulfídrico é um problema que afeta a produtividade e a qualidade do óleo e gás natural em reservatórios maduros de petróleo. Na fase aquosa o sulfeto pode existir como  $S^{2-}$ ,  $HS^-$  e  $H_2S$  dependendo do pH (KHATIB e SALANITRO, 1997; GIEG et al., 2011). A injeção de fluidos e a presença de orgânicos e sulfato durante as técnicas de recuperação avançada de óleo (EOR) podem aumentar significativamente o crescimento de bactérias redutoras de sulfato em reservatórios de petróleo (GIEG et al., 2011). Existem várias espécies de BRS relatadas em tais ambientes, porém, *Desulfovibrio vulgaris* é frequentemente usada como o modelo fisiológico para caracterizar tal grupo e será utilizada neste estudo (DOS SANTOS et al., 2010).

A redução de sulfato em sulfeto pelas BRS começa no citoplasma desses organismos pela ação de três enzimas: (i) trifosfato sulfossulfato de adenosina - ATPs (que ativa o sulfato em função da molécula de ATP, adenosina trifosfato); (ii) Adenililsulfato redutase (APSR responsável por formar o intermediário ativo APS, adenosina fosfossulfato) e (iii) Sulfito redutase (SIR, que é responsável pela redução do sulfito em sulfeto). A acidificação pode ser controlada pela aplicação de biocidas ou de nitrato (DAVIDOVA et al., 2001; BØDTKER et al., 2008). No entanto, outras formas de controle, como o uso de bacteriófagos para eliminar o tipo específico de BRS, também têm sido avaliadas (SUMMER et al., 2011).

Óleos essenciais vegetais podem oferecer uma alternativa inovadora no controle da produção de  $H_2S$ . Essas substâncias contêm peptídeos, alcalóides, taninos, fenóis, esteróis, flavonóides e glicosídeos, que são conhecidos por suas atividades antimicrobianas (SANDANASAMY et al., 2013). Porém, a descoberta de novos biocidas é geralmente considerada um processo demorado e dispendioso, particularmente se o agente principal for uma mistura de diferentes substâncias.

O controle microbiano efetivo pode estar associado a uma ou mais substâncias em óleos essenciais de plantas. Uma configuração de teste complexa deve ser aplicada para auxiliar na identificação de tais componentes. Além disso, abordagens teóricas podem ser usadas para auxiliar em tal objetivo. Modelagem de homologia (Bordoli et al., 2009),

triagem virtual (Breda et al., 2008), acoplamento molecular (Jaghoori et al., 2016), mecânica molecular (MM) e mecânica quântica / mecânica molecular (QM / MM) (Lima et al., 2016) são metodologias comuns projetadas para construir modelos tridimensionais de uma proteína-alvo identificada e observar suas interações com substâncias inibidoras distintas. É uma abordagem singular para desvelar novos inibidores enzimáticos. Como é observado para várias espécies de BRS (espécie *Desulfovibrio-vulgaris*), a enzima sulfito redutase (SIR) é a responsável pela transformação do sulfito (SO<sub>3</sub>) em gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S). Esta é uma enzima ligada à membrana e favorece o uso de Modelagem Molecular (MM), pois não precisa de substâncias carreadoras que tem a função de levar o inibidor para dentro da enzima. Então, técnicas de Modelagem Molecular podem ser usadas para o rastreio de potenciais inibidores. A Modelagem Molecular é uma ferramenta muito útil para avaliar diferentes substâncias, que estão presentes em misturas complexas, como observado em óleos vegetais essenciais.

No entanto, é importante conhecer quais substâncias presentes em tais óleos poderiam causar uma inibição fisiológica nas BRS. Para resolver esse problema, torna-se necessário avaliar as interações entre alguns componentes importantes dos óleos essenciais e da enzima. Assim, construiu-se um modelo tridimensional da enzima SIR para a análise de potenciais reações inibidoras causadas pelos principais constituintes dos óleos essenciais (*Rosmarinus Officinalis*, Neem e Tea Tree), um surfactante e um biocida frequentemente utilizado na indústria petroquímica. A proposta deste estudo é aplicar técnica de ancoragem molecular para descobrir se esses óleos essenciais têm alto potencial inibitório contra as BRS, investigar quais compostos bioativos presentes em tais óleos são responsáveis pela inibição da enzima alvo SIR, e comparar os resultados das simulações com os dados dos ensaios laboratoriais.

## **4.2 MATÉRIAS E MÉTODOS**

### **4.2.1 Preparação do receptor e ligantes**

A molécula alvo utilizada na construção do modelo atômico molecular (receptor) foi baseada na estrutura tridimensional da enzima SIR em complexo com íon sulfito,

obtida do banco de dados de Protein Data Bank (PDB código 3OR1). O PDB é um banco que possui uma serie de informações de estruturas tridimensionais de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios obtidas por técnicas experimentais, a exemplo da Difração de Raios X ou Ressonância Magnética. Algumas estruturas também podem ser conseguidas utilizando outras técnicas de MM como a modelagem por homologia. A modelagem foi realizada fazendo uso da interface gráfica Autodock Tools 4.2 (Morris et al., 2009), um programa auxiliar do AutoDock. As simulações de docagem foram realizadas através do AutoDock Vina, levando-se em conta as cadeias A, B e C do receptor onde foram introduzidos todos os hidrogênios e cargas parciais calculadas através do campo de forças empírico MMFF94 (HALGREN, 1999). A figura 6 apresenta a estrutura da enzima SIR.

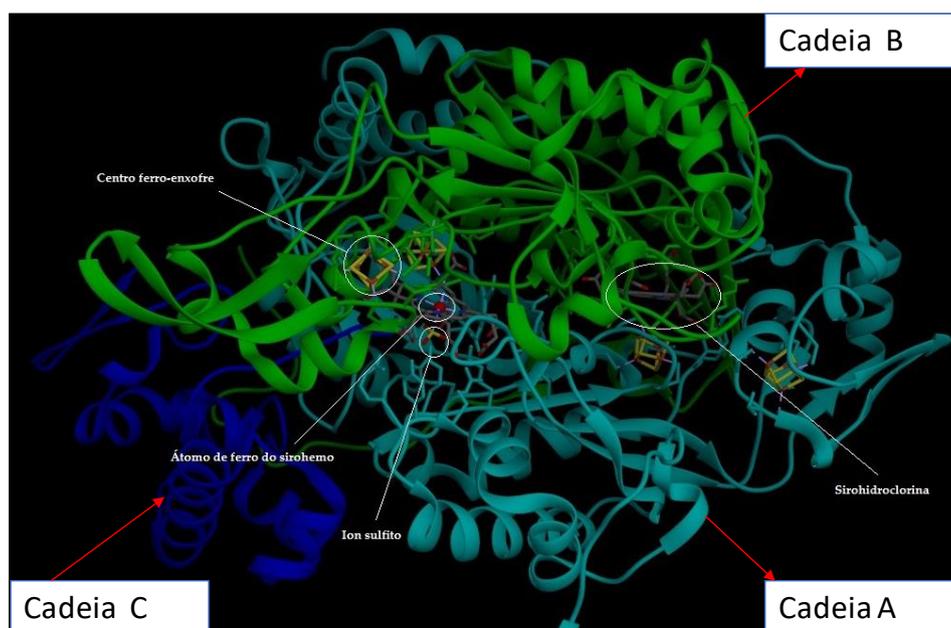


Figura 6: Estrutura tridimensional da enzima Sulfito Redutase (SIR) em complexo com o íon sulfito. A estrutura da enzima é composta por seis cadeias, no entanto foram simuladas as cadeias A, B e C, devido a simetria da estrutura.

Os parâmetros para modelar os centros de ferro-enzofre, sirohemo e sirohidroclorin foram obtidos com o *General Atomic and Molecular Electronic Structure System* (GAMESS97), usando a Teoria de Hartree Fock, com um conjunto de bases mínimas (RHT-STO-3G). O sitio de ligação foi selecionado, baseando-se no conhecimento dos aminoácidos que formam o sítio ativo e levando-se em consideração

todos os resíduos que podem interagir com os ligantes, Arg83, Arg101, Arg172, Lys213, Lys215, Lys217, Arg231, Arg376 e Arg378. Então o receptor foi geometricamente otimizado através do método Steepest Descent.

Como os óleos essenciais são uma mistura de diversas substâncias, o critério de escolha para análise, levou em consideração o percentual de cada substância que apresenta concentração (acima de 10%). As principais substâncias e concentrações contidas nos óleos essenciais (*Rosmarinus officinalis*, Tee tree e Neem) são mostradas na tabela 1. Além dos óleos, foram testados o surfactante lauril-glicosídeo e o biocida dazomet utilizado como controle.

Tabela 1: Principais Substâncias e Concentrações contidas nos Óleos Essenciais

Óleo Essencial	Substâncias	Concentrações (%)	g/mL	Densidade (g/mL)	(g/mL)	%
TO	1,8 cineol	15	.15	.858	.129	12.87
	$\alpha$ -Terpinene	13	.13		.112	11.15
	$\gamma$ -Terpinene	28	.28		.240	24.02
	Óleo Terpinen-4	48	.48		.412	41.18
RO	$\alpha$ -Pinene	21.3	.213	.885	.189	18.85
	1,8 cineol	28.5	.285		.252	25.22
	Cânfora	27.7	.277		.245	24.51
NO	Ácido Linoleico	34.69	.347	.922	.320	31.98
	Ácido Oleico	20.46	.205		.189	18.86
	Ácido Esteárico	20.42	.204		.188	18.83
	Ácido Palmítico	18.66	.187		.172	17.20

A Figura 7 mostra as estruturas tridimensionais dessas substâncias obtidas do banco de dados de pequenas moléculas chamado PubChem. O mesmo procedimento realizado no receptor foi usado para modelar os ligantes, ou seja, todos os hidrogênios e cargas adicionadas fazendo uso do mesmo campo de forças.

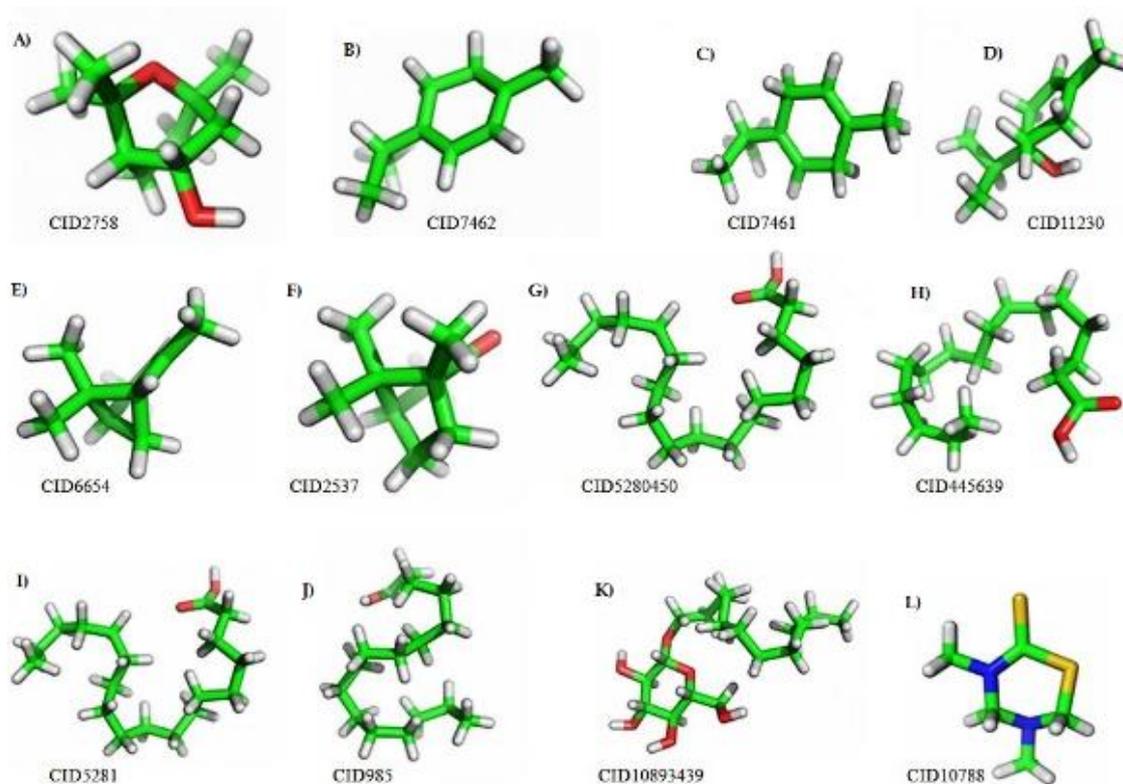


Figura 7: Estruturas Tridimensionais: A) 1,8 cineol, B)  $\alpha$ -Terpinene, C)  $\gamma$ -Terpinene, D) Óleo Terpinen-4, E)  $\alpha$ -pinene, F) Cânfora, G) ácido linoleico, H) ácido oleico, I) ácido esteárico, J) ácido palmítico, K) lauril, and L) Dazomet (controle). Todas as substâncias estão representadas em formato de haste

Fonte: Produção própria

Para os cálculos de energia de interação entre o receptor e os ligantes (energia livre de ligação) foi construída uma caixa de volume  $30 \times 25 \times 25 \text{ \AA}^3$  com centro sobre o centro catalítico do receptor (sirohemo) de forma a conter toda região do sítio ativo até os centros de ferro-enzofre, além de permitir que os ligantes girem livremente no sítio de ligação alcançando todas as conformações possíveis. A energia de ligação é calculada através da equação 1, onde as constantes são ajustadas para calibração da energia livre, levando-se em conta dados obtidos experimentalmente. Os três termos iniciais são encontrados comumente em mecânica molecular e dão conta das interações de dispersão/repulsão, modelado pelo potencial de Van der Waals, o segundo termo refere-se à energia contida em ligações de hidrogênio, já o terceiro refere-se ao potencial eletrostático e o último termo modela o efeito hidrofóbico.

$$\Delta G = vdwE_{vdw} + hbond E_{hbond} + elecE_{ele} + desolE_{desol} \quad (1)$$

Os parâmetros de ancoragem foram obtidos através da simulação de reancoragem (*redocking*). Esse procedimento consiste em remover o substrato (sulfito) da estrutura SIR e reintroduzi-lo à proteína. Os melhores modos de ligação foram obtidos em termos da mais baixa energia de ligação e desvio da raiz quadrática média (DRQM). O DRQM dado pela equação 2 é calculado entre os dois conjuntos de coordenadas cristalográficas ( $x_c, y_c, z_c$ ) e as coordenadas de simulação ( $x_d, y_d, z_d$ ) sobre a soma dos átomos do SO<sub>3</sub> (Figura 8). Na equação 2  $N$  representa a quantidade de átomos.

$$DRQM = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ci} - x_{di})^2 + (y_{ci} - y_{di})^2 + (z_{ci} - z_{di})^2} \quad (2)$$

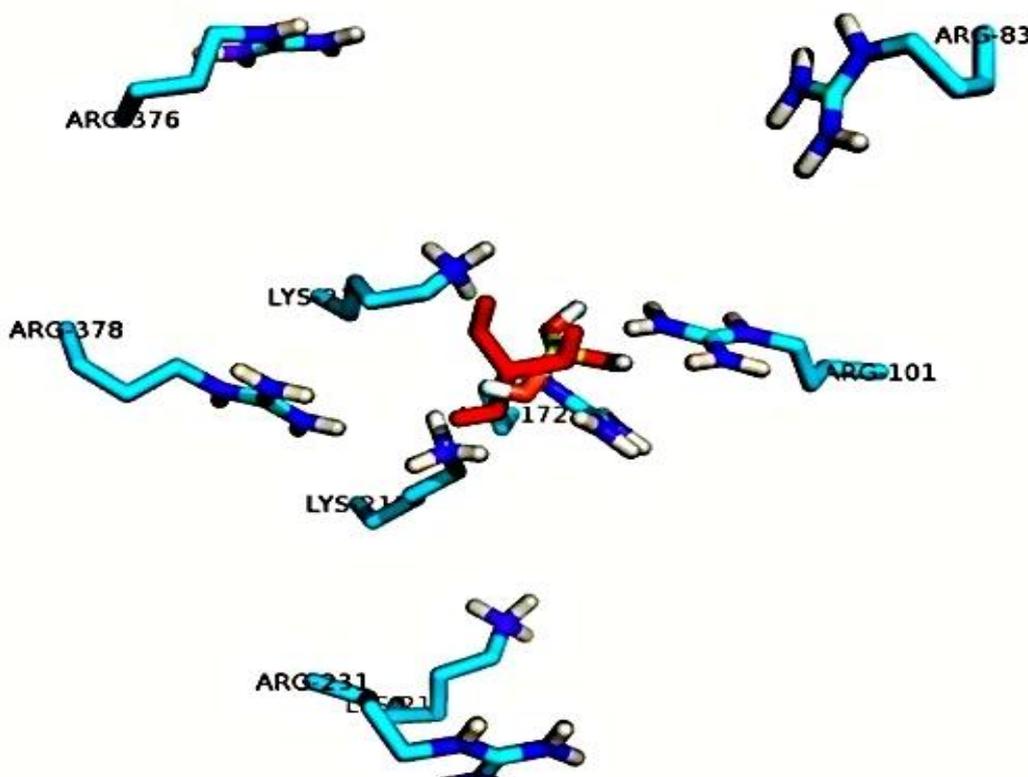


Figura 8: Resíduos que compõem o sitio ativo da SIR. O SO<sub>3</sub> introduzido no sitio ativo é mostrado em vermelho, enquanto a estrutura que representa sua posição cristalográfica é representada em branco, amarelo e laranja.

Fonte: Produção própria

#### 4.2.2 Docagem de Proteína-Ligante

A docagem das substâncias de maior concentração nos óleos essenciais seguiu o seguinte protocolo: 1) Substâncias presentes nos óleos essenciais e as substâncias de controle, foram docadas na proteína na presença do substrato para testar a formação do ESI complexo (enzima-substrato-inibidor); 2) As substâncias também foram ancoradas na ausência de  $\text{SO}_3$  para testar a formação do complexo EI (inibidor enzimático livre), e 3) Foi realizada a docagem do  $\text{SO}_3$  no complexo EI para formar o complexo ESI. Nesta etapa avaliou-se a energia livre de ligação do sulfito com o objetivo de investigar se ele se liga fortemente ao sítio de ligação na presença de ligantes ou não. Para fazer isso, utilizou-se os resultados otimizados geometricamente obtidos na etapa 2 deste protocolo. Em seguida, as soluções obtidas nos procedimentos acima foram classificadas de acordo com sua conformação e colocadas em grupos. Soluções idênticas em conformação e com menor energia de ligação foram visualizadas através do Pymol versão 1.4.1 (DeLano, 2011) para encontrar os melhores modos de ligação, usando como critério a distância em relação ao átomo de Fe do centro reativo do receptor (SRM).

#### 4.3 TESTES PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

Testes em bateladas de laboratório foram utilizados para definir a concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, o valor de cada substância que afeta a atividade das BRS *in vitro*. Células de BRS foram colhidas no final da fase exponencial, ressuspensas em solução tampão de fosfato e 1 ml de inóculo ( $10^{12}$  células) foram transferidas para frascos experimentais, contendo 9 ml de meio de cultura alterado com as diferentes concentrações de biocidas (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5). Os frascos experimentais foram anaerobicamente selados e incubados a 38 °C durante 28 dias (Figura 9). A atividade das BRS foi detectada pela formação de sulfeto de ferro (FeS).

As substâncias testadas foram: surfactante lauril-glicosídeo (LG), óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* (RO), óleo essencial de Tea-Tree (TO), óleo de Neem (NO) e tetrahydro-3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione (Dazomet). O último composto é um biocida comumente utilizado pela indústria de petróleo, pois não interfere com os

reduzores de fricção quando utilizado no reservatório ou no tanque de água de injeção e é extremamente eficaz no controle de bactérias (KAUFMAN et al., 2008). Portanto, este composto também foi adotado como controle experimental durante a discussão dos resultados.

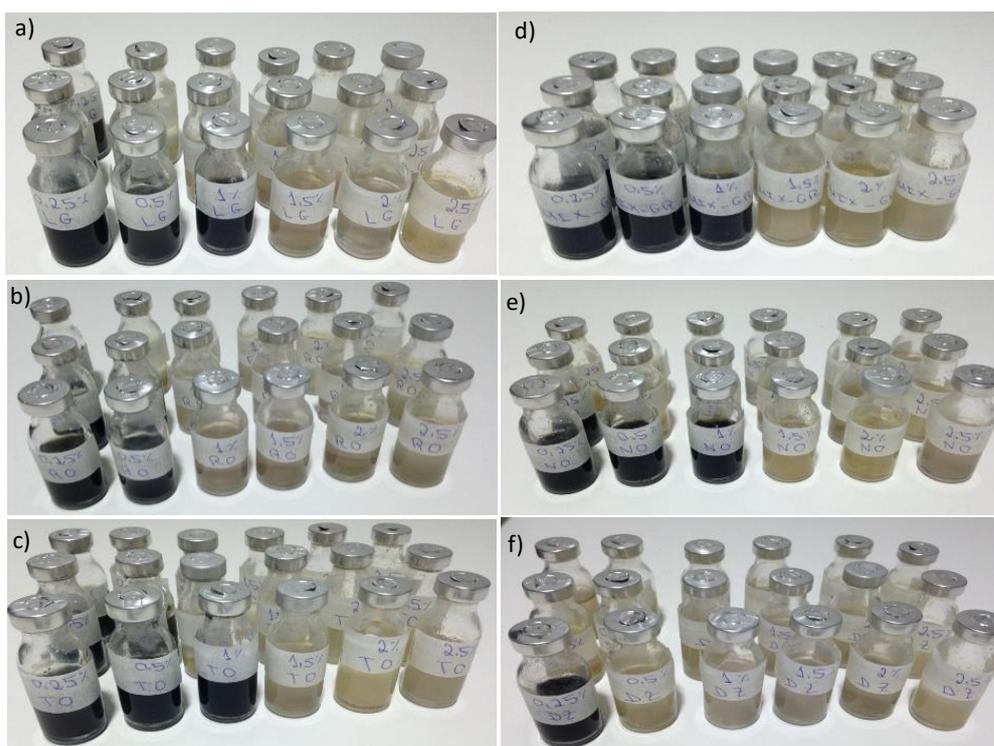


Figura 9: Experimento em triplicata para identificar a concentração mínima inibitória (MIC) cor negra indica crescimento e cor clara não crescimento: a) LG – Lauril-glicosídeo, b) RO – *Rosmarinus officinallis*, c) TO – Tea-tree, d) MIX LG e RO; NO – Neem e f) DZ – Dazomet.

Fonte: Produção própria

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 TESTES DE MODELAGEM MOLECULAR

O fenômeno da biossulfetogênese está associado à transferência de elétrons em reações redox, quando um elétron se move de um doador (d) para um aceptor (a) fluindo em um gradiente de potencial elétrico através de uma cadeia de centros redox que pode ser separada por uma distância relativamente pequena (1-2 nm ou mais) (MARCUS e SUTIN, 1985). Desta forma, pode-se interferir diretamente no processo de transferência de elétrons entre os sítios catalíticos através da introdução de substâncias componentes dos óleos essenciais. A introdução de substâncias com propriedades antioxidantes deve atuar no gradiente de potencial elétrico dos centros redox, aumentando a distância entre eles ou capturar os elétrons durante a transferência. As distâncias entre SRM, SF<sub>4</sub> e sulfito estão resumidas na Tabela 2.

Os resultados obtidos no complexo ESI mostram que a distância cristalográfica entre ferro heme (SRM) e enxofre sulfito no complexo ES (2,68 Å) aumenta para 2,82 Å ao introduzir ácido esteárico, causando o desacoplamento elétrico entre as duas espécies. O mesmo efeito é observado na distância entre o ferro mais próximo do cluster 1 e o ferro heme, que mostra um deslocamento de 0,08 Å em relação ao cristalográfico inicial (4,40 Å). Adicionalmente, mediu-se novas distâncias após a introdução do substrato no complexo EI para formar novo complexo enzima-inibidor-substrato complexo (EIS). Os resultados indicam maiores distâncias do sulfito ao ferro heme (SRM) e do cluster 1 ferro ao ferro SRM, onde os maiores deslocamentos do sulfito foram alcançados na presença do  $\alpha$ -pinene (10.34 Å) e cânfora (10.08 Å). No entanto, as medidas das distâncias entre o ferro do cluster 1 e o ferro heme permaneceram em torno de 4,5 Å. Os dados também sugerem o NO com grande capacidade inibitória em relação aos outros compostos testados.

Tabela 2: Distância relativa de sulfito para Fe de siroheme (SRM) e distância de Fe do cluster 1 para Fe de siroheme (SRM).

Compostos Químicos	Ligantes	Distância (Å)			
		Complexo EIS		Complexo ESI	
		Fe (SRM)-S (SO3)	Fe (cluster1)-Fe (SRM)	Fe (SRM)-S (SO3)	Fe (cluster1)-Fe (SRM)
TO	1,8 cineol	9.94	4.56	2.68	4.12
	$\alpha$ -Terpinene	9.16	4.49	2.89	4.48
	$\gamma$ -Terpinene	9.31	5.01	2.29	4.11
	ÓleoTerpinen-4	9.16	4.57	2.75	4.12
RO	$\alpha$ -pinene	10.34	3.95	2.65	4.40
	1,8 cineol	9.94	4.56	2.68	4.12
	Cânfora	10.08	4.70	2.66	4.10
NO	Ac. Linoleico	5.19	4.43	2.69	4.18
	Ac. Oleico	6.20	4.31	2.67	4.45
	Ac. Esteárico	7.64	4.33	2.82	4.48
	Ac. Palmítico	9.38	4.53	2.59	4.92
Surfactante DZ (Controle)	Lauril	7.91	4.56	2.68	4.40
	Dazomet	9.79	4.45	2.66	3.94

Legenda: (I) inibidor, (E) enzima e (S) substrato. As distâncias foram calculadas através do visualizador VMD versão 1.9.1.

As energias livres (Tabela 3) mostram que as ligações de todas as substâncias à enzima livre, ou seja, sem o substrato, são favoráveis à formação de um complexo EI, com energias que variam de -7,8 kcal / mol (Terpinen-4-ol) a -2,8 kcal / mol (dazomet) e -5,2 kcal / mol (lauril). Então, para analisar a possibilidade de inibição competitiva, não competitiva ou mista, foram avaliadas as energias de ligação do substrato ao complexo enzima-inibidor (S a EI) e do inibidor ao complexo enzima-substrato (I a ES). As energias de ligação do substrato ao EI são positivas para ácido esteárico e ácido palmítico, de modo que essas duas substâncias podem atuar como inibidores competitivos. As outras nove substâncias possuem energias negativas de ligação, de modo que seriam candidatas a inibidores não competitivos. No entanto, as energias de ligação ao ES de sete desses candidatos são positivas, de modo que elas também não realizariam inibição não

competitiva. Os ácidos lauril e linoleico, oleico, esteárico e palmítico permanecem como candidatos a inibidores não competitivos. Tanto o ácido esteárico como o ácido palmítico são os únicos que podem realizar inibição mista. Com relação ao lauril, pode ser um inibidor não competitivo, enquanto o dazomet não apresenta propriedades inibitórias contra a redutase do sulfito.

Tabela 3: Perfil de energia livre vinculado a enzima-ligante, enzima-substrato-complexo inibidor e enzima-inibidor-substrato

Compostos Químicos	Ligantes	Energia de Ligação (Kcal/mol)		
		I para E	I para ES	S para EI
TO	1,8 cineol	-7.1	3.2	-0.6
	$\alpha$ -Terpinene	-7.6	0.2	-1.3
	$\gamma$ -Terpinene	-7.6	0.2	-1.6
	ÓleoTerpinen-4	-7.8	0.7	-1.7
	$\alpha$ -pinene	-6.7	3.5	-1.1
RO	1,8 cineol	-7.1	3.2	-0.6
	Cânfora	-6.7	2.5	-1.5
	Ac. Linoleico	-4.1	-0.1	-4.2
NO	Ac. Oleico	-3.7	-2.8	-0.9
	Ac. Esteárico	-4.1	-1.9	5.3
	Ac. Palmítico	-4.0	-3.1	2.5
Surfactante	Lauril	-5.2	-2.4	-0.9
DZ (Controle)	Dazomet	-2.8	3.6	-1.6

Legenda: (I) inibidor, (E) enzima, (S) substrato.

A Figura 10 mostra o instantâneo dos ligantes ácidos esteárico e palmítico ocupando exatamente a região no sítio de ligação sugerindo sua estabilidade, independentemente da ausência (Figuras 10A1 e 10A2) ou da presença do substrato (Figuras 10B1 e 10B2).

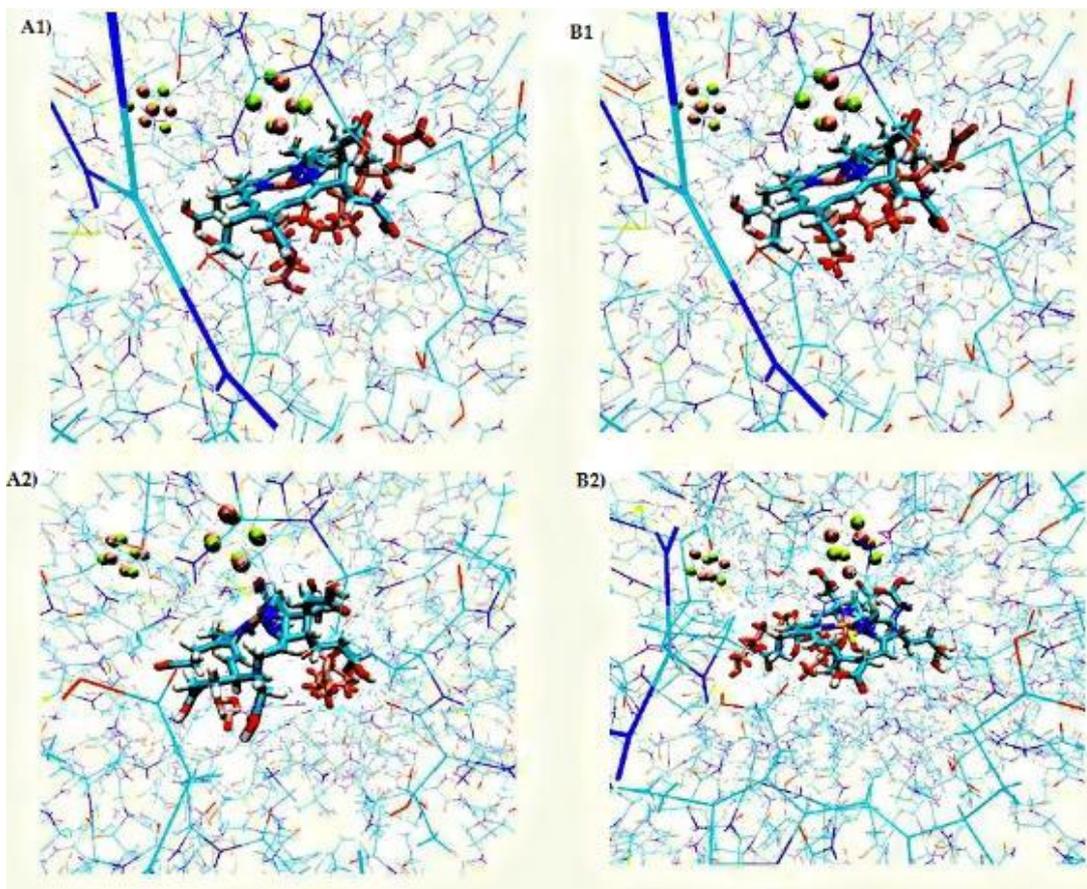


Figura 10: Instantâneo mostrando os inibidores no local de ligação, sendo: A) representação dos inibidores (ácido esteárico e palmítico) na ausência do substrato e B) mostra os mesmos inibidores na presença do substrato. 1) refere-se ao ácido esteárico enquanto 2) o ácido palmítico. Os centros de ferro-enxofre são mostrados na representação de esferas de Vander Waals, enquanto o centro catalítico (sirohemo), inibidores e sulfetos são representados em licorices.

Fonte: Produção própria

No entanto, a presença de substrato (Figura 10B) pode afetar o modo de ligação causando vários efeitos (como efeito estérico) que reduzem a energia livre de ligação. Os dados obtidos na etapa 3 do procedimento de ancoragem também revelam que o íon sulfeto tem energias livres de ligação desfavoráveis, no atendimento do ácido esteárico (5,3 kcal / mol) e ácido palmítico (2,5kcal / mol) nos complexos EIS. Em conjunto com os dados da Tabela 3, estes resultados indicam que o substrato não pode ser posicionado próximo ao ferro sirohemo, porque o ácido palmítico e esteárico o desloca do local de ligação. Além disso, os resultados da Tabela 4 deixam claro que o ácido palmítico e o ácido esteárico são os principais responsáveis pela capacidade inibitória do neem.

Tabela 4: Componentes da energia livre de ligação de cada complexo proteína-ligante na presença e ausência de substrato

	Com substrato				Sem substrato			
	Elétrico	Ponte H	van der Waals	Desolvat	Elétrico	Ponte H	van der Waals	Desolvat
Ligantes								
1,8 cineol	.146	-.017	33.502	2.267	-.058	-.217	-7.507	1.955
$\alpha$ -Terpinene	-.002	.000	-7.124	1.729	-.008	.000	-7.384	1.350
$\gamma$ -Terpinene	.025	.000	-5.773	2.032	.016	.000	-7.414	1.808
ÓleoTerpinen-4	.043	-.558	-5.387	2.103	.046	-.017	-7.891	1.758
$\alpha$ -pinene	.013	.000	5.726	1.645	.036	.000	-6.969	1.387
Cânfora	-.012	.000	18.228	1.687	-.062	.000	-7.337	1.418
Ac. Linoleico	.300	-.563	-10.565	3.275	.036	.000	-6.969	1.387
Ac. Oleico	.062	-.512	-11.628	3.493	.067	-.033	-12.217	3.424
Ac. Estearico	.097	-.543	-11.418	3.618	.200	-.093	-13.536	3.779
Ac. Palmítico	-.006	-.133	-11.388	3.248	.088	-.003	-12.176	3.354
Lauril	.105	-.858	-14.440	5.972	.228	-.012	-13.947	5.087
Dazomet								
(controle)	.013	-.120	-5.646	1.697	-.008	-.002	-5.293	1.275

#### 4.4.2 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC)

Após a modelagem molecular, testes em batelada *in vitro* foram realizados para identificar a concentração inibitória mínima dos agentes químicos. Esses testes se baseiam na exposição das BRS em um sistema estático e, não apenas sem a proteção do biofilme, mas, também, sem a proteção do suporte físico que altera a difusão do agente químico. As técnicas avançadas de recuperação de petróleo podem promover o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que é frequentemente controlado com a injeção de biocidas (GIEG et al., 2011; SHABAN et al., 2013; ERKENBRECHER et al., 2015). Antes de serem utilizados nos reservatórios ou tanques petrolíferos, existe a definição de uma estimativa de concentrações efetivas de biocidas que é rotineiramente baseada em testes de toxicidade (testes em batelada *in vitro*), conhecido como teste de concentração inibitória mínima (MIC). A concentração considerada efetiva é responsável por causar a morte de 5 Log<sub>10</sub> (10<sup>5</sup>) de células em um único tratamento (BUGNO et al., 2006). A tabela 5 mostra os resultados da MIC realizados com cinco biocidas potenciais e o controle proposto, DZ. Os resultados indicam que todos os seis biocidas testados apresentam taxas de morte significativas (>5log) em baixas concentrações (1-1,5% w/v e v/v). No entanto, existem alguns relatos na literatura que indicam que a aplicação de biocida nos reservatórios muitas vezes não alcança os resultados esperados (KJELLERUP et al., 2005; LAVANIA et al., 2011).

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (MIC) valores obtidos por seis testes com biocidas e mistura. Os testes foram conduzidos em culturas anaeróbicas em bateladas *in vitro* incubadas por 28 dias.

Concentrações (%)	LG (w/v)	RO (v/v)	TO (v/v)	MIX-GR (v/v)	NO (v/v)	DZ (Dazomet) (v/v) (controle)
0,25	+++	+++	+++	+++	++	+
0,5	++	++	++	++	+	---
1,0	+	---	+	+	+	---
1,5	---	---	---	---	---	---
2,0	---	---	---	---	---	---
2,5	---	---	---	---	---	---

Legenda: - negativo (sem crescimento de BRS); + fracamente positivo (baixo crescimento de BRS); ++ positivo (médio crescimento de BRS); +++ fortemente positivo (elevado crescimento de BRS).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, testou-se a eficiência de óleos essenciais usando experimentos *in silico* corroborados com testes microbiológicos (*in vitro*). Os resultados mostraram que os óleos essenciais de Neem, Tea-tree e *Rosmarinus officianalis* foram efetivos na inibição da enzima SIR, mesmo na presença de substrato (sulfito). No entanto, não é possível prever os resultados para outras enzimas envolvidos com a produção de sulfeto, embora ensaios laboratoriais tenham mostrado bons resultados para um consórcio com várias representantes de BRS do reservatório estudado (Campo Dom João). Pois, na modelagem foi utilizada apenas uma enzima sulfito redutase (SIR) como alvo, apesar da existência de outras enzimas no ambiente natural. Por tratar-se de um consórcio de BRS, existem diversas espécies dessas bactérias no meio.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BØDTKER, G., THORSTENSON, T., LILLEBØ, B. L., THORBJØRNSSEN, B. E., ULVØEN, R. H., SUNDE, E., & TORSVIK, T. 2008. The effect of long-term nitrate treatment on SRB activity, corrosion rate and bacterial community composition in offshore water injection systems. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 12, 1625-36.
- BORDOLI, L., KIEFER, F., ARNOLD, K., BENKERT, P., BATTEY, J., & SCHWEDE, T. 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4, 1-13.
- BREDA, A. BASSO, L. A.; SANTOS, D. S., & AZEVEDO JUNIOR, W. F. 2008. Virtual screening of drugs: score functions, docking, and drug design. *Current Computer - Aided Drug Design*, 4, 265-272.
- BUGNO, A.N. et al. 2006. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *R. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, v.65, n.1, p.40-45.
- DAVIDOVA, I., HICKS, M.S., FEDORAK, P.M., & SUFLITA, J.M. 2001. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 2, 80-86.
- DELANO, W. L. (2011). The PyMOL molecular graphics system (Version 1.4.1). San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC.
- DOS SANTOS, ELIAS S., GRITTA, DERMEVAL. S., TAFT, CARLTON A., ALMEIDA, P. F., RAMOS-DE-SOUZA, ELIAS. 2010. Molecular dynamics simulation of the adenylylsulphate reductase from hyperthermophilic *Archaeoglobus*. *Molecular Simulation (Print)*, v. 36, p. 199-203.
- ERKENBRECHER, C. W., NURNBERG, S., AND BREYLA, A. D. 2015. A Comparison of Three Nonoxidizing Biocides and Chlorine Dioxide in Treating Marcellus Shale Production Waters. *SPE Prod & Oper* 30 (4): 1–7. SPE-174560-PA. <https://doi.org/10.2118/174560-PA>.
- GIEG L. M., JACK, T. R., & FOGHT, J. M. 2011. Biological *souring* and mitigation in oil reservoirs. *Apply Microbiology Biotechnology*, 92, 263-82.
- HALGREN, T. A. 1999. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *Journal of Computational Chemistry*, 20, 720-729.

JAGHOORI, M. M., BLEIJLEVENS, B., & OLABARRIAGA, S. D. 2016. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 30, 237-249.

KHATIB, Z. I., SALANITRO, J. P. 1997. Reservoir *souring*: analysis of surveys and experience in sour waterfloods, in SPE 38795. *SPE Annual Technical Conference and Exhibition (San Antonio, TX: Society of Petroleum Engineers)*, 449–459.

KAUFMAN, P. B., PENNY, G. S., AND PAKTINAT, J. 2008. Critical Evaluation of Additives Used in Shale Slickwater Fracs. Presented at the SPE Shale Gas Production Conference, Fort Worth, Texas, 16–18 November. SPE-119900-MS. <https://doi.org/10.2118/119900-MS>.

KJELLERUP, B. V., VEEH, R. H., SUMITHRARATNE, P. et al. 2005. Monitoring of Microbial Sourcing in Chemically Treated, Produced-Water Biofilm Systems Using Molecular Techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (4): 163–170. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0222-5>.

LIMA, W. E. A., PEREIRA, A. F., CASTRO, A. A., CUNHA, E. F. F., & RAMALHO, T. C. 2016. Probing Representative Conformations by Chemometric Techniques and Docking/QM Calculations. *Letter in Drug Design Discovery*, 13, 360-371.

MARCUS, R. A., & SUTIN, N. 1985. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica Biophysica Acta*, 811, 265–322.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSELL, D. S., & OLSON, A. J. 2009. Autodock4 and autodockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785–2791.

SHABAN, S. M., SAIED, A., TOWFIT, S. M. et al. 2013. Corrosion inhibition and biocidal effect of some cationic surfactants based on schiff base. *J. Ind. Eng. Chem.* 19 (6): 2004– 2009. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2013.03.013>.

SANDANASAMY, J. D/O., HAMID NOUR, A., BIN TAJUDDIN, S. N., & HAMID NOUR, A. 2013. Fatty Acid Composition and Antibacterial Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Oil. *The Open Conference Proceedings Journal*, 2013, 4, (Suppl-2, M11) 43-48.

SUMMER, E. J., SUMMER, N. S., JANES, C., LIU, M., GILL, J. J., & YOUNG, R. 2011. Phage of sulfate reducing bacteria isolated from high saline environment, in Paper 11222, Corrosion. NACE Conference and Expo (Houston, TX: NACE International).

## Capítulo 5

### MONTAGEM DO BIORREATOR

#### Resumo

Este capítulo refere-se à segunda etapa desta pesquisa evidenciando uma sequência de tarefas realizadas no biorreator biológico de leito fixo (manutenção, melhorias, esterilização, etc.) para torná-lo apto para uso. Ademais, mostra detalhes sobre alguns critérios de segurança de processo e pessoas utilizados na execução dos serviços. Em seguida é apresentada a análise dos resultados.

Palavras Chaves: Biorreator, Montagem, Melhorias

#### 5.1 INTRODUÇÃO

Diversas configurações de biorreatores são utilizadas para estudo de reações anaeróbicas, como a transformação biológica de sulfato à sulfeto por BRS. Além de filtro anaeróbico, os principais tipos de reatores são: em batelada, de leito empacotado, de lodo anaeróbico e fluxo ascendente, de leito fluidizado e híbrido (CHEN et al., 1994; DE JESUS, 2015). Os biorreatores de leito empacotados e fluxo ascendente são utilizados com frequência na indústria microbiológica, devido área superficial disponível para a adesão e imobilização de microrganismos. O tempo de residência da solução nestes biorreatores pode interferir no seu desempenho, devido a adesão do biofilme ao meio poroso e a resistência à transferência de massa líquido-biofilme (BERNARDEZ et al., 2012; DE JESUS, 2015).

A depender da espécie de microrganismo e seus produtos, os biorreatores podem ser feitos de materiais compósitos e poliméricos também, porém, os materiais mais utilizados são ligas metálicas, especialmente aços. O aço carbono é utilizado, porém não é recomendado para uso em meios agressivos como os de biorreatores para BRS, pois, a presença de substâncias corrosivas como o gás sulfídrico provavelmente reduzirá a vida útil do biorreator. Os aços inoxidáveis são os mais indicados devido a adição de altos teores de cromo e níquel na liga ferro-carbono, pois apresentam adequado desempenho mecânico e elevada resistência à corrosão (VIDELA et al., 1992; BERNARDEZ *et al.*, 2012; DE JESUS, 2015).

## **5.2 MATÉRIAS E MÉTODOS**

### **5.2.1 Estrutura do Biorreator**

O biorreator utilizado neste estudo é um dispositivo de forma cilíndrica de 3,6 litros preenchido com pérolas de vidro de diâmetro irregulares (1-3 mm) que são utilizadas como suporte para o crescimento microbiano (Figura 11). O volume de trabalho é 1,4 litros, a base do biorreator foi o ponto de injeção do afluente, e o efluente coletado no topo. A Figura 11 mostra que o biorreator dispõe de 4 pontos laterais para amostragem em perfil. Uma bomba peristáltica proporcionou a entrada do afluente no sistema a uma vazão de 8 ml/min durante a fase de alimentação (cerca de 20 min). O biorreator possui um sistema de coleta de gás controlado por pressão (2,5 kgf cm<sup>2</sup>). A temperatura (38 ± 2 °C) foi ajustada por um sistema de controle PID (controle proporcional, integral e derivativo). O biorreator possui leito empacotado por material isolante envolvido por uma resistência elétrica (800 W). O material de construção do biorreator é o aço inoxidável super duplex UMS S32750 (SAF 2507, Sandvik Steel) que é resistente a presença de H<sub>2</sub>S ou corrosivos semelhantes (BERNARDEZ *et al.*, 2007).

### 5.3 AVALIAR O FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR - REPAROS, MANUTENÇÃO NO SISTEMA E EQUIPAMENTOS ACESSÓRIOS

Após a realização do check-list para avaliar a funcionalidade de todo o sistema eletroeletrônico e mecânico do biorreator. Executou-se testes em toda parte instrumental e operacional para verificar a integridade de todos os componentes. Houve a necessidade de intervenções de manutenção corretiva em todos os itens avaliados, e melhorias em alguns itens para elevar a funcionalidade e eficiência do biorreator. O desenho esquemático e algumas etapas de montagem e testes executadas no biorreator são apresentadas (Figura 11).

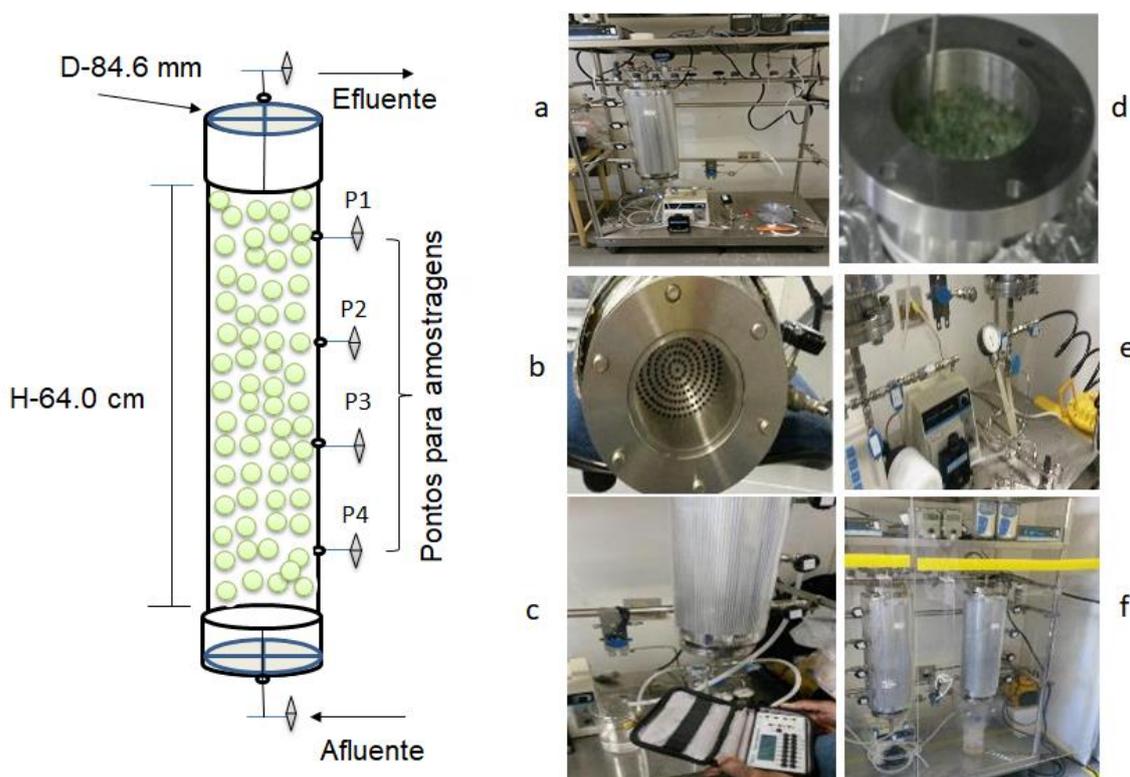


Figura 11: Desenho esquemático mostrando as etapas de montagem e testes no biorreator. (a) retirada do biorreator do suporte de fixação para manutenção; (b) conjunto difusor e tela de proteção; (c) calibração dos instrumentos indicadores de pressão (manômetros); (d) célula do biorreator com meio poroso preenchido por pérolas de vidros de diâmetro irregular que servem de suporte físico para a formação de biofilme de BRS; (e) teste de estanqueidade no reator através da injeção de ar comprimido produzido por um compressor de ar de pequeno porte; (f) biorreator instalado e liberado par uso.

Fonte: Produção própria

## **5.4 IMPLANTAÇÃO DE PONTOS DE MELHORIAS**

### **5.4.1 Instalação de Tela de Aço Inoxidável**

O reator com 84,6 mm diâmetro interno sofre redução na parte inferior (injeção via fluxo ascendente), devido a inserção de um difusor com diâmetro externo de 5 mm e comprimento de 55 cm. Junto é inserido a 1ª tela confeccionada em aço inoxidável e com diâmetro de 2 mm com formato dos furos gerando posição de apoio para o assentamento do meio poroso, facilitando a obstrução dos canais de acesso do fluido ao reator. Para corrigir este problema fez-se necessário a instalação de um mecanismo que dificultasse o assentamento das perla de vidro na 1ª tela. Então, uma 2ª tela confeccionada em material semelhante a 1ª foi adicionada a entrada do difusor formando um conjunto que foi encaixado no reator (Figuras 11 b, 12). Por ser um sistema desprovido de agitação que favorece a homogeneização do meio de cultura e a distribuição dos microrganismos nas zonas do reator, o difusor acrescenta um gradiente de pressão ao impulsionar o fluido durante o deslocamento do meio de produção no biorreator, melhorando assim a distribuição do substrato no ambiente e provável redução das áreas de estagnação (zonas mortas) etc. No entanto, observou-se que um item (1ª tela) deste dispositivo provoca a obstrução dos canais de acesso ao sistema através do meio poroso, que por ser composto por perlas de vidro de granulometria não uniforme fixam-se no leito do reator e dificulta a passagem do fluido. A figura 12, apresenta o desenho esquemático do processo de melhoria instalado no biorreator.

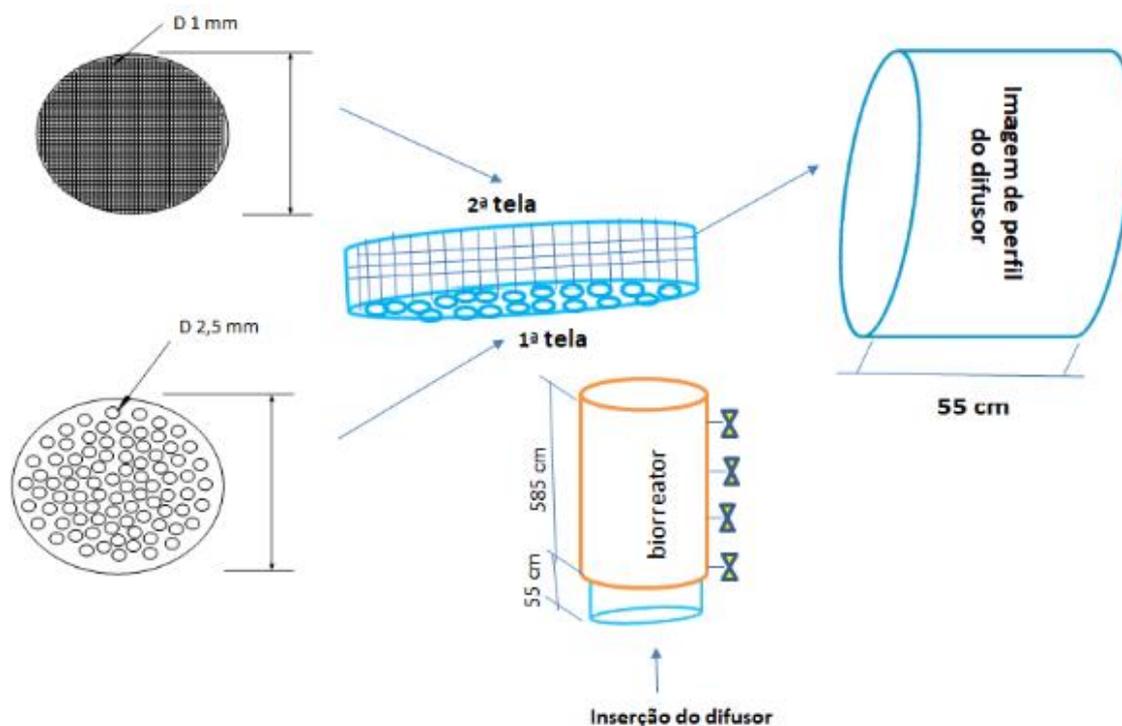


Figura 12: Desenho esquemático do sistema que apresenta a inserção da segunda tela no difusor para evitar a obstrução dos canais de deslocamento do fluido no biorreator. A primeira tela instalada no difusor é formada por uma placa de aço inoxidável com perfurações de diâmetro similares ao meio poroso, facilitando o encaixe destes na placa e a obstrução da injeção do fluido. A segunda tela tem diâmetro de 1 mm, é menor que o meio poroso e evita a obstrução para injeção do fluido.

Fonte: Produção própria

## 5.5 SEGURANÇA DE PROCESSO E PESSOAS ENVOLVIDAS NA OPERAÇÃO DO SISTEMA

Para garantir a integridade do sistema e a segurança das pessoas no ambiente de trabalho, alguns testes foram realizados no reator antes da operação. Testou-se a estanqueidade do reator através da injeção de ar comprimido produzido por um compressor de pequeno porte conforme mostra (Figura 11e) e uso de espumas de sabão (Figura 13). O objetivo desses testes foi observar a possibilidade de emissões fugitivas do ar, ou seja, eliminar possíveis vazamentos no reator. Outros testes também foram realizados, como a calibração dos instrumentos indicadores de pressão. Através destes

testes observou-se que alguns manômetros estavam avariados e/ou danificados, e em alguns casos foi necessário a aquisição de novos equipamentos.



Figura 13: Teste com injeção de ar comprimido em todas as conexões e pontos de acesso ao biorreator, e uso de espumas de sabão para identificar possíveis vazamentos.

Fonte: Produção própria

Outro item também avaliado, foi o estudo da perda de carga em todos ramais de acesso e amostragem do biorreator. A figura 14 mostra o teste da perda de carga no biorreator, utilizando-se a injeção de ar comprimido com vazão inicial de 2 ml/minutos. Observa-se que a pressão vai diminuindo gradativamente nos pontos de amostras a medida que o fluido é deslocado, devido ao provável atrito do fluido entre si e com as paredes internas do sistema. No biorreator, quanto maior a distância do ponto de injeção do fluido, maior será a perda de carga (Figura 14).

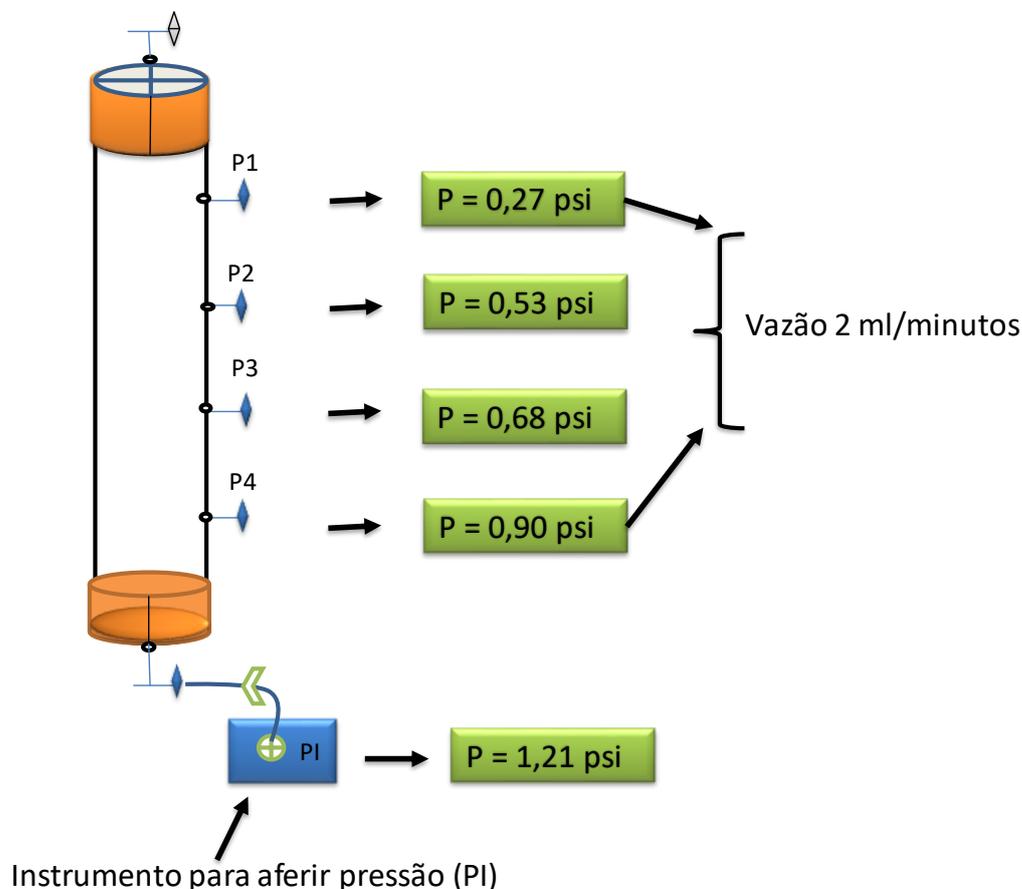


Figura 14: Avaliação da perda de carga no biorreator

Fonte: Produção própria

Além de garantir a integridade dos equipamentos e a operação com segurança na partida de qualquer sistema, torna-se necessário o conhecimento das normas técnicas pertinentes a cada categoria de operação e risco envolvido com o manuseio dos equipamentos e produtos. Neste trabalho, avaliou-se as atividades para que todo o experimento seguisse um rigoroso procedimento de segurança para evitar falhas e acidentes. Na exposição e manuseio de soluções com sulfeto (retirada de amostras do reator, troca de meio e etc.), os executantes participaram de treinamento e foram orientados a utilizar os equipamentos de segurança individual (EPI's), como mostra a figura 15.



Figura 15: Uso de equipamentos de segurança - EPI's  
Fonte: Produção própria

## 5.6 ESTERILIZAÇÃO DO BIORREATOR

A esterilização implica na destruição, inativação ou remoção de toda forma de vida microbiana e provoca nos microrganismos a perda irreversível da capacidade de reprodução no ambiente considerado. Não implica, entretanto, a inativação total das enzimas celulares, toxinas, etc. (BORZANI et al., 2001; SCHMIDELL, et al., 2001; LIMA, et al., 2001). A tabela 6 cita alguns métodos de esterilização. Outro item a observar durante a esterilização de alguns equipamentos, refere-se a limpeza da superfície destes, algumas vezes, difícil de ser conseguida, pois, películas muito finas, podem fixar-se e proteger microrganismos e esporos, principalmente em relação a materiais porosos, como é o caso do sistema em estudo (biorreator com meio poroso). Em equipamentos industriais, guarnições usadas na vedação de flanges, válvulas, etc., também podem se tornar reservatórios de microrganismos (CHAIGNEAU, 1977; BORZANI et al., 2001; OKAFOR, 2007).

Tabela 6: Métodos de Esterilização

Agentes físicos	Agentes químicos
Calor	Líquidos
Seco: flambagem, ar quente	Gases e vapores
Úmido: vapor fluente, vapor sob pressão	
Radiações	
Ultravioleta e ionizantes	

Fonte: Borzani (1929)

Nesta pesquisa o método utilizado para esterilização do biorreator foi a injeção de vapor seco (10 % de umidade) a 121 °C. Para validar a eficiência do método, elegeu-se o indicador biológico para demonstrar a eficiência da esterilização, conforme apresentado no item 5.4.1. A figura 16 mostra detalhes da esterilização, a qual utiliza-se uma unidade de autoclave com potência elétrica de 3 kW para gerar vapor, e injetar no biorreator através da conexão com uma mangueira de alta resistência capaz de suportar até 5 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão e temperatura de até 300 °C. Colocou-se a água conforme volume apropriado no vaso da autoclave, de acordo com o fabricante, para obter o vapor com 10% de umidade. Em seguida, ligou-se a autoclave, abriu-se a válvula de purga para extração do ar, após essa operação fechou-se a mesma, em 30 minutos a temperatura atingiu 121 °C iniciando a liberação de vapor e injeção no reator, quando todas as válvulas do sistema foram fechadas para evitar a perda térmica de calor e geração de condensado no meio. A injeção de vapor foi mantida até atingir a temperatura de 125 °C no reator e pressão de 1 atm. Devido ao meio poroso (alta resistência do gradiente de pressão), houve a necessidade de purga no sistema para retirada de condensado de vapor, mas após 1 hora ocorreu a estabilidade do processo sem condensado.



Figura 16: Desenho esquemático da esterilização do biorreator com vapor. Utilizado uma unidade de autoclave com potência elétrica de 3 kW para gerar vapor, e abastecer o biorreator através da conexão com uma mangueira de alta resistência capaz de suportar até 5 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão e temperatura de até 300 °C.

Fonte: Produção própria

### 5.6.1 Parâmetros Utilizados para Avaliar a Esterilização do Biorreator

Para verificar a eficiência da esterilização no reator, utilizou-se de dois parâmetros de controle:

#### ❖ Monitoramento Físico da Unidade Geradora de Vapor (autoclave)

A monitoração física foi realizada na autoclave antes da operação desta, e consiste em verificar se o equipamento atinge os parâmetros físicos de tempo, temperatura e pressão de acordo com o ciclo, modelo e o manual de instruções, já que a autoclave foi utilizada como fonte de geração de vapor para esterilizar o reator (Figura 16).

### ❖ Monitoramento Biológico

Utilizou-se indicadores biológicos para demonstrar a esterilização. Indicadores biológicos são testes que vem em tubos plásticos com tampa permeável ao vapor, com uma fita impregnada com uma população conhecida de esporos, separada do meio nutriente (líquido roxo), por uma ampola de vidro. Os esporos utilizados são de *Geobacillus stearothermophilus*, em concentração de  $10^6$  esporos, altamente resistentes ao calor e não são patogênicos. Utilizou-se dois indicadores Clean-Test produzidos pela SSPLUS, sendo um controle e outro teste (Figura 17). Após os testes os indicadores foram incubados a 56 °C por 24 h, a cor da ampola teste permaneceu roxa, e a cor da ampola controle amarela. Isto indica que na ampola teste os microrganismos foram incapazes de se reproduzir e utilizar a glicose mantendo a cor do indicador inalterada (roxo), enquanto que na ampola controle foram capazes de se reproduzir, e alterar a cor do indicador de roxo para amarelo. Assim, os resultados indicam que a esterilização foi efetiva (Figura 17).



Figura 17: Indicador biológico para avaliar a efetividade da esterilização do reator  
Fonte: Acervo da autora

### 5.6.2 Métodos para avaliar a eficiência dos parâmetros utilizados na esterilização do biorreator

Para avaliar a eficiência dos métodos de esterilização do biorreator (item 5.6.1), utilizou-se dois dispositivos para validar a funcionalidade dos métodos utilizados. A primeira opção foi a montagem de um meio poroso em um ambiente hermeticamente fechado para mimetizar o reator, com bocais de alimentação e capacidade de locação do indicador biológico (1ª inovação).

❖ **1ª Inovação: Uso de frasco de vidro tipo “shot” (dispositivo para alocação do indicador biológico)**

Introduziu-se no *shot* uma determinada quantidade de pérolas de vidro (Figura 18), e em seguida confinou-se o indicador biológico no meio. Na tampa instalou-se um ramal através de uma mangueira resistente a alta temperatura para passagem de fluidos (gás ou líquido), a depender do método de esterilização a ser utilizado. Ao redor da mangueira aplicou-se silicone para selagem e garantia de um ambiente hermeticamente fechado. Em seguida o dispositivo foi acoplado no sistema e alimentado com o fluido do reator (vapor d'água), (Figura 18). O dispositivo foi instalado na seção do reator que apresenta maior resistência ao deslocamento de fluido (Ponto de amostragem P1).



Figura 18: Dispositivo tipo *shot* para abrigar o indicador biológico

Fonte: Produção própria

❖ **2ª Inovação: Suporte tipo cápsula para abrigar o indicador biológico**

A segunda opção foi o desenvolvimento de um suporte com material resistente tanto a corrosão como a alta temperatura, com capacidade para abrigar o indicador biológico e atrelado aos conceitos (segurança de processo e funcionalidade), ou seja, possibilidade de conexão no reator e facilidade de acesso operacional. A figura 19 apresenta o dispositivo instalado no reator.



Figura 19: Suporte tipo cápsula para abrigar o indicador biológico. O suporte foi instalado no ponto de amostragem com maior resistência ao deslocamento de fluido (P1).

Fonte: Produção própria

## 5.7 ANÁLISES DOS RESULTADOS

### 5.7.1 Análise dos resultados de esterilização no biorreator

O método de esterilização no reator utilizando vapor sob pressão foi eficiente, e atendeu requisitos ambientais em relação a não poluir, ausência de resíduos e segurança no manuseio. No entanto, deve-se ter atenção no manuseio com a autoclave e acessórios de conexão com o sistema quando for utilizar equipamentos de grande porte que não cabem na autoclave, como o biorreator utilizado nesta pesquisa. Neste experimento utilizou-se mangueiras certificadas com padrão indicado para atender temperatura e pressão, e seguiu-se todos os procedimentos de segurança com o processo e as pessoas envolvidas no experimento. O método oferece maior eficiência, estabilidade e segurança no manuseio. Autores como Schmidell et al. (2001) e Lima (2001) sugerem a utilização de vapor como o melhor método para esterilização de alguns equipamentos. Não sendo possível a esterilização com vapor e, havendo limitações quanto à temperatura, utilizam-

se agentes químicos, líquidos ou gasosos, de acordo com as circunstâncias (BORZANI et al., 2001; OKAFOR, 2007).

Quanto a eficiência dos métodos utilizados na avaliação da esterilização do biorreator, ambos os dispositivos foram aprovados nos experimentos. A cápsula do indicador coube no compartimento do *shot* (dispositivo 1) e ficou confinada no meio poroso, e as conexões ao reator para alimentação com vapor funcionou muito bem, e sem vazamento. O suporte (dispositivo 2) também funcionou sem anormalidade, porém houve uma oportunidade de melhoria referente ao material de fabricação. Esta oportunidade já foi descrita em uma patente que está em fase de avaliação. Os testes utilizando os dois dispositivos, tanto o vaso tipo *shot* quanto o suporte para abrigar o indicador biológico foram conectados ao reator durante a injeção de vapor úmido, e em ambos os dispositivos houve a efetividade dos métodos, ou seja, a cápsula com o indicador controle mudou a cor para amarelo e a cápsula com o indicador teste manteve sua cor original (lilás), indicando um ciclo de esterilização eficiente (Figura 17).

Após aferida a esterilização, o biorreator foi liberado à terceira fase: Análise do comportamento hidrodinâmico e avaliação operacional (*start-up*, equilíbrio dinâmico e perturbações com os biocidas).

## 5.8 CONCLUSÃO

A maioria dos biorreatores utilizados para investigação da cinética e controle das BRS é construída em PVC ou vidro boro-silicato e operado sob condições diferentes de campo (*in situ*). Entretanto, unidades experimentais em escala piloto, construído com material resistente ao *souring*, visando uma descrição mais próxima da realidade da indústria, são necessárias. O biorreator utilizado nesta pesquisa atende aos critérios de materiais resistentes as substâncias corrosivas, porém melhorias e ajustes foram necessários para torná-lo apto ao uso. Alguns testes de inspeção, reparo, melhorias, substituição em instrumentos de medições e controles também foram realizados.

## 5.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDEZ, L. A.; DE ANDRADE LIMA, L. R. P. ; ALMEIDA, P. F. Assessing Corrosion of Stainless Steels Exposed to Seawater Containing Sulfate-Reducing Bacteria. In: Intercorr 2008, 28º Congresso Brasileiro de Corrosão / 2nd International Corrosion Meeting, 2007, Recife. 28. v. 1. p. 0-00.

BERNARDEZ, L. A., DE ANDRADE LIMA, L. R. P., RAMOS, C. L., ALMEIDA, P. F. 2012. A kinetic analysis of microbial sulfate reduction in an upflow packed-bed anaerobic bioreactor. *Mine Water and the Environment*, v. 26, n. 3, p. 62 – 68.

BORZANI, W. Cinética de processos fermentativos. In: Borzani, W., Lima, U.A., Aquarone, E., Schmidell, W., 2001. *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*, São Paulo, Edgard Blucher / Universidade de São Paulo. Vol.2. Cap. 6, p.93-121

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial*, Volume 1, Fundamentos, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 254 p.

CHAIGNEAU, M. 1977. *Sterilisation et Desinfection par les Gaz*. Maisonneuve Editeur, Saint-Ruffine. 329 p.

CHEN, C. I.; MUELLER, R. F.; GRIEBE, T. 1994. Kinetic analysis of microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in an upflow porous media biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 267 – 274.

DE JESUS, ERISVALDO BITENCOURT. 2015. *Redução Microbiológica de Sulfato: Cinética, Inibição com Molibdato e Simulação de Estratégias de Controle*. Tese (Doutorado em Energia e Ambiente) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia. Salvador.

OKAFOR, N. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Einfield (NH), EUA, 2007, 551 p. il.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*, Volume 3, Fundamentos, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 593 p. il.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*, Volume 2, Engenharia Bioquímica, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 541 p. il.

## Capítulo 6

### TESTES HIDRODINÂMICOS NO BIORREATOR

#### Resumo

Alguns reatores não conseguem ser avaliados apenas com modelos ideais, pois o escoamento do fluido apresenta perfil não ideal, sendo necessário o conhecimento de alguns fatores (cinética de reação, tempo de residência do fluido no reator - DTR, existência de antecipação ou retardo de mistura, etc.) para estudar o comportamento hidrodinâmico destes. O objetivo principal deste capítulo foi avaliar o comportamento da hidrodinâmica de um biorreator de leito fixo, a partir de três diferentes vazões (3, 9 e 15 mL/min), utilizando os modelos teóricos de dispersão axial de pequena intensidade (PD), grande intensidade (GD) e tanque de mistura completa em série (N-CSTR). Realizou-se ensaios hidrodinâmicos através de testes estímulo-resposta tipo pulso utilizando como traçador uma solução de hipoclorito de sódio, para determinar o comportamento hidrodinâmico através do perfil de escoamento e verificar possíveis desvios no biorreator. Os resultados encontrados evidenciaram a tendência ao modelo de escoamento pistonado com dispersão ( $D/uL$ ) maior 0,01.

Palavras chaves: Reator de Leito Fixo, Tempo de Residência, Modelagem, Perfil Hidrodinâmico

## 6.1 INTRODUÇÃO

A literatura apresenta diversos trabalhos de autores (Schmidell e Facciotti, 2001; Rodrigues, 2015; Bernardez et al., 2012; De Jesus, 2015) que destacam a importância do estudo da hidrodinâmica para avaliação do desempenho dos reatores biológicos, principalmente para otimização de sua geometria. Segundo Levenspiel (2000), o conhecimento do comportamento hidrodinâmico dos reatores contribui para o aumento da eficiência destes, mostrando dados que facilitam a otimização de equações de desempenho e modelos mais realísticos. De Nardi, Zaiat e Foresti (1997) relatam a importância de estudos sobre os mecanismos hidráulicos em reatores biológicos que permitam identificar problemas relacionados as falhas operacionais e de projeto, e com isso desenvolver modelos matemáticos para caracterizar o escoamento, comparar diferentes configurações de reatores e diferentes matrizes de imobilização de biomassa.

Para caracterizar a natureza do escoamento no reator é necessário conhecer o tempo que cada parte de fluido permanece dentro do sistema. Esta informação corresponde ao tempo de residência (DTR) do fluido em escoamento e pode ser obtida através do método experimental estímulo-resposta com o uso de um traçador. Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada para o desenvolvimento de modelos realísticos para descrever reatores complexos. A DTR de reatores descreve seu padrão de fluxo e suas propriedades de mistura e pode ser usada em conjunto com modelos cinéticos para a simulação precisa dos processos através de modelos matemáticos (LEVENSPIEL, 2000). As características hidráulicas também devem ser investigadas para detectar as condições de escoamento em reatores não ideais. Essas características são avaliadas com base nas curvas de DTR experimentais comparando-as com as curvas de DTR teóricas e assim, detectando-se os desvios de idealidade (SASSAKI, 2005; SARATHAI et al., 2010). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo principal a utilização de dois modelos matemáticos (modelo da dispersão axial e o modelo de N-tanques em série) para modelar as curvas experimentais da DTR, comparar os modelos entre si e obter os parâmetros necessários para avaliar o comportamento hidrodinâmico do biorreator.

## 6.2 MATERIAIS E METODOS

O diagrama da figura 20 apresenta a metodologia utilizada neste capítulo.

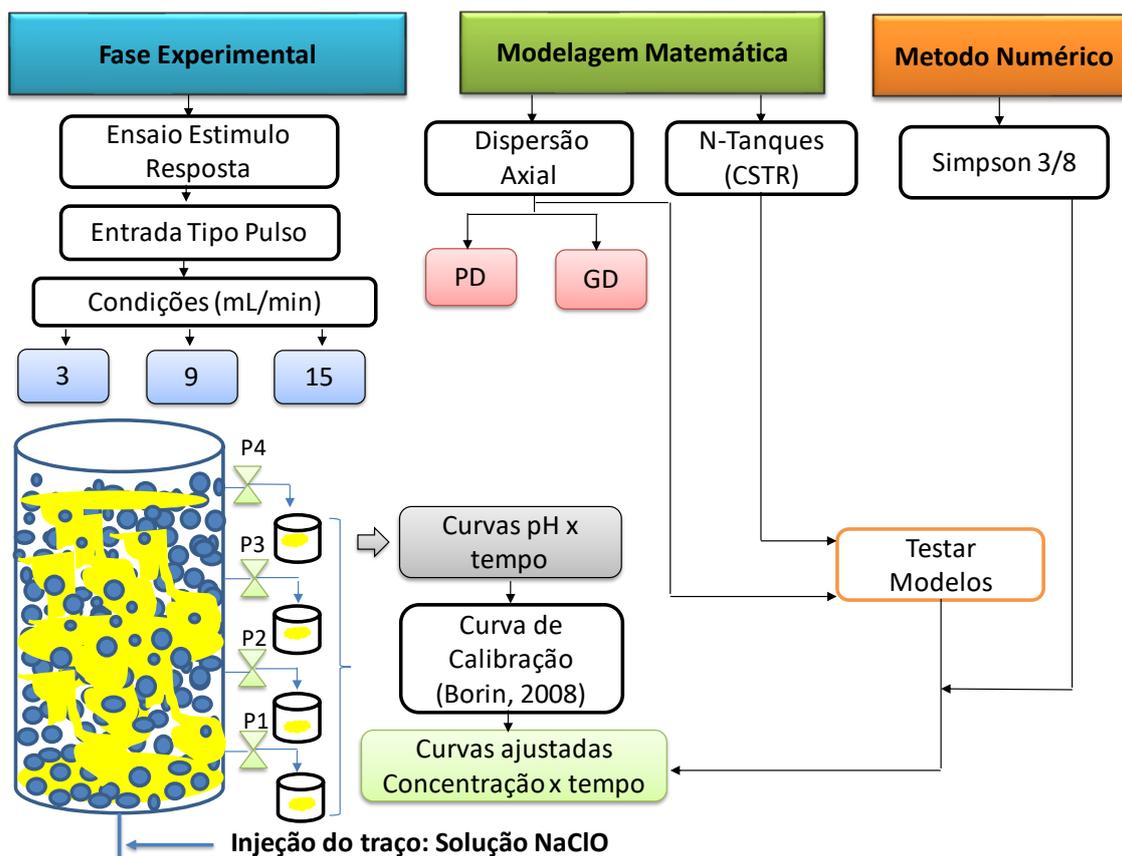


Figura 20: Diagrama metodológico para os testes hidrodinâmicos no biorreator. Fase experimental: Injeção no biorreator da solução traço tipo pulso num curto intervalo de tempo (10 s); utilizou-se três condições diferentes de vazão (3, 9 e 15 ml/min); coleta nos pontos de amostragem num intervalo de 15 minutos; determinação das curvas de pH versus tempo e utilização da curva de calibração adaptada (Borin, 2008) para gerar as curvas de pH versus concentração. Modelagem matemática: Testes com os modelos de dispersão e CSTR. Método numérico: Simpson 3/8 nas integrações numéricas e comparação com as curvas dos modelos.

Fonte: Produção própria

### 6.2.1 Ensaios Hidrodinâmicos

A metodologia foi dividida em três fases: experimental, modelagem matemática e método numérico. A primeira fase foi a realização de ensaios experimentais (ensaios estímulo resposta). A segunda fase, foi o processo de modelagem que inicia com a conversão dos valores de pH coletados para concentração, até a obtenção dos parâmetros de tempo médio de residência ( $\tau$ ), número de dispersão ( $D/uL$ ). A terceira fase, foi a utilização do método numérico Simpson 3/8 na integração numérica e posterior comparação entre o resultado dos modelos e o método.

#### 6.2.1.1 Ensaios estímulo-resposta

Nesta pesquisa, utilizou-se a técnica experimental de estímulo-resposta, que consiste em injetar um traçador inerte na entrada do reator e coletar amostras do efluente em intervalos de tempo determinados para verificar as interferências no escoamento (Levenspiel, 2000). Na literatura existem alguns trabalhos utilizando o traçador eosina Y em ensaios para determinação das curvas de distribuição do tempo de detenção hidráulica de reatores biológicos no tratamento de águas residuárias (DE NARDI et al, 1999; PASSIG, 1999; CARVALHO, 2008; SALGADO, 2008). Neste trabalho, foi utilizado o hipoclorito de sódio como traçador. Foram realizados três ensaios hidrodinâmicos com vazões distintas (3, 9 e 15 mL/min). As coletas foram efetuadas através dos quatro pontos de amostragem (P1, P2, P3 e P4) do biorreator, com intervalos de 15 minutos cada série. No entanto, para à modelagem matemática utilizou-se apenas um ponto de saída (P1). Para facilitar a retirada das quatro alíquotas no mesmo intervalo de tempo, desenvolveu-se um dispositivo móvel tipo aparador, confeccionado em material maleável e resistente para apoiar os vasos coletores na posição dos pontos de amostragem, garantindo assim o mesmo tempo de coleta entre os pontos (sincronismo).

Antes de iniciar a injeção do traço, injetou-se água destilada no reator por um tempo de aproximadamente 4 horas, até a estabilização da dinâmica do fluido (no reator a dinâmica foi comprovada através do teste da vazão). Em seguida, foram injetados 20 mL de uma solução de hipoclorito de sódio na entrada do reator por um período de aproximadamente 10 s. Para determinação da concentração do traçador nas amostras do

efluente, utilizou-se eletrodos de pH que ficavam instalados nos vasos coletores. Após cada experimento com vazões distintas, foi injetada água destilada no reator (limpeza), para assegurar que todo traçador fosse completamente removido do meio poroso. Antes de iniciar novos ensaios, vários volumes porosos do reator foram bombeados, à vazão constante, para garantir a formação do regime estacionário.

### 6.2.2 Modelos Matemáticos

Para conversão das curvas experimentais da variação de pH do traçador ao longo do tempo, utilizou-se a curva de calibração de Borin (2008), resultando em curvas de pH versus concentração (Figura 21).

A curva de pH em função da concentração (Figura 21) fornece a equação 3 empírica:

$$pH = 0,3546 \cdot \ln(C) + 10,79 \quad (3)$$

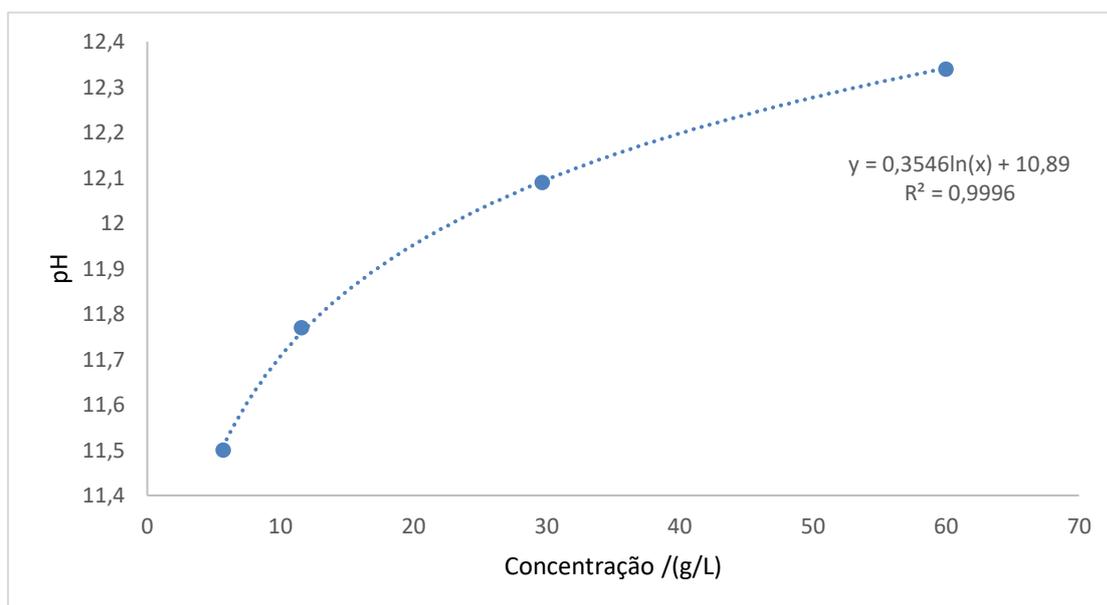


Figura 21: Curva de calibração pH em função da concentração (g/L)

Fonte: adaptado de Borin (2008)

Os valores de concentração obtidos a partir da equação 3 foram utilizados para a criação de novas curvas de concentração em função do tempo  $C(t)$ , conforme a vazão testada. As curvas foram ajustadas aos modelos teóricos uniparamétricos de dispersão axial: pequenas (PD) e grandes dispersões (PG) e N-Tanques em série (N-CSTR) proposto por (LEVENSPIEL, 2000) apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Modelos matemáticos utilizados na hidrodinâmica do biorreator

Modelo	Parâmetros	Equações
Dispersão de pequena intensidade (PD)	$\frac{\sigma^2}{t_m^2} = 2 \left( \frac{D}{u.L} \right)$	$E(\theta) = \frac{1}{2\sqrt{\pi \left( \frac{D}{u.L} \right)}} \cdot e^{-\frac{(1-\theta)^2}{4 \left( \frac{D}{u.L} \right)}}$
Dispersão de grande intensidade (GD)	$\frac{\sigma^2}{t_m^2} = 2 \left( \frac{D}{u.L} \right) - 2 \left( \frac{D}{u.L} \right)^2 \cdot \left( 1 - e^{-\frac{u.L}{D}} \right)$	$E(\theta) = \frac{1}{2\sqrt{\pi \cdot \theta \cdot \left( \frac{D}{u.L} \right)}} \cdot e^{-\frac{(1-\theta)^2}{4 \cdot \theta \cdot \left( \frac{D}{u.L} \right)}}$
Tanques de mistura completa em série (N-CSTR)	$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2}$	$E(\theta) = \frac{N(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} e^{-N\theta}$

Fonte: Levenspiel (2000)

### 6.2.2.1 Verificação de possíveis anomalias no biorreator

Para identificar as prováveis anomalias no biorreator, utilizou-se a metodologia de SARATHAI et al. (2010). Que faz a correlação entre dados experimentais e teóricos. A tabela 8 relaciona os parâmetros avaliados: i) volume de zonas mortas, calculado com base nos valores de tempos de residência hidráulicos (DTR) teórico e experimental. DTR experimental foi determinado a partir dos ensaios hidrodinâmicos e do volume total do reator; ii) presença de curtos-circuitos, foi verificada pela relação entre o tempo do primeiro aparecimento do traçador no efluente do reator e o DTR teórico; iii) a eficiência hidráulica, através do volume efetivo e o número de tanques de mistura completa em série (FREITAS, 2013; SARATHAI et al., 2010).

Tabela 8: Equações para determinação da presença de zonas mortas, curtos-circuitos e eficiência hidráulica

	Equações	Identificação parâmetros
Zonas Mortas	$d_s = \frac{Vd}{Vt} = 1 - \theta_m$ $Vd = Vt - \theta_m \cdot Vt$ $\theta_m = \frac{tm}{tobs}$	<i>ds</i> – espaço morto <i>Vd</i> – volume morto <i>Vt</i> – volume total <i>θ<sub>m</sub></i> – tempo adimensional <i>tm</i> – tempo médio teórico <i>tobs</i> – tempo médio de observação ( <i>V/v</i> )
Curtos-Circuitos	$\Psi = \frac{t_{1pico}}{tobs}$	<i>Ψ</i> = curto circuito
Eficiência Hidráulica	$\lambda = e \cdot \left(1 - \frac{1}{N}\right)$ onde $e = 1 - ds$	<i>λ</i> = eficiência hidráulica <i>e</i> = volume efetivo (%) <i>N</i> = número de tanques teóricos

Fonte: Sarathai *et al.* (2010); Freitas (2013)

### 6.2.3. Método de Integração Numérica

Nesta pesquisa utilizou-se o método Simpson 3/8 para as integrações numéricas. Os métodos de integração numérica são bastante utilizados em casos onde a resolução de uma integral não é tão simples na forma analítica ou quando a equação da curva que gerou os pontos não é conhecida. Eles fornecem um resultado aproximado do valor de uma integral definida, e, apesar de ter uma parcela de erro integrada no resultado, frequentemente eles são satisfatórios nos cálculos das integrais para os mais diversos tipos de problemas e situações. Para o estudo dos dados de concentração obtidos, o método de Simpson 3/8 foi considerado adequado.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 Curvas experimentais pH em função do tempo sem ajustes (antes da normalização com os modelos matemáticos)

Com os resultados dos três experimentos (vazões 3, 9 e 15 mL) foi possível gerar curvas com perfis de comportamento da circulação (espalhamento) da solução traço no reator. Observa-se que quanto menor a vazão (3 mL/min) maior será o tempo que a substância permanecerá no reator (Figuras 22, 23 e 24). Porém, quando a análise é observada nos pontos (P1, P2, P3 e P4) em perfil, quanto mais próximos os pontos estiverem do afluente, menor será o tempo de residência destes no reator (Figuras 22, 23 e 24).

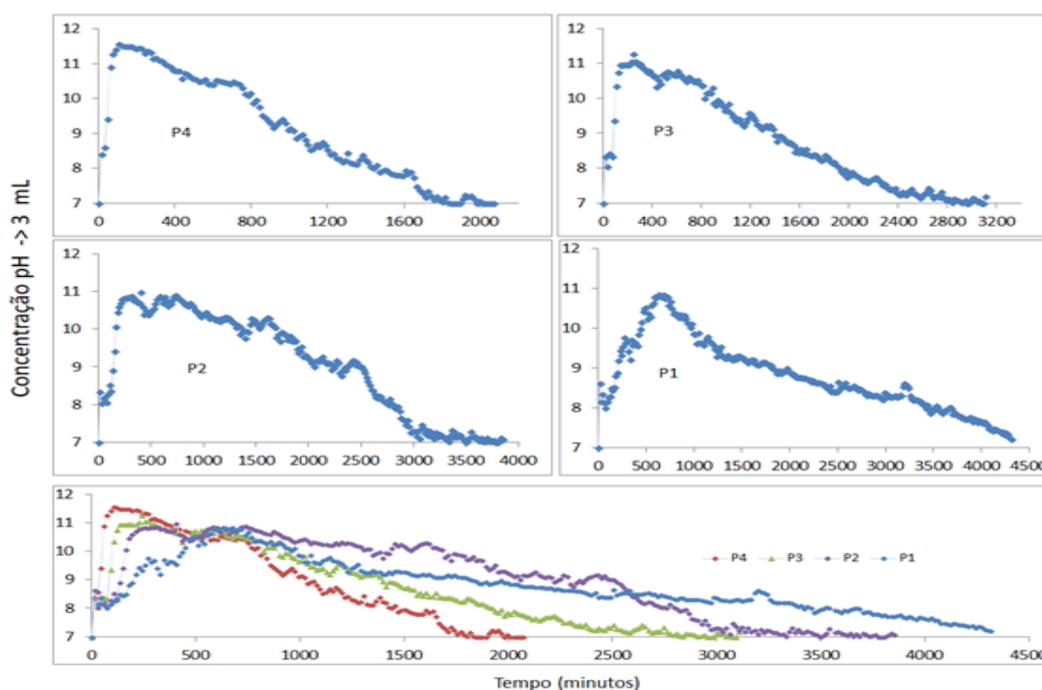


Figura 22: Curvas de variação do pH de hipoclorito para vazão 3 mL. (P4, P3, P2 e P1) pontos de coletas do afluente do biorreator

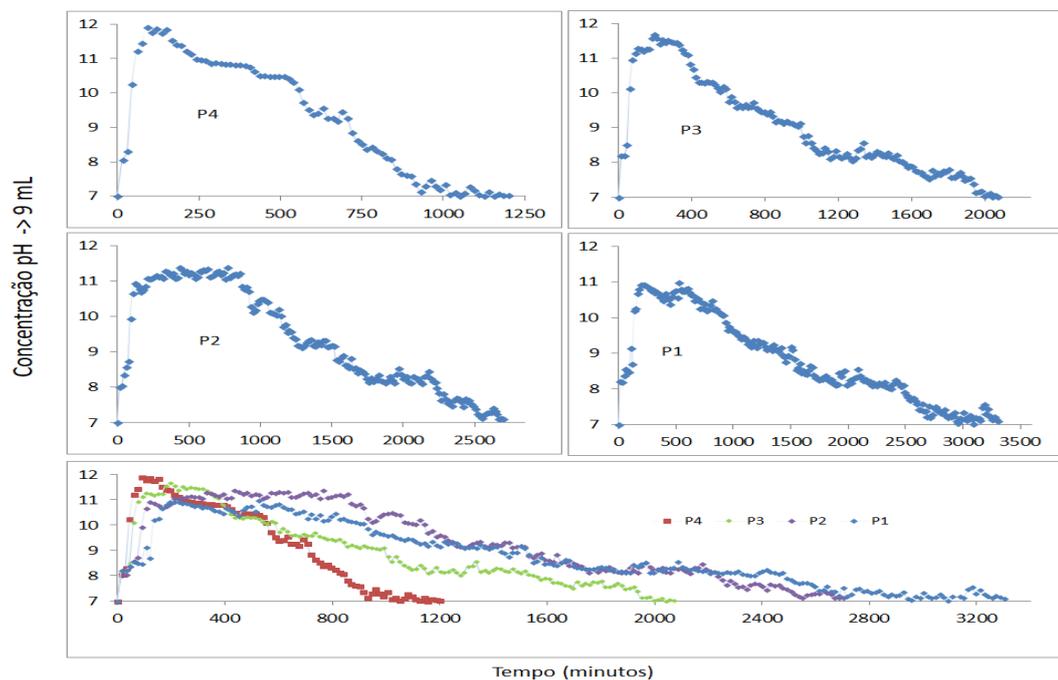


Figura 23: Curvas de variação do pH de hipoclorito para vazão 9 mL. (P4, P3, P2 e P1) pontos de coletas do afluente do biorreator

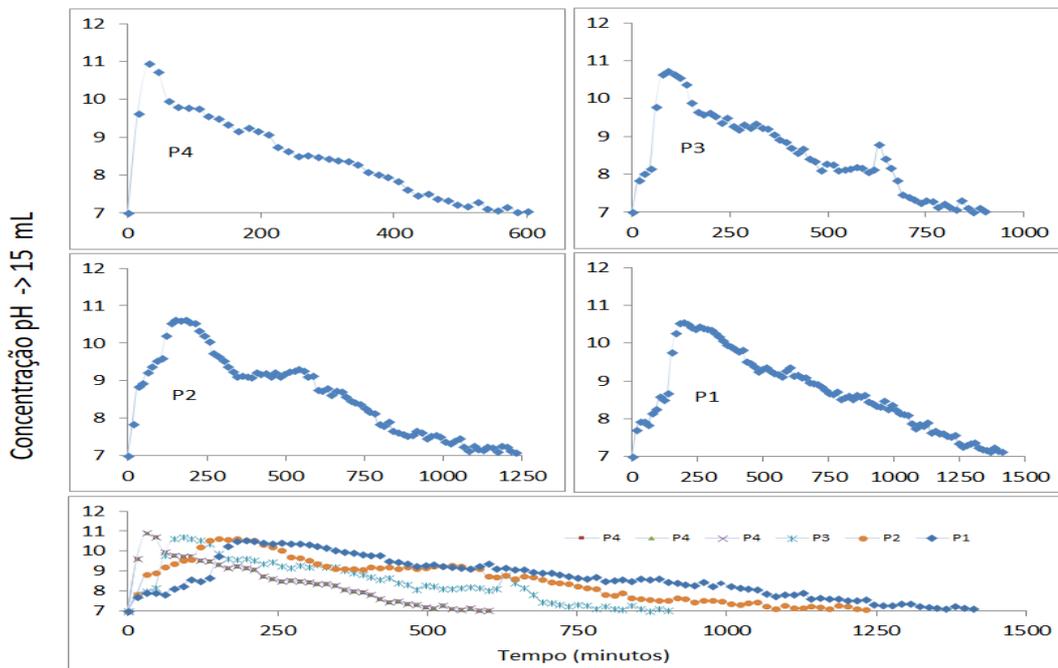


Figura 24: Curvas de variação do pH de hipoclorito para vazão 15 mL. (P4, P3, P2 e P1) pontos de coletas do afluente do biorreator

Mesmo sem a normalização das curvas aos modelos matemáticos predefinidos, já é possível identificar algumas características do escoamento no biorreator. A região P4 apresenta menor tempo de fluidez da solução, talvez por estar muito próximo ao ponto de alimentação, ocorrendo desvio, ou então, uma possível área de caminho preferencial. O P1 apresenta maior tempo para o espalhamento do traço no reator. Este fato, caracteriza atraso na resposta do traçador que pode ser justificado pela sua liberação gradativa no efluente, com lento decaimento nas curvas de pH ao longo do tempo, indicando provável fenômeno de “cauda longa” (SARATHAI et al. 2010). Outra justificativa seria a ocorrência de bolsões devido o meio poroso, com liberação gradativa do traçador “cauda longa”. Todas as curvas apresentam desenho em forma de sino, mais ou menos distorcida, cujo espalhamento depende das condições de escoamento, indicando características ao modelo de dispersão (LEVENSPIEL, 2000).

Detalhes dos pontos de amostragem do biorreator indicando prováveis ocorrências de desvios de idealidade em cada seção são apresentados na Figura 25.

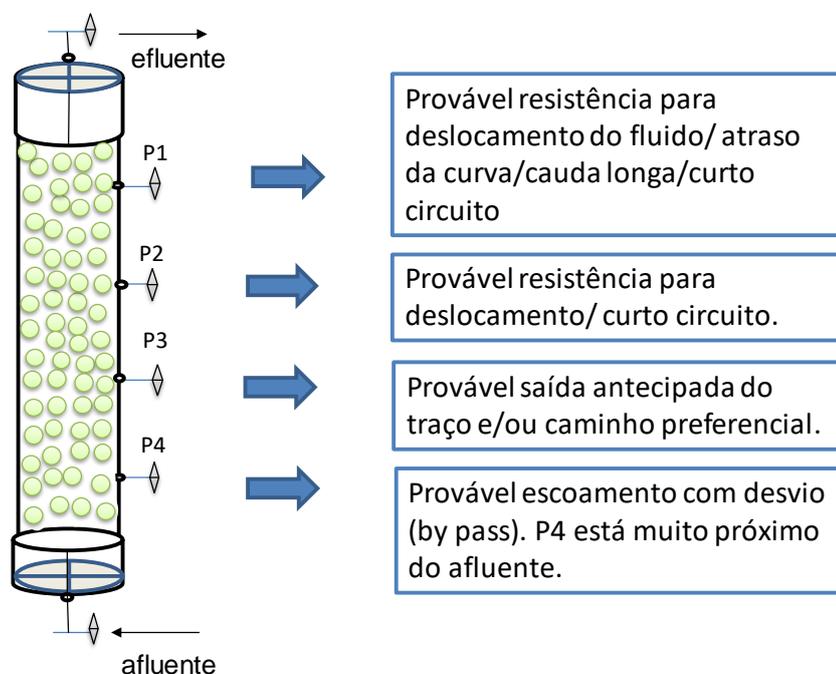


Figura 25: Detalhes dos pontos de amostras do biorreator com possíveis ocorrências (P1, P2, P3 e P4)

### 6.3.2 Curvas experimentais normalizadas com os modelos de dispersão axial e N-Tanques em série

Para a determinação das curvas de variação da concentração de hipoclorito ao longo do tempo foram utilizados os dados experimentais dos ensaios de estímulo-resposta obtidos através das leituras de pH versus tempo (Figuras 21, 22 e 23). Porém para a modelagem matemática, foi utilizado apenas os dados do último ponto de saída do reator P1, atendendo as condições dos modelos. Os parâmetros de dispersão, coeficiente de determinação e tempo médio de residência ( $\tau$ ) são apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados dos parâmetros obtidos com os ajustes dos dados experimentais sob diferentes condições de vazão: 3, 9 e 15 mL/min.

Variáveis	Modelos	Vazões (ml/min)				
		3	9	9 (2 curvas)		15
				Curva 1	Curva 2	
D/uL (Dispersão)	Numérico	0,0774	0,1558	0,0337	0,3023	0,0820
	PD	0,0120	0,1791	0,0425	0,0159	0,0370
	GD	0,0126	0,2038	0,0472	0,0272	0,0394
N Tanques (CSTR)	Numérico	7,00	3,80	15,35	2,33	6,65
	CSTR	40,75	3,26	11,76	22,07	13,60
$\tau$ (h)	Numérico	11:57	07:32	04:20	10:31	04:32
	PD	10:55	07:44	04:08	9:29	03:57
	GD	10:41	05:42	04:03	09:16	03:52
	CSTR	11:06	07:36	04:19	09:38	04:06
R <sup>2</sup>	PD	0,9418	0,7306	0,8986		0,8952
	GD	0,9437	0,7885	0,9303		0,9402
	CSTR	0,9435	0,7717	0,9237		0,92721

$\tau$ : tempo médio de residência (DTR teórico); D/uL: número de dispersão no reator; N: número de tanques; R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação

Os resultados obtidos nas simulações dos modelos de dispersão axial, mostram que tanto nos modelos matemáticos de (PD) e (GD) quanto no método numérico, o número de dispersão ( $D/uL$ ) foi superior a 0,01 para as diferentes vazões, sugerindo grande dispersão, que também pode ser comprovada através do cálculo dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ). Autores como (Salgado, 2008; Sarathai et al. 2010; Freitas, 2013; Rodrigues, 2015) avaliaram a hidrodinâmica de reatores de leito fixo com biomassa imobilizada, e utilizaram os coeficientes de determinação como um índice avaliativo.

Para o modelo de N-CSTR, os dados indicam que a vazão volumétrica tem uma relação inversa com o número de tanques em série (quanto maior a vazão menor será o número de reatores), 40,7; 11,76; 22,07 e 13,6 reatores para as vazões 3; 9(curva1); 9(curva 2) e 15 mL/min, respectivamente (Tabela 9). Em relação ao modelo numérico, observa-se uma redução significativa na quantidade de reatores em série, 7; 15,35; 2,33; e 6,65 reatores nas vazões 3; 9(curva 1); 9(curva 2) e 15 ml/min, respectivamente.

Os modelos mostram que nas vazões menores (3 mL/min), os tempos espaciais ( $DTR_{teórico}$ ) são maiores, ou seja, quanto menor a vazão maior será o tempo que o traçador levará para percorrer uma unidade de volume do reator (Tabela 9). O tempo médio de residência entre os modelos PD e GD foram muito próximos, 10h55min e 10h41min, respectivamente; e 11h06min para o modelo CSTR. Porém, no método numérico ocorre um tempo maior, 11h57min.

Para os dados da curva de 9 mL/min foram necessários ajustes, pois a curva não se adequou aos modelos proposto, o valor de  $R^2$  foi muito baixo para PD, GD e CSTR (0,73, 0,78 e 0,77, respectivamente). Então o modelo foi dividido em duas curvas distintas (curva 1 e curva 2), com valores de tempo médio de residência diferentes. Após ajustes observa-se aumento significativo de  $R^2$  para o modelo GD (0,93), PD (0,89) e (0,92) para CSTR. Quanto ao tempo médio de residência no reator, a curva 1 apresentou tempos parecidos nos modelos de PD e GD (4h08min e 4h03min, respectivamente) e 4h19min para CSTR. No entanto, a curva 2 apresenta maiores tempos de residência (9h29min, 9h16min e 09h38min) para PD, GD e CSTR, respectivamente (Tabela 9).

No geral, os valores de tempo médio de residência foram parecidos entre os modelos, porém o valor relacionado ao método de integração numérica destoou-se um

pouco mais em relação a estes, 10h31min. O mesmo, pode ser observado para os números de dispersão. Os resultados dos modelos e método numérico, estão sujeitos a diferentes tipos de erro. No método numérico, os erros de truncamento estão presentes e podem influenciar no valor final. Nos modelos, fatores como: i) falta de ajuste que siga com fidelidade o conjunto de pontos preestabelecidos e ii) considerações para obter as equações, podem adicionar erros aos resultados dos parâmetros. Logo, devido a esses erros que podem ocorrer na aquisição dos parâmetros, a diferença entre os resultados numérico e modelos podem ocorrer.

Com aumento da vazão para 15 mL/min ocorre a redução do tempo de residência da solução no reator, quanto maior a vazão menor será o tempo do traço no sistema. Os modelos de PD, GD e CSTR foram parecidos (3h57min, 3h52min e 4h06min, respectivamente), porém o modelo de grande dispersão (GD) teve  $R^2$  maior (0,94) quando comparado aos demais.

Os valores de  $R^2$  indicam que o modelo de N-tanques em série foi bem ajustado com os dados experimentais para todas as vazões (3, 9 e 15 mL/minuto) 0,94, 0,92 e 0,92 respectivamente. Através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é possível verificar se o modelo aplicado foi bem correlacionado com os dados experimentais (Sarathai et al. 2010). De acordo com Levenspiel (2000), os modelos de Tanque-em-Série (CSTR) e de dispersão podem ser usados para avaliar o comportamento hidrodinâmico dos vasos, pois ambos os modelos podem representar bem o escoamento em reatores de leitos recheados. Neste caso, se os parâmetros de dispersão ( $D/uL < 1$ ) for menor que 1, existe pequeno desvio do escoamento pistonado e ambos os modelos darão resultados parecidos. Nesta pesquisa, os modelos deram resultados muito próximos e atendem a determinação dos parâmetros de dispersão ( $D/uL < 1$ ) para (GD) e (PD) sem desvio ao fluxo pistonado.

### **6.3.3 Curvas de distribuição do tempo de residência (DTR)**

As curvas de distribuição do tempo de residência (DTR) normalizadas pelos modelos de dispersão axial de pequena (PD) e grande intensidade (GD), e por N-Tanques (CSTR), são apresentadas nas figuras 26 e 27.

Neste experimento o tempo médio experimental ( $\bar{t}_{exp}$ ) foi determinado pela equação 4.

$$\bar{t}_{exp} = \frac{V}{v} \quad \text{equação 4}$$

Sendo:

V: volume útil do reator

v: vazão

Os tempos médio ( $\bar{t}_{exp}$ ) = (DTR<sub>exp</sub>) foram: 20h, 06h40min e 04h, para as vazões de 3, 9 e 15 mL/min, respectivamente.

Na vazão de 3 mL/min observa-se que o formato das curvas e número de dispersão são muito próximos (0,0120 e 0,0126; PG e PD, respectivamente). No entanto, devido ao formato das curvas, o modelo (GD) ajusta-se melhor aos dados pela simetria (Figura 26). Segundo Levenspiel (2000), quando o número de dispersão (D/uL) for superior a 0,01 deve-se considerar grande dispersão no sistema. Quando (D/uL) aumenta, a curva torna-se mais oblíqua perdendo a simetria, é o que mostra as curvas de 3 mL/min (Figura 26). As curvas de 3 mL mostram um atraso significativo no escoamento do traço. Os valores de DTR<sub>exp</sub> > DTR<sub>teórico</sub>, sugerem prováveis regiões com existência de zonas mortas, (PD) 10h55min e (GD) 10h41min são menores que o DTR<sub>exp</sub> (20h).

Na vazão de 9 mL/min, foi necessário ajustes, pois as curvas não se adequaram aos modelos proposto (Figura 26). As curvas de 9mL/min com ajustes aos modelos matemáticos e 15 mL/min são apresentadas na figura (27).

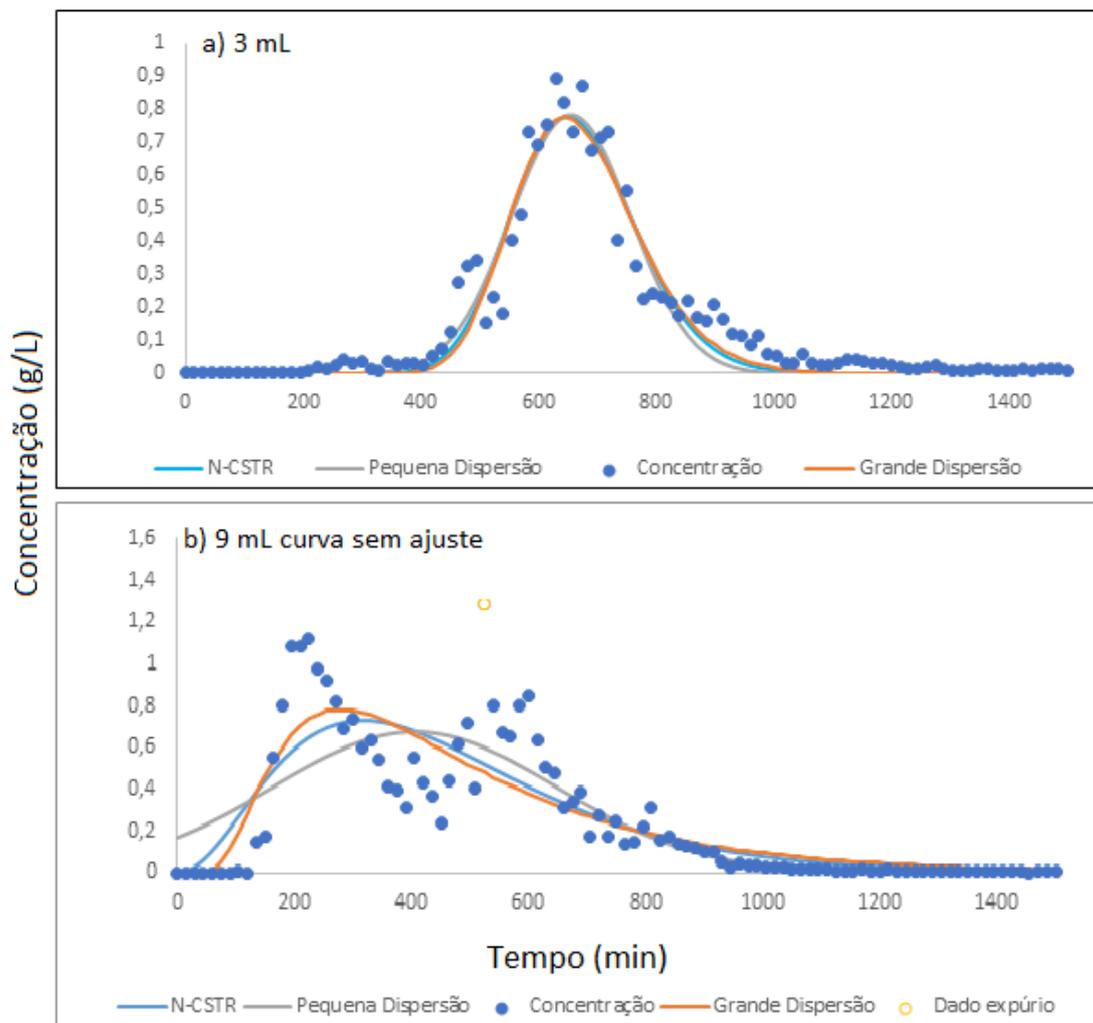


Figura 26: Curvas de DTR para as vazões de 3 e 9 (sem ajuste) mL/min, utilizando os modelos matemáticos de dispersão axial (PD e GD), e N-tanques em série (CSTR): dado espúrio (valor discrepante fora da curva).

Fonte: Produção própria

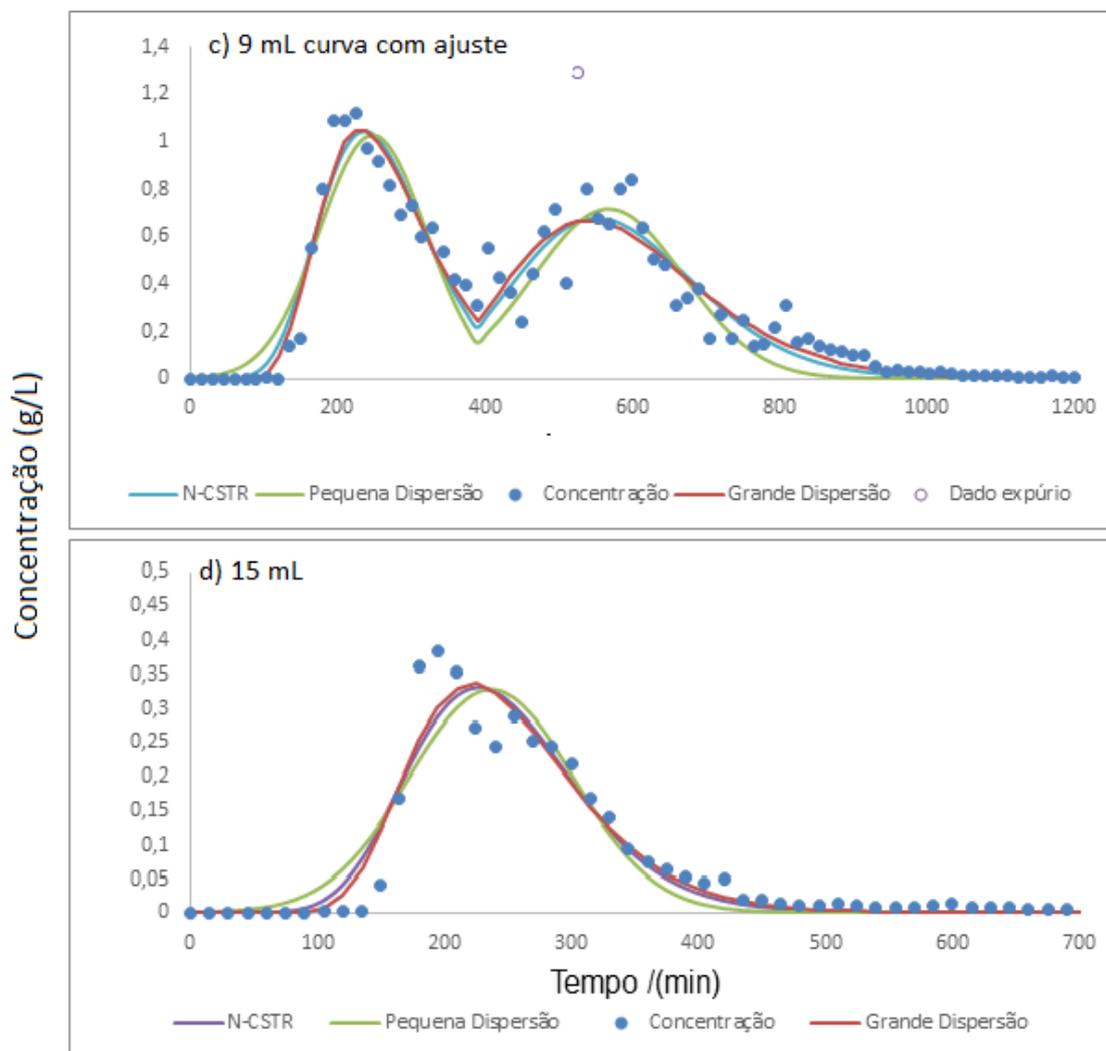


Figura 27: Curvas de DTR para as vazões de 9 (com ajuste) e 15 mL/min, utilizando os modelos matemáticos de dispersão axial (PD e GD), e N-tanques em série (CSTR): dado espúrio (valor discrepante fora da curva)

Fonte: Produção própria

Nesta curva (9 mL), a modelagem foi dividida em 2 etapas devido a provável formação de caminhos preferenciais no reator. Na primeira etapa foi considerado apenas os valores de concentração dos tempos inferiores a 390 minutos ( $t_0$  até  $t_{390}$ ). Na segunda etapa, os mesmos modelos foram utilizados para os pontos superiores a 390 minutos, porém novos parâmetros foram obtidos (figura 27). Após ajustes a vazão de 9 mL/min, ocorreu 2 picos de concentração do traçador.

Tanto para a representação dos pontos em uma única curva, como em duas curvas, os valores do número de dispersão foram acima de 0,01, indicando que o modelo de alta dispersão descreve melhor o comportamento dos dados experimentais. Também apresenta uma região de rápido escoamento (curva 1) seguido de um lento decaimento (curva 2), com DTR teóricos distintos (04h03min e 09h16min (GD), 04h08min e 9h029min (PD), enquanto o  $DTR_{exp}$  é 06h40min (Tabela 9). Com os dados experimentais divididos em duas curvas pode-se obter valores maiores de  $R^2$ , (0,92) N-tanques, (0,93) GD e (0,89) PD.

As curvas de 15 mL/min apresentam um leve atraso na saída do traço ( $DTR_{exp}$  4h, enquanto o  $DTR_{teórico}$  3h52min e 03h57min para (GD) e (PD) respectivamente. Devido ao tempo teórico ser próximo ao experimental, pode-se considerar que na curva há um escoamento de fluido relativamente bom (Figura 26). Tanto para a vazão de 15 como 9 mL, os números dos modelos de dispersão foram superiores a 0,01, explicando assim o melhor ajuste do modelo de alta dispersão. Isso se reflete nos coeficientes de determinação, onde o valor do  $R^2$  é superior para o modelo de alta dispersão (0,94). Os modelos de dispersão axial para altas e baixas dispersões conseguiram explicar o comportamento das curvas de 3 e 15 mililitros por minuto. No entanto, para 9 mL, devido a provável formação de caminhos preferenciais, cada modelo precisou ser segregado em 2 diferentes curvas para conseguir o ajuste aos pontos da curva.

O coeficiente de determinação (0,92) para a vazão de 15mL, indica que o modelo de N-tanques em série aproxima-se dos dados experimentais. Comparando-se as três curvas e seus correspondentes valores de  $R^2$ , pode-se afirmar que os dados que mais se ajustaram ao modelo de N-tanques em série foi a curva de concentração com a vazão de 3mL.

#### **6.3.4 Análise de parâmetros para avaliar as possíveis anomalias no biorreator utilizando o modelo N-Tanques em série**

Para verificar a existência de anomalias no biorreator utilizou-se dados do modelo N-Tanques em série (CSTR) para determinação dos parâmetros apresentados na tabela

10, pois o modelo de dispersão axial considera a inexistência de bolsões estagnantes e de desvio (by-pass) total ou curto circuito do fluido no biorreator.

Tabela 10: Parâmetros para análise de desvio no biorreator

VERIFICAÇÃO DAS ANOMALIAS PRESENTES NO REATOR			
PARÂMETROS	VAZÕES (mL/min)		
	3	9	15
ds (%)	40,21	-12,91	-13,23
$\tau$ exp (h)	20:00	06:40	04:00
$\bar{t}$ teórico (h)	11:06	04:19/09:38	04:06
$\Psi$	0,59	0,65	1,13
$\lambda$	0,58	1,07	1,04
e (%)	59,78	112,91	113,23

ds - zonas mortas (%);  $\bar{t}$  teórico =  $DTR_{teórico}$ ;  $t = DTR_{exp}$ ;  $\Psi$  - curto circuito;  $\lambda$  - eficiência hidráulica; e = volume efetivo (%)

Na vazão de 3 mL/min o  $DTR_{exp}$  (20h) é 1,7 vezes maior que o  $DTR_{teórico}$  (11h:06min), caracterizando atraso na curva. É provável que esse fenômeno ocorra devido a existência de zonas mortas ou adsorção do traçador no meio poroso. O percentual de zonas mortas (40%) corrobora com a possibilidade de zonas com estagnação do fluido. Foi considerado ausência de curto circuito, pois  $\Psi = 0,59$ . É considerado curto-circuito quando o parâmetro  $\Psi$  é menor que 0,3 ( $\Psi \leq 0,3$ ). Os dados evidenciam que houve uma eficiência hidráulica regular, pois  $\lambda = 0,58$ . Para ser considerado boa eficiência ( $\lambda \geq 0,75$ ).

Já em 9 mL/min, os dados também sugerem atraso na curva 1, pois o  $DTR_{exp}$  foi maior que o  $DTR_{teórico}$  (06h40min e 04:19min; respectivamente). No entanto, a curva 2 apresentou adiantamento devido o  $DTR_{exp}$  (06h40min ser menor que o  $DTR_{teórico}$  09h38min). Estas informações da curva indicam possibilidade da formação de canais preferenciais e caminhos paralelos. Curvas com picos duplos, onde determinada parte do fluido escoava mais rápido que outra (curvas 1 e 2). O escoamento também apresentou espaço morto negativo (-12,9%), indicando a existência de caminhos preferenciais no

escoamento do reator (Tabela 10). No entanto não é possível confirmar que houve existência de curtos circuitos, visto que  $\Psi > 0,3$ . Os dados da tabela 10 sugerem uma boa eficiência hidráulica no sistema  $\lambda = 1,07$  ( $\lambda \geq 0,75$ ).

Para 15 mL, o  $DTR_{teórico}$  é maior que o  $DTR_{exp}$  (04h06min e 04h, respectivamente), caracterizando adiantamento na resposta do traçador. Provavelmente ocorreu caminhos preferenciais no reator, já que o espaço morto calculado foi negativo (-13,2%) (tabela 10). O valor de  $\Psi=1,13$  indica a não existência de curto circuito no escoamento do fluido. No entanto, é importante frisar que a diferença entre o  $DTR_{exp}$  e  $DTR_{teórico}$  foi mínima e apesar das possíveis anomalias presente no reator (zonas preferenciais ou adsorção do traçador), os tempos de residência hidráulica foram muito parecidos e a vazão de 15 mL/min é considerada eficiente para uso no reator ( $\lambda= 1,04$ ).

#### 6.4 CONCLUSÃO

Os modelos de dispersão axial para PD e GD aproximam-se do comportamento dos dados experimentais (curvas de 3 e 15 mL/min). Porém, para a vazão de 9 mL/min, devido a provável formação de caminhos preferenciais, cada modelo precisou ser segregado em 2 diferentes curvas para conseguir ajuste aos pontos destas. O perfil das curvas dos modelos de dispersão mostra que o traçador modifica a forma destas durante o tempo que ele passa pelo ponto de coleta. A curva medida não é simétrica e apresenta um prolongamento em forma de cauda, ou seja, a medida que a dispersão cresce a curva se torna mais oblíqua caracterizando grande dispersão (GD). Os ensaios hidrodinâmicos mostraram que o modelo de N-tanques em série, também apresentaram bons ajustes aos dados experimentais nas diferentes condições de vazões, ratificando a teoria de Levenspiel (2000) sobre a possibilidade dos valores serem muito parecidos entre os modelos de dispersão e N-tanques em série, desde que a condição do parâmetro de dispersão ( $D/uL$ ) não seja maior que 1, caracterizando desvio do escoamento pistonado. Reatores de leito fixo e fluxo ascendente são frequentemente utilizados em microbiologia do petróleo para o estudo da cinética do crescimento bacteriano de BRS. No entanto, existem poucas informações em relação a hidrodinâmica dos reatores e à influência do perfil de escoamento dos fluidos nos resultados obtidos. Nesta pesquisa os testes

hidrodinâmicos mostraram o perfil de comportamento do reator, indicando que o desempenho deste pode ser afetado pelo tempo de residência da solução, devido a variação na taxa de adesão das BRS na formação do biofilme e provável desprendimento das bactérias na superfície do meio poroso. A presença de zonas de estagnação no meio poroso também pode interferir no regime de fluxo de nutrientes ou inibidores, promovendo a redução local da atividade bacteriana ou dificultando o acesso do inibidor nessas zonas.

## 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDEZ, L. A., DE ANDRADE LIMA, L. R. P., RAMOS, C. L., ALMEIDA, P. F. 2012. A kinetic analysis of microbial sulfate reduction in an upflow packed-bed anaerobic bioreactor. *Mine Water and the Environment*, v. 26, n. 3, p. 62 – 68.

BORIN, G.; Oliveira, E. 2008. Alterações no pH e teor de cloro ativo em função da embalagem e local de armazenamento de solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. *Revista da Faculdade de Odontologia-UPF*, v. 13, n. 2.

CARVALHO, K. Q; SALGADO, M. T; PASSIG, F. H; PIRES, E. C. 2008. Avaliação hidrodinâmica de reator UASB submetido à variação cíclica de vazão. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 13, n. 2, p. 226-235.

DE JESUS, E. B. 2015. Redução Microbiológica de Sulfato: Cinética, Inibição com Molibdato e Simulação de Estratégias de Controle. Tese (Doutorado em Energia e Ambiente) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia. Salvador.

DE NARDI, I.R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. 1997. Respostas do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) nos ensaios hidrodinâmicos com diferentes traçadores. In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu. Anais 19º ABES, p. 127-141.

DE NARDI, I. R; ZAIAT, M.; FORESTI, E. 1999. Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. *Bioprocess Engineering*, v. 21, n.5, p. 469-476.

FOGLER, H.S. 2008. Elementos de Engenharia das Reações Químicas. 3a Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.

FREITAS, D. C. 2013. Estudo do comportamento hidrodinâmico de reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo tratando efluente bovino. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, UTFPR.

LEVENSPIEL, O. 2000. Engenharia das reações químicas. São Paulo, SP: Edgard Blucher.

PASSIG, F. H.; BLUNDI, C. E. 1999. Caracterização hidrodinâmica de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente. Engenharia e Arquitetura – Escola de Engenharia de São Carlos/USP, São Carlos, v. 1, n. 54 1, p. 1-6.

RODRIGUES, CAROLINA MORALES. 2015. Análise de parâmetros hidrodinâmicos de reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo com biomassa imobilizada. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SALGADO, M. T. 2008. Modelo matemático para avaliação hidrodinâmica em reatores tubulares operando em regime não-permanente, 2008. 167 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. 2001. Biorreatores e Processos Fermentativos, Biotecnologia Industrial, v2, p. 179-187.

SOUZA, T. H. Y. 2012. Estudo Hidrodinâmico de Reator Aeróbio-Anóxico de Leito Fixo (RAALF). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SARATHAI, Y., KOOTTATEP, T., & MOREL, A. 2010. Hydraulic characteristics of an anaerobic baffled reactor as onsite wastewater treatment system. *Journal of Environmental Sciences*, 22(9), 1319-1326.

SASSAKI, R. A. Distribuição de Tempos de Residência em Sistemas Alimentados Com Vazão Variável. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, abril 2005.

## Capítulo 7 - Artigo aceito pela SPE journal – A1 Engenharias

### III

#### OPERAÇÃO DO BIORREATOR

##### Resumo

Injeções de biocida são usadas para controlar a acidificação biológica em campos maduros de petróleo, porém os resultados imprevisíveis de tais práticas também são frequentemente relatados. Para resolver este problema, esta pesquisa teve como objetivo quantificar o efeito de cinco biocidas dentro de um sistema dinâmico (biorreator de leito fixo), sendo quatro biocidas novos e um comumente utilizado na indústria petroquímica. O biorreator foi operado por 591 dias, e os resultados mostraram que a atividade das bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem se recuperar em um período que varia de 15 a 60 dias. O óleo de neem (NO) (1,5% v/v) e 3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazinano-2-tiona (Dazomet, DZ) (0,5% v/v) foram os mais eficientes no controle da atividade de BRS. Os testes mostraram que a interação mecanicista que controla a acidificação não está associada apenas à toxicidade dos compostos. Os biocidas imiscíveis além de matar as células, também podem controlar as taxas de recuperação de BRS após a injeção destes.

**Palavras Chaves:** Bactérias Redutoras de Sulfato, Biorreator, *Souring*, Biocidas, Óleo Essencial

## 7.1 INTRODUÇÃO

A produção de sulfeto ( $H_2S$ ) pelas BRS é um sério problema econômico para a indústria de óleo e gás natural. O sulfeto é uma substância corrosiva que afeta não apenas a qualidade do óleo, mas também afeta a produção, transporte e armazenamento (NEMATI et al., 2001; GOMEZ DE SARAIVA et al., 2003). O método mais utilizado para o controle de  $H_2S$  é a aplicação de biocida no reservatório de óleo (CHEN et al., 1994; NEMATI et al., 2001; GOMEZ DE SARAIVA et al., 2003; ECKFORD & FEDORAK, 2002). No entanto, embora os biocidas sejam úteis, nem sempre são eficazes a curto ou longo prazo (RAMADAN et al., 2015; XU et al., 2017).

O controle a longo prazo depende da frequência de aplicação e dosagem do biocida (RAMADAN et al., 2015; XU et al., 2017). Por outro lado, há um crescente número de relatos associando a falha do controle de sulfeto biológico à presença de BRS resistente a biocidas (NEMATI et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2010; LAVANIA et al., 2011; Li et al., 2016; XU, et al., 2017). Segundo esses autores, quando esses microrganismos estão presentes, muitas vezes é necessário aumentar as frequências de aplicação de biocidas ou o uso de substância mais poderosa, elevando os custos de operação e de controle do processo por exigir maiores concentrações de aplicação, ou o uso de produtos mais caros, além de expor os operadores de campo, as populações circunvizinhas e o meio ambiente aos possíveis efeitos dos compostos destas substâncias (NEMATI et al., 2001; VIDELA, 2003; DOS SANTOS et al., 2010; LAVANIA et al., 2011; LI et al., 2016; XU, et al., 2017).

As BRS ambiental pode crescer em biofilmes ou mesmo residir em microcanais dentro da estrutura de formação de rochas. Nesse caso, algumas células de BRS freqüentemente sobrevivem à aplicação de biocida, e servem como um inóculo para o repovoamento de seu ambiente natural. Pouquíssimas informações estão disponíveis sobre a velocidade desse processo. Os testes estáticos de bateladas pode ajudar apenas a determinar a dose mínima necessária de biocidas. Reatores de leite empacotado são usados para criar um ambiente dinâmico no qual a população bacteriana é exposta de forma diferente às substâncias injetadas (GIEG et al. 2011; XUE e VOORDOUW, 2015). As células bacterianas podem se proteger formando biofilme, crescendo em contato com

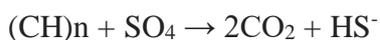
o substrato estacionário (leito fixo), e a condição de operação do biorreator gera um gradiente distinto de concentração de biocida dentro desse ambiente projetado. Assim, o teste de biocida para controle de BRS usando biorreatores de leito fixo pode fornecer uma melhor compreensão dos fatores ambientais que controlam a atividade de SRB *in situ* do que os testes estáticos (GIEG et al. 2011).

O objetivo desta pesquisa foi usar um biorreator de leito fixo com redução de sulfato, para testar e quantificar o efeito de quatro novos biocidas e um comumente usado na indústria de petróleo, visando inibir a atividade de BRS em um ambiente dinâmico, em vez de usar o teste padrão de bateladas de laboratório (sistema estático). Para conseguir um controle confiável para os testes, um consórcio bacteriano redutor de sulfato obtido de um reservatório maduro de óleo foi usado para inocular um biorreator, que foi operado por 591 dias.

## 7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.2.1 Condições Operacionais do Biorreator

O período de operação do sistema foi de 591 dias com tempo de retenção hidráulica de 72 h. O sistema foi recarregado a cada 72 h com uma carga orgânica de DQO de  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ . O afluente usado foi baseado no meio BRS-Postgate (POSTGATE, 1965). A composição do afluente por L: NaCl, 15g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,0;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1,0 g;  $\text{CaCl}_2$ , 1,0 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,83 g; extrato de levedura, 1,0 g; ácido ascórbico, 0,1 g; tioglicolato de sódio, 0,013 g; citrato de sódio, 6,38 g; lactato de sódio 1,75 mL. Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5. Depois disso, a solução foi homogeneizada por agitação e esterilizada a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min e produziu um valor de DQO de aproximadamente de  $5 \text{ g l}^{-1}$ . A figura 28 mostra o esquema para alimentação do biorreator. A reação estequiométrica genérica que exemplifica o consumo de DQO e o metabolismo de redução de sulfato é caracterizado na Equação 6. Nesta fórmula, os orgânicos são generalizados como (CH)<sub>n</sub>.



(Equação 6)

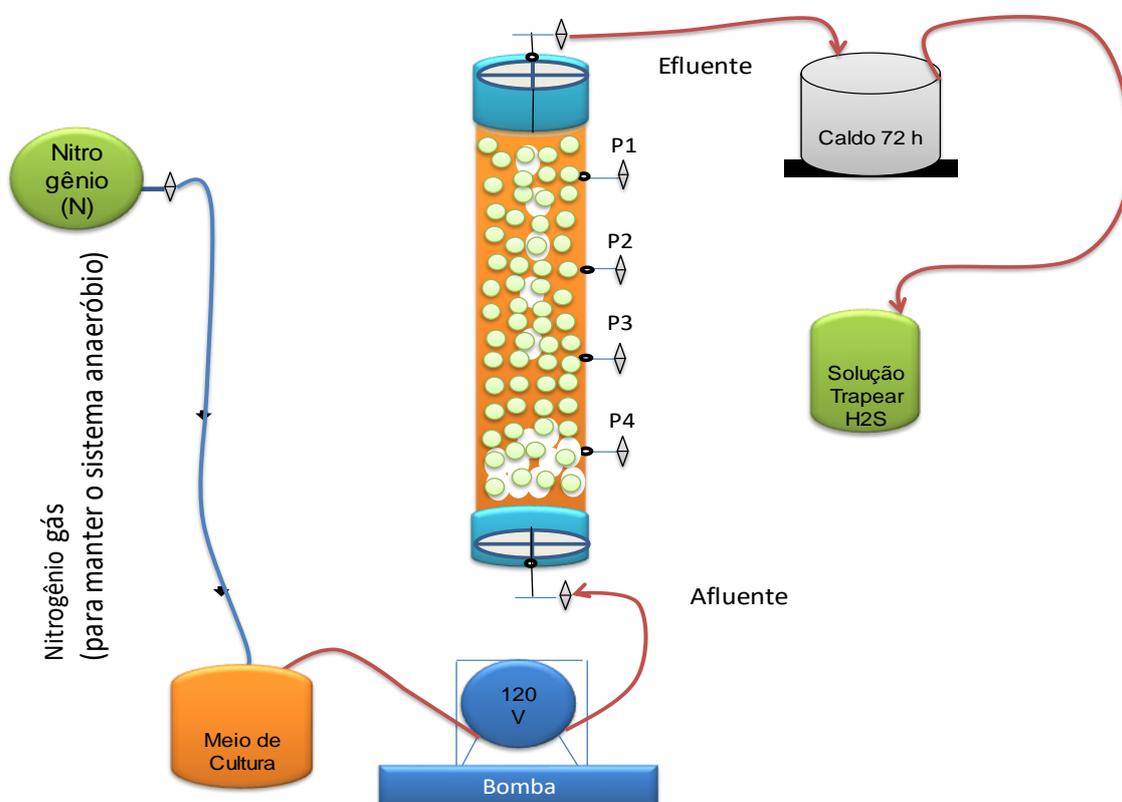


Figura 28: Esquema para alimentação do biorreator. O meio de cultura é injetado através de uma bomba peristáltica a vazão constante, e o efluente é coletado no mesmo instante que ocorre a injeção do meio no afluente. O volume de trabalho do biorreator é 1400 mL, sendo que a cada batelada de 72 h somente 700 mL é retirado do efluente. Nitrogênio é injetado no meio de cultura durante a injeção para manter a anaerobiose do sistema.

Fonte: Produção própria

## 7.2.2 Procedimentos Analíticos

As taxas de remoção da demanda química de oxigênio (DQO), consumo de sulfato e as taxas de produção de sulfeto, o potencial redox (Eh) e variações no valor do pH foram utilizados para monitorar o processo biológico. Amostras de rotina foram realizadas antes e após a alimentação do biorreator.

Taxas de remoção de DQO, consumo de sulfato e produção de sulfetos foram realizadas de acordo com JIRKA e CARTER (1975), CHRISTISON *et al.* (2011) e DOMINGOS *et al.* (2012), respectivamente. As amostras para quantificação de sulfetos foram primeiro corrigidas com uma solução contendo acetato de zinco e hidróxido de sódio (2 e 5% p/v, respectivamente), e quantificada em um espectrofotômetro EL800 EL (630nm). Um método adicional usando azul de metileno serviu como comparação (CLINE, 1969). Um Medidor Thermo Orion PerpHect (Modelo 330) realizou leituras do potencial redox (Eh) e valores de pH (de acordo com as instruções do fabricante). As amostras de sulfato foram filtradas em filtro 0,22 $\mu$ m e diluídas em água Milli-Q (Biocell) e as concentrações determinadas por Cromatografia de Íons (CHRISTISON *et al.*, 2011 e DOMINGOS *et al.*, 2012) e também por método turbidimétrico (KOLMERT *et al.*, 2000), o equipamento utilizado foi GENESYS 10S UV-vis (Termo Scientific Ltd).

### **7.2.3 Quantificação de BRS por NMP**

Utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP) para quantificar as BRS. O NMP é um método estatístico para estimar o número de células viáveis em uma amostra. A diluição seriada de uma mostra foi inoculada em meio de cultura Postgate-modificado. O NMP foi realizado em triplicata e o fator de diluição foi de 10x, ou seja, o volume de inóculo foi de 10% para cada diluição e incubadas a 38°C. As amostras foram monitoradas por 28 dias para verificar o crescimento das BRS, que é indicada pela mudança de cor do meio de cultura, de incolor ou ligeiramente rosa para negro, devido a formação de precipitado de sulfeto de ferro (FeS). A quantificação da densidade de BRS foi realizada através de uma tabela derivada estatisticamente, conforme o número de potes que mudaram de cor e a quantidade de diluição (ECKFORD e FEDORAK 2002; HULECKI *et al.* 2009; GIEG *et al.*, 2011).

### **7.2.4 Cultura Microbiana**

O biorreator foi inoculado por um consórcio microbiano de BRS coletadas numa estação de petróleo do Campo Dom João, localizado na cidade de São Francisco do

Conde, região da Bacia do Recôncavo da Bahia. E foi mantida através de repique em meio Postgate modificado. A incubação ocorreu a 38 °C e o crescimento em 36h. O inoculo foi injetado junto com o substrato no biorreator, utilizando-se uma bomba peristáltica modelo Masterflex.

### **7.3 AVALIAÇÃO OPERACIONAL DO BIORREATOR**

Cada biocida (sozinho ou em mistura) foi injetado no biorreator em etapas distintas na sua respectiva concentração da MIC. O efeito sobre atividade de BRS foi avaliado de acordo com as variações químicas que comparam o biorreator no período estacionário (equilíbrio dinâmico do consumo de DQO, sulfato e taxas de produção de sulfeto). Cada injeção distinta do biocida no biorreator, ocorreu somente após a recuperação total da fase de equilíbrio dinâmico, ou seja, (um mínimo de cinco ciclos de estabilidade com relação ao percentual da remoção de DQO acima de 85%). O teste final foi então realizado com o biocida controle DZ (tetrahydro-3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione). Além disso, um perfil químico da atividade metabólica das BRS foi realizado antes e após a introdução dos biocidas, a fim de quantificar uma potencial mudança microbiana causada pelos testes.

O biorreator foi alimentado por meio Postgate modificado e operado em batelada dentro de um ciclo de 72 horas por período de 591 dias. Este longo período foi utilizado para determinar os parâmetros das fases de operação do biorreator, *start-up* e estabilidade dinâmica. Tais parâmetros serviram como indicadores para avaliar a eficácia dos biocidas no controle da atividade de BRS dentro do biorreator. Esses parâmetros são: a remoção de DQO, produção de sulfetos e as taxas de consumo de sulfato.

#### **7.3.1 Testes de Biocidas e Perfil da Atividade de BRS**

Após aferida a estabilidade dinâmica do biorreator de BRS iniciou-se as injeções de biocidas. Foi realizado um estudo de perfil para monitorar as condições metabólicas do biorreator antes e após os testes. Os parâmetros monitorados foram: consumo de DQO,

sulfato e produção de sulfeto. Amostras foram coletadas em intervalos de 12 h por período equivalente a uma batelada, ou seja, um tempo de retenção hidráulica de 3 dias. A partir de então, iniciou-se os testes no biorreator com a injeção da MIC de cada composto químico (Tabela 11). O composto era adicionado no meio de cultura e injetado no biorreator através de bomba peristáltica a vazão 8 ml/min. Nova substância era injetada após o retorno da estabilidade do sistema. Finalizado os testes de inibição no biorreator, foi realizado outro estudo de perfil para avaliar com maior precisão o processo sulfetogênico já em equilíbrio dinâmico.

### 7.3.2 Substâncias testadas para controlar a atividade BRS

Neste estudo foram utilizados seis produtos químicos diferentes com potencial para controlar as populações de BRS. Sendo um surfactante não iônico, três óleos essenciais, um mix de surfactante e óleo essencial e por último um biocida amplamente aplicado na indústria petroquímica que foi utilizado como controle dos testes. O surfactante Lauryl-glicosídeo também conhecido como Plantarem 1200 (nome comercial) foi fornecido pela EMFAL – Especialidades Químicas – Brasil. Peso molecular estimado 508 Da com concentração micelar crítica (CMC) a cerca de 79 mg l<sup>-1</sup>. Os óleos essenciais *Rosmarinus officinalis* e *Melaleuca alternifolia* (Tea-Tree), ambos fornecidos pela Solua Comercial Ltda - Brasil. Neem oil extract (azadirachtin), obtido pela Insetimax Indústria Química. O biocida Dazomet de nome comercial AMA-324 foi fornecido pela Kemira Chemical Brasil Ltda. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) e a sequência de injeção dos compostos químicos utilizados neste estudo estão na Tabela 11 e Figura 28.

## 7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta pesquisa a figura 29 mostra que os resultados obtidos com as concentrações inibitória mínima de cada agente químico nas condições do biorreator (sistema dinâmico) diferem dos dados em batelada in vitro de laboratório (sistema estático), pois, evidenciam a capacidade do biofilme de se recuperar ao longo do tempo.

#### 7.4.1 Avaliação da injeção dos biocidas no biorreator

O biorreator foi operado por 591 dias (197 ciclos em bateladas de 72 horas cada) com meio Postgate modificado e uma carga orgânica de DQO  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ . Os dados de remoção da DQO demonstram que o equilíbrio dinâmico foi alcançado a partir do 46º ciclo, ou seja, no fim do período de partida (*start-up*). No entanto, o biorreator ainda foi monitorado por cerca de 35 ciclos (105 dias) antes de iniciar os testes com injeções dos biocidas. Os resultados desse longo período de monitoramento foram utilizados como controle (equilíbrio dinâmico) para avaliar a eficácia dos biocidas durante os testes de inibição. As injeções de biocidas foram realizadas nos ciclos 78, 87, 99, 117, 138, 154 e 177º, como indicado (figura 29). A figura 29 mostra uma redução significativa nas taxas de remoção de DQO e sulfato associadas a uma diminuição da produção de sulfeto no momento das injeções de biocidas. Os valores negativos da taxa de remoção de DQO observados nos dois primeiros ciclos e durante o período de testes de biocidas são devidos ao excesso de inóculo microbiano para iniciar o processo, e a lavagem do biofilme de BRS nos demais ciclos. Buzzini et al. (2005) avaliaram a diversidade microbiana em reator UASB e utilizaram dados como eficiência de remoção da DQO, alcalinidade e concentração de ácidos graxos voláteis no efluente, como parâmetros para considerar o equilíbrio dinâmico do reator. Autores como Zaiat & Abreu, (2008) e Sarti et al. (2006) estudaram o desempenho de reatores anaeróbio e consideraram a remoção de DQO como indicador da estabilidade operacional do sistema.

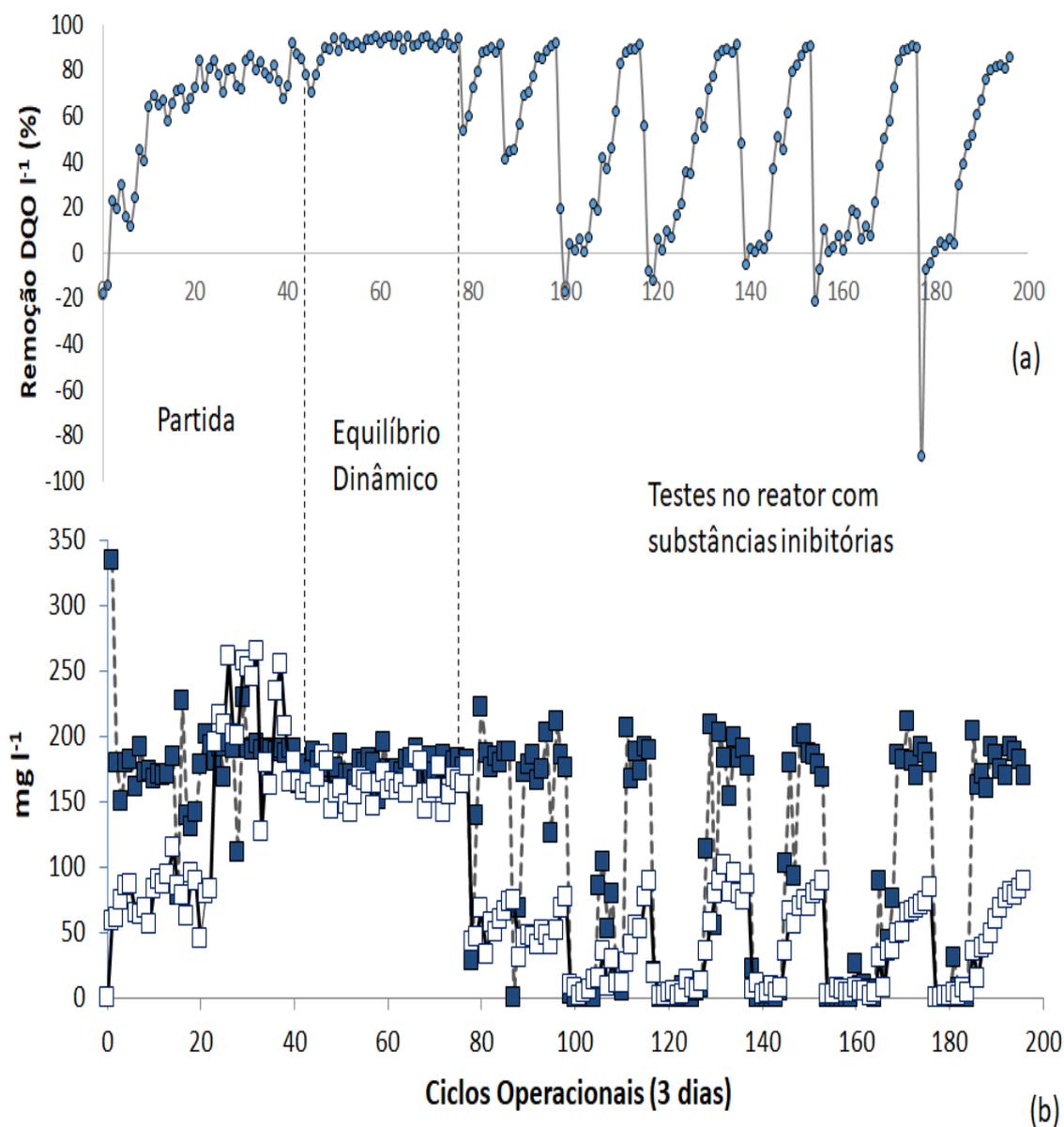


Figura 29: Taxa de remoção de DQO (a) e sulfato  $\blacksquare$  ou sulfeto  $\square$  consumo e produção, respectivamente (b). O biorreator foi operado por um período de 591 dias com um tempo de retenção hidráulica de 72 horas e uma carga orgânica de DQO de  $2,4 \text{ g/L}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ . Os dados mostram um período de aproximadamente 45 ciclos de *start-up*, 34 ciclos em estado estacionário e 118 ciclos de testes com substâncias inibitórias. A sequência dos testes inibitórios foi a seguinte: (1) LG a 1%; (2) LG a 1,5%; (3) RO a 1%; (4) TO 1,5%; (5) MIX-GR 1,5%; (6) NO a 1,5%; e (C) DZ a 0,5%. A figura indica que o procedimento de injeção foi realizado nos Ciclos 78, 87, 99, 117, 138, 154 e 177. O último composto, comumente utilizado pela indústria do petróleo, foi considerado o controle experimental.

#### 7.4.2 Caracterização Cinética

A sequência de injeção de biocidas durante os testes no biorreator é mostrada na Figura 29. A primeira injeção composta por 1% (w/v) de lauril-glicosídeo (Figura 29). Os resultados mostram que o biofilme de BRS recuperou seu equilíbrio dinâmico dentro de 15 dias após a queda observada em torno de 50% em relação a remoção de DQO. Uma segunda injeção de maior concentração de lauril-glicosídeo (1,5% w/v) mostrou uma queda mais profunda na remoção de DQO, mas o sistema foi capaz de se recuperar dentro de 24 dias (Figura 29). Esse resultado exemplifica, que o aumento da concentração do inibidor não evitou que o sistema entrasse em processo de recuperação. Esse processo de recuperação está relacionado com a reconstituição da biomassa de BRS no biofilme. A cinética de recuperação foi semelhante ao primeiro teste. A taxa de consumo de DQO durante o período de recuperação foi de 6,12 e 5,25 mg l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para 1 e 1,5% (w/v) de lauril-glicosídeo, respectivamente (Tabela 11). Após a segunda injeção (Figura 29), a produção de sulfeto e taxa de consumo de sulfato diminuíram significativamente (82 e 100%, respectivamente).

Azzam et al (2012) estudaram o uso individual e em conjunto de surfactantes tiol catiônicos sintetizados e suas nanoestruturas (nanopoulos e nanopartículas de prata AgNPs) para inibir BRS. Os resultados mostraram que o uso dos surfactantes em conjunto com as nanoestruturas foram mais eficiente, ou seja, têm valores de diâmetro da zona de inibição mais elevados (17,14 e 17 mm/mg) e (16,18 e 15 mm/mg) no controle de BRS, comparado ao uso individual do surfactante (13, 12 e 13 mm / mg). Aiad et al (2013) avaliaram a síntese de três surfactantes gemini a base de Imidazólio e seus derivados como inibidores de corrosão em cobre e na atividade das BRS. Na concentração de 5000 ppm e no tempo de 96 h não houve crescimento de BRS.

Tabela 11: Caracterização cinética de DQO ou taxas de remoção de sulfato e produção de sulfeto durante o período de recuperação do estado estacionário do biorreator (definido acima de 85% a taxa de remoção de DQO), após o impacto provocado por injeções de biocidas distintas. Além disso, a tabela também mostra a cinética de remoção de DQO, taxas da remoção de sulfato e produção de sulfeto, caracterizando o ciclo de 72 h observado antes e após os testes com biocidas (abaixo).

Análises dos testes ou perfis cinéticos de 72 h	Substâncias inibidoras de BRS ou identificação da caracterização química antes e após os testes com biocidas	Período para recuperação das taxas de remoção da DQO após injeções de biocidas (dias)	Taxas de remoção da DQO durante o período de recuperação (esquerda), ou taxas de remoção da DQO no perfil de 72h (abaixo) ( $\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Taxas do consumo de Sulfato durante o período de recuperação (esquerda) ou taxas de consumo no perfil de 72h (abaixo) ( $\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Taxas de produção de Sulfeto durante o período de recuperação (esquerda) ou taxas de produção no perfil de 72h (abaixo) ( $\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
1	auryl- glycoside 1%, w/v)	15	6.12	6.48	2.26
2	auryl- glycoside 1.5%, w/v)	24	5.25	8.75	1.31
3	osmarinus officinalis 1% v/v)	42	3.55	0.36	0.10
4	tea-tree 1.5%, v/v)	48	4.37	0.24	0.06
5	Mix L. glycoside and R. officinalis 1.5 and 1%, v/v, respectivamente)	39	3.50	0.69	0.23
6	leem-oil 1.5%, v/v)	60	2.60	0.16	0.05
7	razomet (controle) 0.5%, v/v)	48	5.25	0.47	0.11
72 h Perfil	antes dos testes	NA	2.91	7.19	2.30
	após os testes	NA	2.73	6.81	1.45

Um terceiro teste foi iniciado após o biorreator atingir o equilíbrio dinâmico de remoção de DQO de aproximadamente 90% no 99º ciclo (Figura 29). Foi utilizado um óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* a 1% (v/v) durante a injeção. A injeção do biocida causou um impacto significativo nas taxas de remoção de DQO e sulfato e na produção de sulfeto. No entanto, logo após 5 ciclos operacionais (15 dias), a atividade BRS iniciou o processo de recuperação. A cinética da taxa de consumo de DQO aumentou  $3,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e o consumo de sulfato e produção de sulfetos em  $0,36$  e  $0,10 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 11).

A injeção de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (99º ciclo) resultou em um período mais longo de controle de BRS quando comparado ao efeito causado pelo lauril glicosídeo (Figura 29). O efeito resultante não foi apenas percebido no nível de toxicidade (lavagem de DQO), mas a substância também afetou as taxas de recuperação (Tabela 11). Portanto, matar mais células pode não ser a única variável que afeta a eficácia do biocida no controle da atividade de BRS nos sistemas dinâmicos. A diferença entre o efeito causado pela injeção de lauril glicosídeo e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* é provavelmente devido a fatores de diluição diferencial causados por diferentes taxas de solubilidade e difusão. O primeiro é altamente solúvel em água e não mostraria resistência significativa para a mistura com novo afluente (influyente) durante o processo de alimentação do biorreator. Portanto, essas experiências mostram que o efeito dos biocidas in situ não é apenas uma função da sua força tóxica, mas sua natureza química também pode desempenhar um papel importante.

Bendahou et al. (2006) e Velazquez-Gonzalez et al. (2014) usaram óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* na tentativa de controlar a corrosão microbiana. Os autores relataram que soluções que variam de 0,06 a 10% (v/v) poderiam reduzir significativamente a corrosão. Nesta pesquisa, a Tabela 11 mostra que os testes de MIC com o consórcio de BRS indicaram uma resposta efetiva de *Rosmarinus officinalis* em 1% (v/v). Esta foi a concentração utilizada no biorreator e os resultados indicaram que uma substância menos miscível pode apresentar maior tempo de retenção hidráulica dentro do reator e, conseqüentemente, pode causar um efeito mais prolongado.

O quarto biocida testado foi uma solução de óleo essencial Tea-Tree (*Melaleuca alternifolia*) a concentração de 1,5% (v/v) no 117º ciclo. A figura 29 mostra padrões de redução e recuperação semelhantes aos resultados obtidos com extrato de *Rosmarinus officinalis*. A remoção total de DQO foi recuperada em 48 dias. No primeiro ciclo após as injeções, a produção de sulfeto e as taxas de consumo de sulfato diminuíram em 78 e 89%, respectivamente (Figura 29). A cinética das taxas de remoção de DQO e sulfato recuperou-se com uma média de aproximadamente 4,37 e 0,24 mg l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 11). Existem vários estudos na literatura que avaliam o efeito antimicrobiano do óleo de Tea Tree, mas nenhum estudo foi encontrado em relação ao seu efeito contra a atividade de BRS. Por exemplo, Papadopoulos et al (2006) testaram o óleo essencial Tea-Tree contra *P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. fluorescência* e os autores relataram uma concentração efetiva em 4% (v/v). No entanto, Carson e Riley (1995) e Carson et al (2006) relataram uma concentração efetiva em torno de 0,5% em experimentos com *S. aureus* e *E. coli*. Neste estudo, uma concentração de óleo de Tea-Tree de 1,5% (v/v) não só foi capaz de impedir o crescimento de BRS por mais de 15 dias (densidade inicial de 108 células/ ml), mas também controlou a atividade de BRS por 48 dias.

O quinto biocida injetado no biorreator foi uma mistura combinando óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e lauril glicosídeo a uma concentração final de 1,5% (v/v) cada no 138º ciclo. A Figura 28 mostra que a mistura teve o efeito tóxico relatado anteriormente observado com o extrato de óleo de *Rosmarinus officinalis* no índice de remoção de DQO, mas a cinética da recuperação de DQO assemelhou-se aos valores reportados com lauril glicosídeo. Tal resultado sugere que a combinação de extratos de RO com o surfactante não mostrou interação toxicológica sinérgica. Pelo contrário, a adição de surfactante pareceu ter favorecido a diluição do óleo e, assim, reduzido o efeito prolongado observado anteriormente quando se utilizou apenas RO. Isso demonstra que a combinação de biocidas pode ter um impacto significativo no efeito desejado do controle da atividade de BRS. A hipótese do aumento da solubilização do óleo essencial pelo surfactante, sustentam a conclusão de que as taxas de diluição e difusão são fatores importantes para a determinação da eficácia do biocida dentro de um sistema dinâmico.

O sexto biocida injetado no biorreator foi uma solução a 1,5% (v/v) de extrato de óleo de Neem (azadiractina) no 154º ciclo. A figura 29 mostra o efeito mais significativo no controle da atividade BRS conforme avaliado pelas taxas de remoção de DQO. A produção de sulfeto e as taxas de redução de sulfato foram mínimas durante 15 ciclos consecutivos (0,05 e 0,16 mg l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente) e relação de remoção de DQO recuperada após 60 dias (Tabela 11). Portanto, o óleo essencial de Neem mostrou ser o melhor biocida para controlar a atividade BRS dentro do sistema dinâmico. Nahle et al. (2010) testaram a eficiência dos extratos de óleo de Neem como inibidor de corrosão (0,2 - 2 g l<sup>-1</sup>). Os autores relataram uma eficiência de inibição de cerca de 87%. Bhola et al. (2014) também avaliaram o efeito do extrato de óleo Neem no consórcio BRS (*Desulfovibrio africanus*, *Desulfovibrio alaskensis* e *Desulfomicrobium* sp). Os autores relataram que o extrato de Neem (4% v/v) reduziu as taxas de biocorrosão em 50%.

O sétimo e último biocida injetado no biorreator foi DZ (0,5% v/v) no 177º ciclo. Esta substância é comumente usada pela indústria petroquímica (Kaufman et al., 2008 e Erkenbrecher et al., 2015). Assim, este teste foi utilizado como controle experimental para comparação do efeito biocida na atividade das BRS. Os resultados do teste MIC (Tabela 10) indicaram uma concentração similar que é usada pela indústria do petróleo (experiência dos autores). A Figura 29 mostra que DZ causa a maior perda de biomassa microbiana (lavagem de DQO) no sistema e que os índices de remoção de DQO diminuiram mais de 90% em relação ao controle de estabilidade dinâmica. No entanto, a atividade das BRS começou a se recuperar no segundo ciclo após a injeção. A produção de sulfeto e as taxas de recuperação do consumo de sulfato foram de 0,11 e 0,47 mg l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Portanto, apesar do forte efeito causado pela DZ, as células bacterianas sobreviventes foram capazes de repovoar rapidamente o biorreator mostrando uma recuperação completa dentro de 48 dias. Estudo realizado pelo fabricante do DZ, comparou a eficiência do biocida com o glutaraldeído, utilizando meio sintético em testes de batelada *in vitro*, com intervalos de injeção das substâncias de 7 e 14 dias, com pH 9 e 6,5 por período de 28 dias para bactérias planctônicas e sesséis. A solução de Dazomet foi mais eficiente que o glutaraldeído a pH 9, reduzindo 6 logs bactérias/mL em quatro horas após aplicação, permanecendo por vinte e oito dias sob controle da atividade de BRS, a população inicial era 1x10<sup>6</sup>. Enquanto o glutaraldeído reduziu 4 logs em doze

horas, porém, perde o controle antes de 28 dias (<http://www.kemira.com>, página acessada em 22 de agosto de 2016).

Jenneman et al. (2010) propuseram uma alternativa para controle mais rápido e eficiente das BRS. Os autores sugeriram uma combinação de um biocida com um inibidor metabólico. Uma vantagem deste método é que, em combinação, essas substâncias são usadas em valores mais baixos de MIC. Isso contribui para reduzir o impacto ambiental. Outros pesquisadores como Gonçalves et al. (2002) testaram um biocida comercial a base de glutaraldeído e sal quaternário de amônio a concentração de 200 ppm em sistema dinâmico, por sete dias sendo aplicação no segundo e quarto dia, ou seja, injeção de choque intermitente. A concentração de bactérias sésses de  $1,1 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> foi reduzida a 17%. Entretanto, após sete dias foi constatado aumento, mostrando a baixa eficiência no controle da atividade de BRS.

Os resultados da presente pesquisa sugerem que as substâncias controladoras podem mostrar um efeito melhor se reaplicadas no momento correto para evitar a recuperação da população das BRS. A cinética de recuperação da redução de sulfato dentro de um sistema dinâmico (biorreator de leito fixo) pode auxiliar na definição de tal período. Assim, a definição da concentração correta de biocida (MIC) não é o único fator importante, deve também ser considerada a identificação da frequência correta na qual a substância é reaplicada *in situ*.

### 7.4.3 Caracterização da atividade microbiana

Para caracterizar a atividade microbiana durante os ciclos de bateladas no biorreator, foram realizados perfis físico-químicos e químicos (potencial redox, produção de sulfetos, consumo de sulfato e remoção de DQO) antes e após os testes com as substâncias inibidoras (Figura 30). Antes do período de teste (após aferida a estabilidade dinâmica do reator), a taxa de consumo de sulfato foi de  $7,19 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  associada a uma taxa de produção de sulfeto de  $2,3 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Tabela 11). Por outro lado, o perfil após o período de teste (novo equilíbrio dinâmico) mostra uma taxa de consumo de sulfato de  $6,81 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  associada a produção de sulfeto de  $1,45 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Tabela 11). Estes

resultados sugerem que a taxa de sulfato/sulfeto mudou numa razão de 3:1 ( $3 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1} \text{ SO}_4 : 1 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1} \text{ de H}_2\text{S}$ ) para 5:1 ( $5 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1} \text{ SO}_4 : 1 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1} \text{ de H}_2\text{S}$ ), aproximadamente, ou seja, antes dos testes com os biocidas o consumo de  $7,19 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  de  $\text{SO}_4$  gera  $2,3 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{S}$  e após os testes o consumo de  $6,81 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  de  $\text{SO}_4$  gera  $1,45 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{S}$ . Isso indica uma potencial alteração no equilíbrio das espécies microbianas dentro do reator como resultado dos testes.

No entanto, as taxas de remoção de DQO foram semelhantes antes e após o teste, os valores médios foram de  $2,91$  e  $2,73 \text{ mg DQO l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Figura 30). O potencial redox foi sempre inferior a  $-250 \text{ mV}$ . Estes resultados indicam que, apesar da potencial mudança nas interações das espécies microbianas, a atividade de redução do sulfato foi comparável e similarmente sustentada pelas fontes de carbono aplicadas ( $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ ). Observa-se também na figura 30C dos testes, que as taxas de crescimento microbiano das BRS nas primeiras 30 horas foi  $0,647/\text{BRS/h}$ , enquanto no período pos testes nas primeiras 36 horas a taxa de crescimento microbiano fo  $0,504/\text{BRS/h}$ . No entanto, após esses períodos tanto a concentração de DQO como de sulfato começam a ficar limitantes no sistema promovendo uma taxa de declínio de  $0,367/\text{BRS/h}$  antes e  $0,220/\text{BRS/h}$  depois dos testes de biocidas (Figura 30).

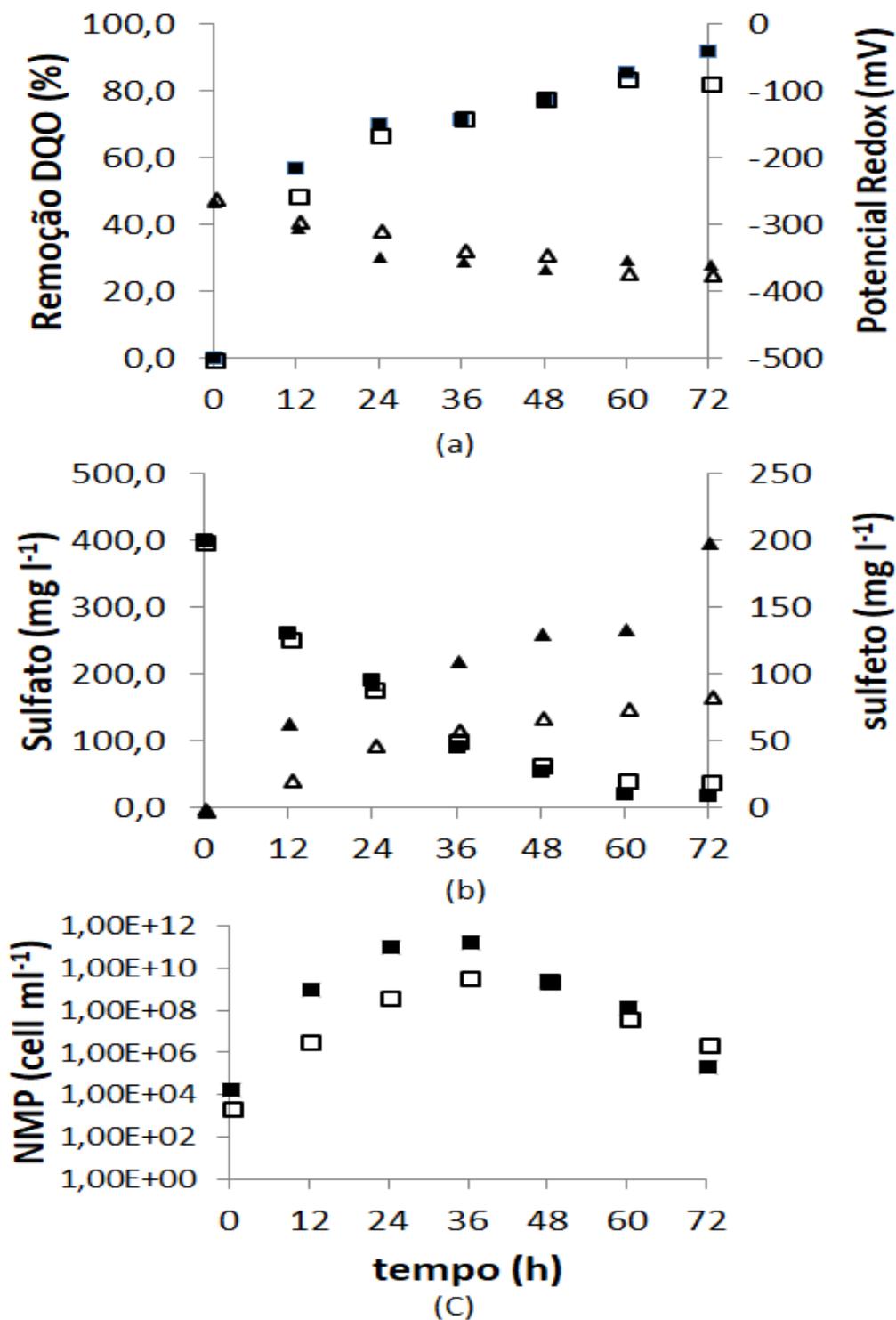


Figura 30: Perfil químico caracterizando um ciclo completo de 72 h obtido no período de estabilidade dinâmica do biorreator antes e após os testes de biocidas. O gráfico (a) mostra as variáveis químicas antes e depois dos testes de biocida como taxas de remoção de DQO (■ e □) e potenciais redox (▲ e Δ), respectivamente. O gráfico B mostra antes e depois das taxas de remoção de sulfato (■ e □) e taxas de produção de sulfeto (▲ e Δ), respectivamente. O gráfico C mostra variações de densidade das BRS nas amostras do biorreator (■ e □).

## 7.5 CONCLUSÃO

Esta pesquisa mostrou que o uso de um sistema dinâmico (biorreator) para avaliar o efeito do controle de biocida sobre a atividade de BRS produziu resultados muito mais precisos do que resultados em tubos de ensaio de bateladas de laboratório (MIC). Biocidas altamente tóxicos quase extinguiram a população das BRS, mas as células sobreviventes podem regenerar rapidamente o sistema. Portanto, o controle das BRS é de curta duração, requer injeções frequentes de biocidas e pode selecionar micróbios resistentes. Os testes mostraram que o controle de biocidas não deve afetar apenas o número de células mortas, mas também deve dificultar as taxas de recuperação das BRS. Os biocidas imiscíveis não só podem matar uma grande quantidade de células, como também podem controlar melhor as BRS, reduzindo suas taxas de recuperação dentro de um sistema dinâmico. Este resultado pode ser devido a sua lenta difusão através do sistema. Assim, o teste dinâmico ajudou claramente a definir a concentração mínima e o melhor intervalo de tempo para injeções de biocidas (reaplicação). O teste estático (MIC) por si só não pode ser responsável por tais informações.

## 7.6 REFERÊNCIAS

AIAD, I., EMAM, D., DEEB, A. E., ALRAHMAN, E. A., 2013. Novel Imidazolium-Based Gemini Surfactants: Synthesis, Surface Properties, Corrosion Inhibition and biocidal Activity Against Sulfate-Reducing Bacteria, *J Surfact Deterg* 16:927–935 DOI 10.1007/s11743-013-1491-z

AZZAM, E. M. S., SAMI, R. M., KANDILE, N. G., 2012. Activity Inhibition of Sulfate Reducing Bacteria Using Some Cationic Thiol Surfactants and Their Nanostructures *American Journal of Biochemistry*, 2(3): 29-35 DOI: 10.5923/j.ajb.20120203.

BENDAHOU, M., BENABDELLAH, M., AND HAMMOUTI, B. 2006. A Study of Rosemary Oil as a Green Corrosion Inhibitor for Steel in 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. *Pigment & Resin Technology* 35 (2): 95–100. <https://doi.org/10.1108/03699420610652386>.

BUZZINI, A.P., SAKAMOTO I.K., VARESCHE, M.B., PIRES, E.C., 2006. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry* 41, p. 168-176.

BHOLA, S. M., ALABBAS, F. M., BHOLA, R. et al. 2014. Neem Extracts as an Inhibitor for Biocorrosion Influenced by Sulfate Reducing Bacteria: A Preliminary Investigation. *Eng. Fail. Anal.* 36: 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2013.09.015>.

CARSON, C. F. AND RILEY, T. V. 1995. Antimicrobial Activity of the Major Components of the Essential Oil of *Melaleuca Alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* 78 (3): 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>.

CARSON, C. F., HAMMER, K. A., AND RILEY, T. V. 2006. *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *J. Clin. Microbiol.* 19 (1): 50–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>.

CONLETTE, C. O. 2014. Impacts of Tetrakis-hydroxymethyl Phosphonium Sulfate (THPS) Based Biocides on the Functional Group Activities of Some Oil Field Microorganisms Associated With Corrosion and Souring. *Br. Microbiol. Res. J.* 4 (12): 1463–1475. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/11943>.

DOS SANTOS, E. S., GRITTA, D. S., TAFT, C. A. et al. 2010. Molecular Dynamics Simulation of the Adenylylsulphate Reductase From Hyperthermophilic *Archaeoglobus Fulgidus*. *Mol. Simulat.* 36 (3): 199–203. <https://doi.org/10.1080/08927020903177658>.

ECKFORD, R. E. AND FEDORAK, P. M. 2002. Chemical and Microbiological Changes in Laboratory Incubations of Nitrate Amendment “Sour” Produced Waters From Three Western Canadian Oil Fields. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 (5): 243–254. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000304>.

ERKENBRECHER, C. W., NURNBERG, S., AND BREYLA, A. D. 2015. A Comparison of Three Nonoxidizing Biocides and Chlorine Dioxide in Treating Marcellus Shale Production Waters. *SPE Prod & Oper* 30 (4): 1–7. SPE-174560-PA. <https://doi.org/10.2118/174560-PA>.

GONÇALVES, J. N., 2002. “Ação de biocida a base de glutaraldeído e sal quaternário de amônio no controle de microrganismos sésseis: 22 CONBRASCORR – Congresso Brasileiro de Corrosão, Salvador – Ba.

GIEG, L. M., JACS, T. R., AND FOGHT, J. M. 2011. Biological Souring and Mitigation in Oil Reservoirs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2): 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>.

GOMEZ DE SARAIVA, S. G., GUIAMET, P. S., AND VIDELA, H. A. 2003. Prevention and Protection of the Effects of Biocorrosion and Biofouling Minimizing the Environmental Impact. *Rev. Metal.* 39: 49–54. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2003.v39.iExtra.1096>.

JENNEMAN, G. E., GREENE, A., AND VOORDOUW, G. 2010. Inhibition of Biogenic Sulfide Production Via Biocide and Metabolic Inhibitor Combination. US Patent 7,833,551 B2.

KAUFMAN, P. B., PENNY, G. S., AND PAKTINAT, J. 2008. Critical Evaluation of Additives Used in Shale Slickwater Fracs. Presented at the SPE Shale Gas Production Conference, Fort Worth, Texas, 16–18 November. SPE-119900-MS. <https://doi.org/10.2118/119900-MS>.

LAVANIA, M., SARMA, P. M., MANDAL, A. K. et al. 2011. Efficacy of Natural Biocide on Control of Microbial Induced Corrosion in Oil Pipelines Mediated by *Desulfovibrio Vulgaris* and *Desulfovibrio Gigas*. *J. Environ. Sci.* 23 (8): 1394–1402. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9).

LI, Y., JIA, R., AL MAHAMEDH, H. H. et al. 2016. Enhanced Biocide Mitigation of Field Biofilm Consortia by a Mixture of D-Amino Acids. *Front. Microbiol.* 7: 896. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00896>.

NAHLE, A., ABU-ABDOUN, I., ABDEL-RAHMAN, I. et al. 2010. UAE Neem Extracts as a Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in HCl Solution. *Int. J. Corros.* 2010: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/460154>.

NEMATI, M., JENNEMAN, G. E., AND VOORDOUW, G. 2001. Mechanistic Study of Microbial Control of Hydrogen Sulfide Production in Oil Reservoirs. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 424–434. <https://doi.org/10.1002/bit.1133>.

PAPADOPOULOS, C. J., CARSON, C. F., HAMMER, K. A. et al. 2006. Susceptibility of Pseudomonads to Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil and Components. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2): 449–451. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl200>.

POSTGATE, J. R. 1965. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 29: 425–441.

VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ, M. A., GONZALEZ-RODRIGUEZ, J. G., VALLADARES-CISNEROS, M. G. et al. 2014. Use of Rosmarinus Officinalis as Green Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in Acid Medium. *Am. J. Anal. Chem. (AJAC)* 5: 55–64. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.52009>.

XU, D., JIA, R., LI, Y. et al. 2017. Advances in the Treatment of Problematic Industrial Biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2203-4>.

XUE, Y. AND VOORDOUW, G. 2015. Control of Microbial Sulfide Production With Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating Bioreactors. *Front. Microbiol.* 6: 1387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01387>.

ZAIAT, M., & ABREU, S. B., 2008. Performance of Anaerobic-Aerobic Packed-Bed Reactor in the Treatment of Domestic Sewage. *Engenharia Sanitaria Ambiental* – vol.13 – Nº 2 , p. 181-188.

## Capítulo 8

### CONCLUSÃO GERAL

Os resultados mostraram que o sistema montado alcançou o equilíbrio dinâmico de remoção de DQO em 231 dias, esse fator foi um parâmetro importante para definir as condições de controle dos ensaios. Os testes evidenciaram que a atividade das BRS em biofilme tem condições de se recuperar da sua exposição a agentes inibidores, e que a velocidade de recuperação nem sempre está associada a concentração do agente químico. Nessa pesquisa ficou demonstrado que tanto as características hidráulicas do sistema dinâmico quanto a natureza do biocida são fatores importantes que afetam diretamente a velocidade de recuperação do biofilme sulfetogênico.

Observa-se que a aplicação dos óleos essenciais, impactaram na recuperação do sistema por mais tempo. A recuperação da atividade das BRS foi mais rápida com a utilização de químicos mais solúveis. A literatura apresenta diversos trabalhos sobre testes de inibição de BRS, no entanto, observa-se que *in situ* os casos de sucesso são infrequentes e específicos.

A eficiência de controle da atividade das BRS através da aplicação de biocidas nas doses previstas pelo MIC deve-se a natureza do produto e a hidrodinâmica da formação rochosa, como evidencia essa pesquisa. Esses testes são diferentes dos de batelada *in vitro*, porque a comunidade microbiana está em biofilme (que protege as células) e dentro de um reator de leito fixo e empacotado, o que permite que porções internas entrem em contato com diferentes concentrações dos biocidas. Tudo isso facilita a recuperação das populações microbianas que compõem o biofilme. Esse processo mimetiza o que acontece com o ambiente natural. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram a importância da utilização de novas alternativas para o controle de BRS.

## **8.1 Avaliação do sucesso das concentrações estimadas pelo MIC para o controle da atividade de BRS no biorreator**

Apesar de alguns autores reportarem que a aplicação de biocidas em reservatórios de petróleo muitas vezes não produzem resultados eficientes (Kjellerup et al., 2005; Lavania et al., 2011), pouco se explicou sobre o que poderia estar controlando negativamente tais variações. Com o uso do teste em biorreator, no entanto, essa pesquisa mostra que a atividade das BRS não apenas está associada a concentração do biocida utilizado mas, também, diretamente relacionada com a natureza do composto químico (solúvel/insolúvel) e a hidrodinâmica do sistema.

O teste hidrodinâmico do reator mostrou que o fluxo do fluido pela matriz de leito fixo adotou uma característica pistonada. O fluido é perfeitamente misturado na direção radial, mas, não é na direção axial. Isso significa que o biocida foi sendo diluído dentro do sistema e, apesar de matar uma quantidade significativa de BRS, como mostra a queda de remoção de DQO, bolsões de biofilme foram expostos a concentrações menos tóxicas desse biocida. Como consequência, os microrganismos sobreviventes foram capazes de rapidamente recolonizar todo o reator quando passado o efeito da aplicação do biocida.

Em um fluxo pistonado o tempo de residência de um “pistão”, ou fase mais concentrada de um biocida, é função da sua posição no reator e da velocidade do fluxo. Esse fenômeno é um pouco diferente quando se trata de substâncias não miscíveis em água. Nessa condição o biocida imiscível em água não se mistura com facilidade modificando a sua concentração quando em contato com o biofilme e o seu tempo de residência dentro do reator. Por esse motivo é que se observou um tempo mais longo no controle da recuperação da atividade das BRS. É por esse motivo que os testes da MIC não geram valores de aplicação de biocida que sejam uma orientação garantida para o controle da atividade das BRS nesses tipos de ambientes.

Na substância RO, 1% foi a concentração onde nenhuma batelada cresceu, no entanto, foi aplicada essa concentração no biorreator e em 12 ciclos as BRS voltaram a atividade normal. Nas substâncias LG, TO, MIX-GR e NO, 1,5% foi a concentração sem crescimento, porém, quando utilizado no biorreator a estabilidade de crescimento das

BRS retornam a 5 ciclos para a substância LG, 14 para C, 11 para MIX-GR e 17 para NO. Na substância DZ, 0,5% não apresentou crescimento, mas, apresentou sinais de atividade das BRS a partir do 7 ciclo e estabilidade dinâmica em 14 ciclos (Figura 29). Portanto, embora as concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% sejam tóxicas para as BRS em bateladas (Tabela 5), no sistema dinâmico essa toxicidade não controla a atividade de BRS por mais do que alguns ciclos, visto que a população de BRS se recupera rápido. Segundo Videla (2003), a eficácia do biocida depende da natureza dos microrganismos a eliminar e da escolha das condições de operação do sistema onde ocorrerá o tratamento. Recomenda-se, portanto, que os ensaios de laboratório sejam executados nas mesmas condições de operação do sistema, para se determinar o componente ativo mais apropriado, assim como a dose ótima do sistema a ser tratado (GAYLARDE e VIDELA, 1992; GUIAMET e GOMEZ DE SARAIVA, 2005).

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P.F., ALMEIDA, R.C.C., Carvalho, E.B., Souza, E.R., Carvalho, A.S., Silva, C.H.T.P., TAFT, C.A., 2006. Overview of sulfate reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*.

BHOLA, S. M., ALABBAS, F. M., BHOLA, R. et al. 2014. Neem Extracts as an Inhibitor for Biocorrosion Influenced by Sulfate Reducing Bacteria: A Preliminary Investigation. *Eng. Fail. Anal.* 36: 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2013.09.015>.

CARSON, C. F. AND RILEY, T. V. 1995. Antimicrobial Activity of the Major Components of the Essential Oil of *Melaleuca Alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* 78 (3): 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>.

DE JESUS, E.B. & DE ANDRADE LIMA, L.R.P. Simulation of the inhibition of microbial sulfate reduction in a two-compartment upflow bioreactor subjected to molybdate injection *Bioprocess Biosyst Eng* (2016) 39: 1201. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1598-5>

DOS SANTOS, E. S., GRITTA, D. S., TAFT, C. A. et al. 2010. Molecular Dynamics Simulation of the Adenylylsulphate Reductase From Hyperthermophilic *Archaeoglobus Fulgidus*. *Mol. Simulat.* 36 (3): 199–203. <https://doi.org/10.1080/08927020903177658>.

GAYLARDE, C.C., & VIDELA, H.A., 1994. Control of biofilms by biocides. *Corrosion Reviews* 12(12), 85-93.

GIEG, L. M., JACS, T. R., AND FOGHT, J. M. 2011. Biological Souring and Mitigation in Oil Reservoirs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2): 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>.

GOMEZ DE SARAIVA, S. G., GUIAMET, P. S., AND VIDELA, H. A. 2003. Prevention and Protection of the Effects of Biocorrosion and Biofouling Minimizing the Environmental Impact. *Rev. Metal.* 39: 49–54. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2003.v39.iExtra.1096>.

GUIAMET, P.S., & GÓMEZ DE SARAIVA, S. G., (2005). Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. *Latin American Applied Research*, 35(4), 295-300.

KJELLERUP, B.V., VEEH, R.H., SUMITHRARATNE, P., THOMSEN, T.R., BUCKINGHAM-MEYER, K., FROLUND, B., STURMAN, P., 2005. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 163-170.

LAVANIA, M., SARMA, P. M., MANDAL, A. K. et al. 2011. Efficacy of Natural Biocide on Control of Microbial Induced Corrosion in Oil Pipelines Mediated by *Desulfovibrio Vulgaris* and *Desulfovibrio Gigas*. *J. Environ. Sci.* 23 (8): 1394–1402. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9).

LI, Y., JIA, R., AL MAHAMEDH, H. H. et al. 2016. Enhanced Biocide Mitigation of Field Biofilm Consortia by a Mixture of D-Amino Acids. *Front. Microbiol.* 7: 896. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00896>.

NEMATI, M., JENNEMAN, G. E., AND VOORDOUW, G. 2001. Mechanistic Study of Microbial Control of Hydrogen Sulfide Production in Oil Reservoirs. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 424–434. <https://doi.org/10.1002/bit.1133>.

PAPADOPOULOS, C. J., CARSON, C. F., HAMMER, K. A. et al. 2006. Susceptibility of *Pseudomonads* to *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil and Components. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2): 449–451. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl200>.

PATEL, K.K., E VASHI, R.T., 2015. *Azadirachta Indica* Extract as corrosion Inhibitor for Copper in Nitric Acid Medium. *Research Journal of Chemical Sciences* v. 5(11), 59-66. ISSN 2231-606X.

RAMADAN, A. B., GHALY, M.F., HAMMAD, A.A., EL- SHAHAWY, M.R., AND ABDELRAHMAN, M.M., 2015. Assessment and Control of Sulfate Reducing Bacteria and Scales Formation in Sea Water Used in Cooling Systems of Abu-Qir and Ataka Power Stations, v. 4.

REDDY, M.V.B., ANGERS, P., GOSSELIN, A., ARUL, J., 1998. Characterization and use of essential oil from *thymus vulgaris* against *botrytis cinérea* and *rhizopus stolonifer* in strawberry fruits *Phytochemistry*, v. 47, n. 8, 1515-1520.

STREET, C.N., E GIBBS, A., 2010. Eradication of the corrosion-causing bacterial strains *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio desulfuricans* in planktonic and biofilm form using photodisinfection. *Corrosion Science* 52, 1447-1452.

VIDELA, H.A., 2002. Prevention and control of biocorrosion *International Biodeterioration & Biodegradation* 49, p. 259–270

VIDELA, H.A., 2003. “Detecção e Monitoramento da Biocorrosão”, em: Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais, p. 103, Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo.

VIANA, M. G. 2009. Avaliação de produtos naturais no controle de biofilmes formados em sistemas dinâmicos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Petróleo.

XU, D., JIA, R., LI, Y. et al. 2017. Advances in the Treatment of Problematic Industrial Biofilms. World J. Microbiol. Biotechnol. 33: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2203-4>.

XUE, Y. AND VOORDOUW, G. 2015. Control of Microbial Sulfide Production with Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating Bioreactors. Front. Microbiol. 6: 1387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01387>.

ZAIAT, M., & ABREU, S. B., 2008. Performance of Anaerobic-Aerobic Packed-Bed Reactor in the Treatment of Domestic Sewage. Engenharia Sanitaria Ambiental – vol.13 – Nº 2 , p. 181-188.

## 10 ANEXOS

### 10.1 TRABALHOS PUBLICADOS

**FERREIRA, JOALENE. A. S., ALMEIDA, P. F., NUNES DOS SANTOS, J., SAMPAIO, I. C., FRANÇA FIGUEIRÊDO, L., TERESKA, D., & CHINALIA, F. A.** 2018. Bioreactor for Accurately Assessing Biocide Effectiveness in Controlling Biogenic Souring in Mature Oil Wells. Society of Petroleum Engineers. doi:10.2118/191128-PA.

**SPE Journal**

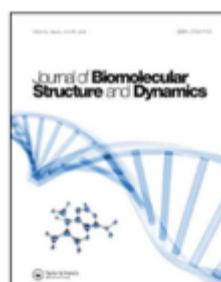


**Bioreactor for accurately assessing biocides effectiveness in controlling biogenic souring in mature oil wells**

Journal:	<i>SPE JOURNAL</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Technical Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ferreira, Joalene; Universidade Federal da Bahia, Sciences of Biointeractions Almeida , Paulo; Universidade Federal da Bahia Nunes, Jacson; Universidade Federal da Bahia Sampaio, Igor; Universidade Federal da Bahia França , Lais; Universidade Federal da Bahia Tereska, Daniel ; Universidade Federal da Bahia chinalia, fabio; Sciences of Biointeractions
Keywords:	Sulfate-reducing bacteria, souring, bioreactor, essential oil

SCHOLARONE™  
Manuscripts

SANTOS, ELIAS., FERREIRA, JOALENE. A. S., ALMEIDA, P. F., CHINALIA, F. A., MATOS, JOSILENE., NUNES DOS SANTOS. 2018. Screening of green inhibitors to the control of inner acidification of oil reservoirs through molecular docking studies with essential oils components. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. (Submetido)



**Screening of green inhibitors to the control of inner acidification of oil reservoirs through molecular docking studies with essential oils components**

Journal:	<i>Journal of Biomolecular Structure &amp; Dynamics</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santos, Elias; Federal University of Bahia, Physics Institute Santos Ferreira, Joalene; Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Biointeração de Almeida, Paulo; bInstituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Biointeração de Souza, Elias; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia Matos, Josilene; Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Biointeração dos Santos, Jacson; Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia Coqueiro, Gustavo; Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia Chinalia, Fábio; Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Biointeração
Keywords:	SIR, souring, essential oils, docking

## **10.2 APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSO**

**FERREIRA, JOALENE. A. S.**, SAMPAIO, I. C. F., NUNES, J., MATOS, J. B., ALMEIDA, P. F. Avaliação da População de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) em reator de Meio Poroso. 2015. 8º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Curitiba - PR.

**FERREIRA, JOALENE. A. S.**, CHINALIA, F. A., NUNES, J., ALMEIDA, P. F. Montagem e Start-up de Reator Anaeróbico para Testes de Inibição e Controle da Produção de H<sub>2</sub>S. 2015. 2015. 8º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Curitiba - PR.

# Bioreactor for Accurately Assessing Biocide Effectiveness in Controlling Biogenic Souring in Mature Oil Wells

J. A. S. Ferreira, P. F. Almeida, J. Nunes dos Santos, I. C. Sampaio, L. França Figueirêdo, D. Tereska, and F. A. Chinalia, Federal University of Bahia, Brazil

## Summary

Biocide injections are used for controlling biological souring in mature oil wells, but unpredictable results of such practices are also frequently reported. To address this problem, this research aimed to quantify the effect of four new biocides, and one commonly used biocide, within a dynamic system (packed-bed bioreactor) without using batch testing. The bioreactor was operated for 591 days, and the results showed that sulfate-reducing-bacteria (SRB) activity could recover within a period that varied from 15 to 60 days. Neem-oil (NO) (1.5% vol/vol) and 3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazine-2-thione (Dazomet, DZ) (0.5% vol/vol) were the most efficient in controlling SRB activity. The tests showed that the mechanistic interaction controlling souring is not only associated with the compounds' toxicity. Immiscible biocides not only killed cells, but they also can control SRB-recovery rates after the injection of biocides.

## Introduction

The production of sulfide ( $H_2S$ ) by SRB is a serious economic problem for the oil-and-natural-gas industry. Sulfide is a corrosive substance that not only affects oil quality, but it also affects oil production, transportation, and storage (Nemati et al. 2001; Gomez de Saraiva et al. 2003). Several types of biocides are used in trying to control SRB activity in situ (Nemati et al. 2001; Lohithesh et al. 2008; Xue and Voordouw 2015). However, long-term control depends mostly on after-the-fact assessments and dose-frequency applications (Walsh 2014; Conlette 2014; Xu et al. 2017). Numerous increasing reports associate the failure of biological sulfide control with the presence of biocide-resistant SRB (Nemati et al. 2001; Dos Santos et al. 2010; Lavania et al. 2011; Li et al. 2016; Xu et al. 2017). According to those authors, when these organisms are present, it is necessary either to increase biocide-application frequencies or to make use of a more toxic substance. However, the in-situ recovery of the SRB population may be associated with experimental limitations affecting the determination of the biocide minimum-required dose (Walsh 2014).

It is important to highlight that the type and the dose of biocide used for controlling SRB in situ are often determined based on laboratory batch trials (Gomez de Saraiva et al. 2003; Kjellerup et al. 2005; Lohithesh et al. 2008; Street and Gibbs 2010; Lavania et al. 2011). These experiments are often performed by directly exposing the SRB cells to the biocide within a static experiment (batch-tube testing). This is a significantly different situation compared to what can occur in situ. For instance, it has been reported that in-situ effective concentrations of tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS), benzyl trimethyl ammonium chloride (BTAC), and glutaraldehyde can vary anywhere from 10 to 200  $mg \cdot L^{-1}$  (Lavania et al. 2011). This is a significant variation compared with the results obtained with the laboratory batch testing using the planktonic and attached SRB cell (Wen et al. 2009). In such tests, biocides are often efficient at very low concentrations.

Environmental SRB may grow in biofilms or even dwell in microchannels within the rock-formation structure. In such a case, some SRB cells often survive the biocide application, and they serve as an inoculum for the repopulation of their natural environment. Very little information is available about the speed of this process. Batch testing can assist only in determining the minimum required dose of biocides.

Packed-bed reactors are used for creating a dynamic environment in which the bacterial population is exposed differently to the injected substances (Gieg et al. 2011; Xue and Voordouw 2015). Bacterial cells may protect themselves by forming biofilm, growing attached to the stationary substrate (packed-bed), and the bioreactor's operating condition generates a distinct biocide-concentration gradient within such an engineered environment. Thus, SRB biocide testing using packed-bed bioreactors may provide a better understanding of environmental factors controlling SRB activity in situ than batch testing (Gieg et al. 2011).

The aim of this research is to use a sulfate-reducing packed-bed bioreactor to test and quantify the effect of new and commonly used biocides targeting SRB activity within a dynamic environment rather than using the standard batch laboratory testing. To achieve a reliable control for the tests, a sulfate-reducing bacterial consortium obtained from a mature oil well was used to inoculate a bioreactor, which was operated for 591 days.

## Materials and Methods

**Experimental Design.** The diagram shown in Fig. 1 describes the rationale used in the experiments. The first part was the determination of the SRB minimum-inhibitory-concentration (MIC) values for five distinct biocides using the batch-testing approach. The tested substances were (i) surfactant lauryl glucoside (LG), (ii) *Rosmarinus officinalis* essential oil (RO), (iii) tea-tree essential oil (TO), (iv) NO, and (v) (DZ). This last compound is often used as biocide by the oil industry because it does not interfere with friction reducers and it is extremely effective in killing bacteria (Kaufman et al. 2008). Consequently, this compound also was adopted as the experimental control during the discussion of the results.

The second part was the assembly and operation of a packed-bed sulfate-reducing bioreactor (Fig. 2). The bioreactor was inoculated with environmental SRB cells, and it was fed a Postgate-rich medium within a 72-hour cycle for 591 days. Hence, the system was recharged every 72 hours with a Postgate chemical-oxygen-demand (COD) loading ratio of 2.4  $g \cdot L^{-1} \cdot cycle^{-1}$ . The bioreactor's startup and steady-state phases were distinctively identified. Such phases are the baseline control for assessing the biocide effectiveness in controlling SRB activity within the bioreactor. Each phase was identified on the basis of COD-removal, sulfide-production, and sulfate-consumption rates.

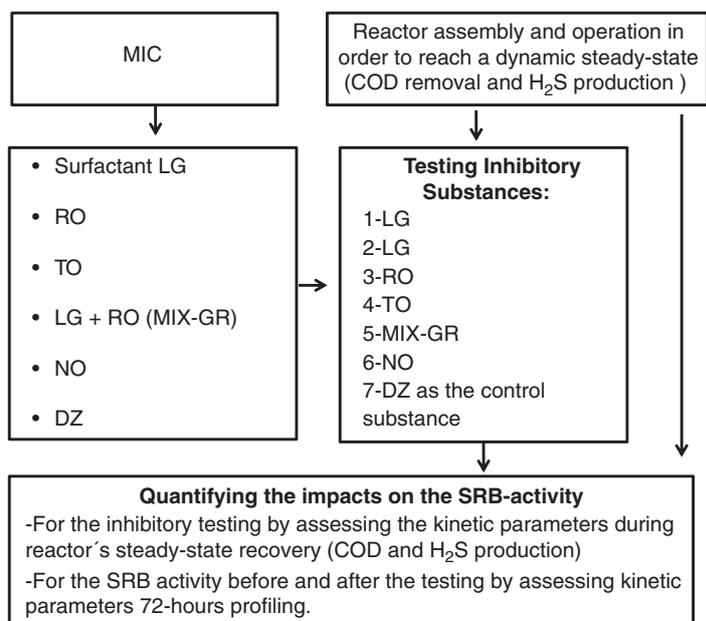


Fig. 1—Diagram showing the experimental steps used in this study. Four potential biocides and the control DZ were tested. The MICs of each biocide against SRB activity were determined using a microbial consortium isolated from mature oil wells. The same consortium was inoculated within a bioreactor. The bioreactor was operated for 591 days with a batch hydraulic-retention time of 72 hours and a COD-loading ratio of  $2.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cycle}^{-1}$ . The influent used was based on SRB Postgate medium. Biocide injections were conducted separately, and their resultant perturbations on the bioreactor's steady-state baseline were assessed as variations on COD and sulfate-consumption and sulfide-production rates.

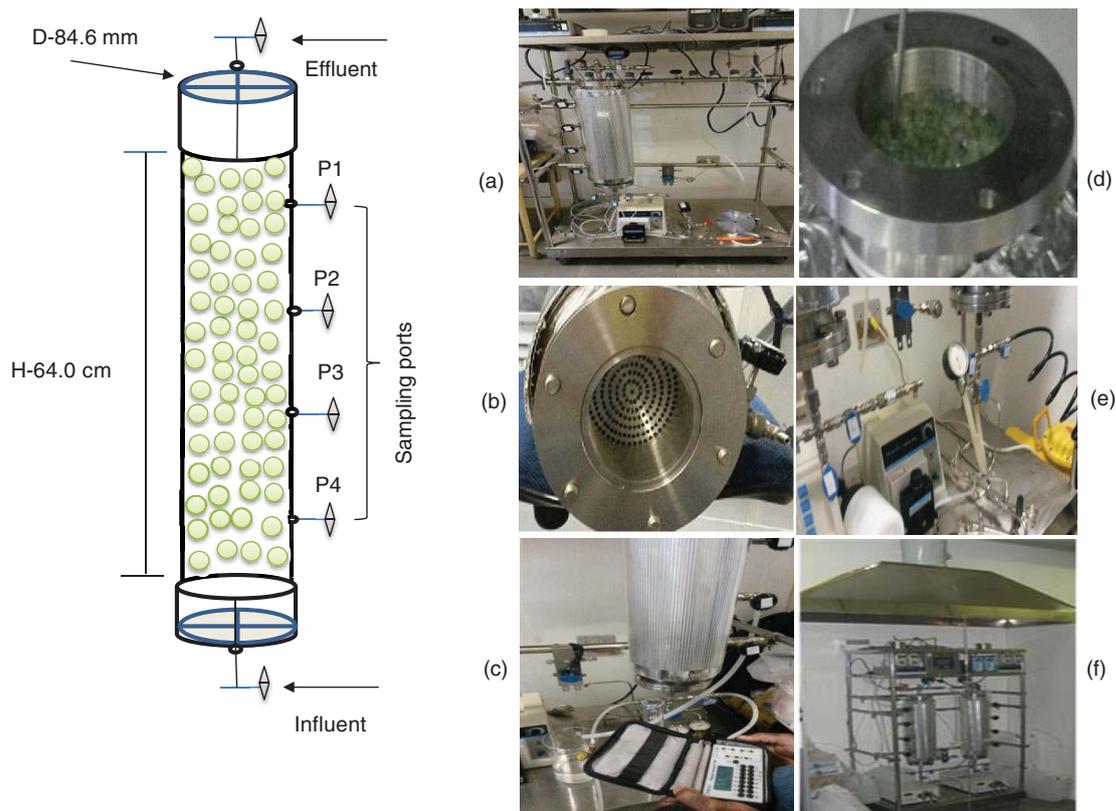


Fig. 2—Bioreactor schematics showing the external supporting frame (a); the influent diffusing system (b); the device used for monitoring internal pressure and temperature (c); the basket containing the glass pearls used for biofilm support (d); the external source of nitrogen gas for avoiding oxygen contamination (e); and the final view of the working bioreactor station, which is accessed in the top by a gas collector to minimize potential accidents with sulfide leaks (f).

The third part started after the definition of the steady-state phase. Each biocide (alone or in mixture as shown in Fig. 1) was injected within the bioreactor in distinct events at their respective MICs. Their effect on COD removal, sulfide production, and sulfate consumption was compared with the steady-state phase (baseline control). It should be highlighted that each distinct injection only occurred after

the total recovery of the steady-state phase (a minimum of four cycles at a COD-removal ratio greater than 85%). The final test was then conducted with the control biocide, DZ.

A 72-hour chemical profiling (batch-cycle characterization) was conducted, before and after the introduction of the biocides, to quantify a potential microbial shift caused by the testing (Fig. 1).

**MIC Test.** Batch testing was used to define the MIC value of each substance affecting SRB activity in vitro (Fig. 1). SRB cells were harvested at the end of the exponential phase, resuspended in phosphate buffer and 1-cm<sup>3</sup> inoculum (10<sup>12</sup> cells), and then transferred to experimental serum bottles containing 9 cm<sup>3</sup> of culture medium amended with the distinct biocide concentrations (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, and 2.5; see **Table 1**). These anaerobically sealed serum bottles were incubated at 38°C for 28 days. SRB activity was detected by the formation of iron sulfide (FeS).

Concentrations (%)	LG (wt/vol)	RO (vol/vol)	TO (vol/vol)	MIX-GR (vol/vol)	NO (vol/vol)	DZ (Thione) (vol/vol) (control)
0.25	+++	+++	+++	+++	++	+
0.5	++	++	++	++	+	---
1.0	+	---	+	+	+	---
1.5	---	---	---	---	---	---
2.0	---	---	---	---	---	---
2.5	---	---	---	---	---	---

+ few, ++ average, and +++ high indication of SRB growth  
 — no growth

Table 1—MIC values obtained for the five test biocides and mixture. Tests were conducted in batch anaerobic cultures incubated for 28 days.

**Bioreactor Design.** The bioreactor design used in this study was a 3.6-L cylindrical-shaped device filled with irregular glass beads (1–3 mm) as the support for microbial growth (Fig. 2). The remaining working volume was 1.4 L, the base of the bioreactor was the point of influent injection, and the effluent collected at the top. Fig. 2 shows that the bioreactor was equipped with four lateral sampling ports. A peristaltic pump provided the influent feeding into the system at a rate of 8 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup> during the feeding phase (approximately 20 minutes). The bioreactor sustained a gas-collection system controlled by pressure (2.5 kgf·cm<sup>-2</sup>). Temperature (38 ± 2°C) was controlled by an electric jacket (800-W electrical resistance insulated by a heating mantle). The bioreactor was made of super-duplex stainless steel UMS S32750 (SAF 2507, Sandvik Steel), which is resistant to the presence of H<sub>2</sub>S or similar corrosives.

**Operating Conditions.** The period of the system operation was 591 days, with a batch hydraulic-retention time of 72 hours. Thus, the system was recharged every 72 hours with a Postgate COD-loading ratio of 2.4 g·L<sup>-1</sup>·cycle<sup>-1</sup>. The influent used was based on an SRB Postgate medium (Postgate 1965). The influent contained the following per liter: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 g; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g; CaCl<sub>2</sub>, 1.0 g; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.83 g; yeast extract, 1.0 g; ascorbic acid, 0.1 g; sodium thioglycolate, 0.013 g; sodium citrate, 6.38 g; sodium lactate, 1.75 g; and NaCl, 3.5%. All components were dissolved in distilled water, and the pH was adjusted to 7.5. After this, the solution was homogenized by agitation and later sterilized at 121°C for 30 minutes, which produced a COD value of approximately 5 g·L<sup>-1</sup>.

The generic stoichiometric reaction exemplifying COD consumption and the sulfate-reducing metabolism is characterized in Eq. 1. In this formula, organics are generalized as (CH)<sub>n</sub>:



On Day 1, an SRB-enriched microbial consortium isolated from mature oil wells (Recôncavo Baiano, Bahia, Brazil) was used for the bioreactor's inoculation. There was no other inoculation event during the operation of the bioreactor. The amount of inoculum introduced into the bioreactor was 10% (vol/vol) from a microbial culture containing 10<sup>8</sup> SRB cells/cm<sup>3</sup>.

**Biocide Testing and SRB-Activity Profiling.** The bioreactor received biocide injections only after certifying that the dynamic stability had been reached (a minimum of four cycles at a COD-removal ratio greater than 85%). The sulfate-reducing process was monitored with COD and sulfate consumption and H<sub>2</sub>S-production rates. Supplementation of biocide in the influent occurred at the inhibitory concentration observed during the batch MIC testing. Chemical profiling monitored the metabolic conditions of the bioreactor before and after the testing.

**Sampling and Analytic Measurements.** COD-removal rates, sulfate consumption, and sulfide production were performed according to Jirka and Carter (1975), Christison et al. (2011), and Domingos et al. (2012), respectively.

Samples for sulfide quantification were first amended with a solution containing zinc acetate and sodium hydroxide (2 and 5% wt/vol, respectively), and color development was quantified in a Bio-Tek EL800 spectrophotometer (630 nm). An additional method using methylene blue served as a comparison (Cline 1969). A Thermo Orion PerpHect Meter (Model 330) performed readings of redox potential (Eh) and pH values (according to the manufacturer's instructions).

**SRB Enumeration.** SRB density was assessed with a most-probable-number (MPN) technique. A serial dilution of a given sample was inoculated into a serum bottle containing Postgate medium. Samples were monitored for 28 days with SRB quantification using the MPN table for triplicates (Eckford and Fedorak 2002; Hulecki et al. 2009; Gieg et al. 2011).

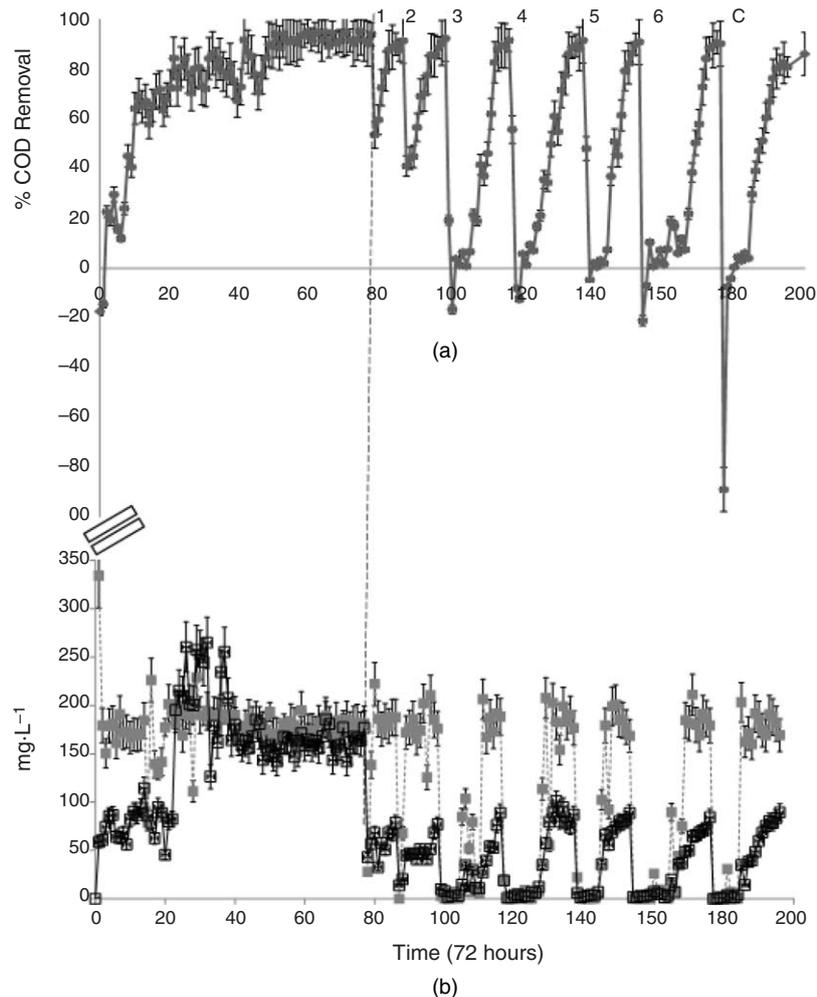
**Substances Tested for Controlling SRB Activity.** Six different chemicals (LG), three essential oils (RO, TO, and NO), and a biocide used by the oil industry (DZ) served as SRB-controlling agents. LG molecular weight is 508 Da, with a critical micellar concentration

(CMC) of approximately  $79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The RO and TO essential oils were supplied by Solua Comercial Limited, Brazil, and the NO extract (azadirachtin) was supplied by Insetimax Indústria Química Limited, Brazil. DZ AMA-324 was provided by Kemira Chemical Limited, Brazil. Folk medicine makes use of some essential oils because of their antimicrobial properties. The gas-chromatography/mass-spectrometry analysis showed that the major components found in RO are 1,8-cineol (38.5%), camphor (17.1%),  $\alpha$ -pinene (12.3%), limonene (6.23%), camphene (6.00%), and linalool (5.70%). TO contains terpinen-4-ol (48%),  $\gamma$ -terpinene (28%), 1,8 cineole (15%), and  $\alpha$ -terpinene (13%). The NO extract shows significant concentrations of linoleic acid (34%), oleic acid (20%), stearic acid (20%), and palmitic acid (18%). However, it is not yet known whether antimicrobial activity is a result of one of those major specific substances or a result of their combination.

## Results and Discussion

Enhanced-oil-recovery techniques often can promote the growth of SRB, which is commonly controlled with the injection of biocides (Gieg et al. 2011; Shaban et al. 2013; Erkenbrecher et al. 2015). The estimation of effective biocide concentrations is based routinely on a serial-batch toxicity testing known as the MIC test. The effective concentration is that responsible for causing a  $5\text{-log}_{10}$  kill of cells in a single treatment. Table 1 shows the MIC results performed with four potential biocides and the proposed control, DZ. The results indicate that all six tested biocides show significant kill rates ( $>5 \text{ log}$ ) at very low concentrations (1–1.5% wt/vol or vol/vol).

With the bioreactor, however, the results show that SRB activity can recover rapidly from biocide applications at the MIC values (Fig. 3). COD- and sulfate-removal rates or sulfide-production rates exhibit significant recovery within a short period of time.



**Fig. 3—(a) COD-removal ratios and (b) sulfate (■) or sulfide (□) consumption and production, respectively. The bioreactor was operated for a period of 590 days with a hydraulic-retention time of 72 hours and a COD-loading ratio of  $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cycle}^{-1}$ . The influent used was based on SRB Postgate medium. Data show a period of approximately 45 cycles of startup, 34 cycles in steady-state, and 122 cycles of biocide testing. The sequence of biocide testing was indicated as follows (vol/vol): (1) LG at 1%; (2) LG at 1.5%; (3) RO at 1%; (4) TO at 1.5%; (5) a mix of RO and LG at 1.5%; (6) NO at 1.5%; and (7) DZ at 0.5%. The figure indicates that the injection procedure was conducted at Cycles 78, 87, 99, 117, 138, 154, and 177. The last compound, commonly used by the oil industry, was considered the experimental control.**

The bioreactor was operated for 591 days (197 batch cycles of 72 hours each) with a Postgate-medium COD-loading rate of  $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cycle}^{-1}$ . COD-removal ratios reached steady-state equilibrium at the 46th cycle (the end of the startup period). Yet, the bioreactor was monitored for approximately 35 cycles (105 days) before starting the tests with biocide injections. The results of this long steady-state monitoring period were used as the baseline control for assessing biocide effectiveness during the tests with the toxic substances. Biocide injections were performed at Cycles 78, 87, 99, 117, 138, 154, and 177 as indicated in Fig. 3. The figure shows a significant decrease in COD- and sulfate-removal rates associated with a decrease in sulfide production immediately after the moment of the biocide injections. The negative COD-removal-rate values observed in the first two cycles and during the biocide-testing period are caused by the excess of inoculum in the former and microbial washout in the latter.

The sequence of biocide injections during the test is shown in Fig. 1. The first injection was composed of 1%-wt/vol LG (Fig. 3). The results show that the control baseline of COD-removal ratios recovered within 15 days after the observed 50% drop in value. A second injection of a higher LG concentration (1.5% wt/vol) showed a deeper drop in COD-removal ratios, but the system could recover within 24 days at a similar recovery rate (Fig. 3). COD-consumption-rate kinetics details during the recovery period were 6.12 and 5.25 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> for 1 and 1.5% (wt/vol) of LG, respectively (Table 2).

Analysis of the Tests or 72-hour Kinetic Profiling	SRB-Inhibiting Substances or Identification of Chemical Characterization Before and After Biocide Testing	Period for the Recovery of COD-Removal Rates After Biocide Injection (days)	COD-Removal Rates During the Recovering Period (left), or COD-Removal Rates in the 72-hour Profiling (bottom) (mg·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Sulfate-Consumption Rates During Recovering Period (left) or the Consumption Rates in the 72-hour Profiling (bottom) (mg·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Sulfide-Production Rates During the Recovering Period (left) or the Production Rates in the 72-hour Profiling (bottom) (mg·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
1	LG (1%, wt/vol)	15	6.12	6.48	2.26
2	LG (1.5%, wt/vol)	24	5.25	8.75	1.31
3	RO (1%, vol/vol)	42	3.55	0.36	0.10
4	TO (1.5%, vol/vol)	48	4.37	0.24	0.06
5	MIX-GR (1.5 and 1%, vol/vol, respectively)	39	3.50	0.69	0.23
6	NO (1.5%, vol/vol)	60	2.60	0.16	0.05
7	DZ (Thione) (0.5%, vol/vol) (control)	48	5.25	0.47	0.11
72-hour profiling	Before the tests	NA	2.91	7.19	2.30
	After the tests	NA	2.73	6.81	1.45

Table 2—Kinetic characterization of COD- or sulfate-removal and sulfide-production rates during the period of bioreactor steady-state baseline recovery (defined as greater-than-85% COD-removal ratio) after the impact caused by distinct biocide injections. The table also shows the kinetics of COD- or sulfate-removal and sulfide-production rates characterizing the 72-hour cycle observed before and after biocide testing (bottom).

After the second injection (Fig. 3), sulfide-production and sulfate-consumption ratios decreased significantly (82 and 100%, respectively). It was noted that the apparent production of sulfide would never recover to the values observed during the steady-state equilibrium control phase before starting the tests with the biocides. Sulfide concentrations were very difficult to assess accurately probably because of technical impediments. Nevertheless, variables such as pH and sulfide trapping solution were carefully monitored. COD- and sulfate-consumption rates always seemed to be in significant agreement, and these results indicate that SRB activity recovered rapidly (Fig. 3). LG MIC value was 1% (Table 1), but none of the tested concentrations (1 and 1.5% wt/vol) hindered the sulfate-reducing bioreactor from recovering high COD- and sulfate-consumption rates. The difference between the recovery periods (15 and 24 days, Table 2) was directly associated with the number of cells killed (COD washout) rather than with COD-removal rates (6.12 and 5.25 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, Table 2). Thus, it would appear, at first glance, that killing more cells by increasing biocide concentrations would be the best alternative for managing SRB activity.

A third test started after the bioreactor reached a COD-removal-ratio baseline of approximately 90% in the 99th cycle (Fig. 3). A 1% (vol/vol) RO was used during the injection. Biocide injection caused a significant impact in COD- and sulfate-removal rates and sulfide production. However, after just five operating cycles (15 days), the SRB activity started the recovering process. The kinetics of COD-consumption rate increased by 3.5 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> and sulfate consumption and sulfide production by 0.36 and 0.10 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively (Table 2). Thus, COD-removal ratios recovered to the baseline values observed for the steady-state control phase within 42 days (Fig. 3).

Rosemary essential-oil injection (99th cycle) resulted in a longer period of SRB control compared with the effect caused by LG (Fig. 3). The resultant effect was not only perceived in the toxicity level (COD washout), but the substance also affected the recovery rates (Table 2). Therefore, killing more cells may not be the only variable affecting biocide effectiveness in controlling SRB activity within dynamic systems. The difference between the effect caused by the injection of LG and rosemary essential oil is probably because of the differential dilution factors caused by distinct solubility and diffusion rates. The former is highly water-soluble, and it would not show significant resistance for mixing with new influent during the bioreactor's feeding process. Thus, these experiments show that the biocides' effect in situ is not only a function of their toxic strength, but their chemical nature also can play an important part.

Bendahou et al. (2006) and Velázquez-González et al. (2014) used rosemary essential oil to control microbial corrosion. The authors reported that solutions ranging from 0.06 to 10% (vol/vol) could meaningfully reduce corrosion. In this research, Table 1 shows that the MIC tests with SRB consortium indicated a rosemary-oil effective response at 1% (vol/vol). This was the concentration used in the bioreactor, and the results indicated that a less-miscible substance may show higher hydraulic-retention time within the reactor and, consequently, can have a more-prolonged effect.

The fourth biocide tested was a TO solution (*Melaleuca alternifolia*) at a 1.5% (vol/vol) concentration in the 117th cycle. Fig. 3 shows reduction and recovery patterns resembling the results obtained with rosemary-oil extract. Total COD-removal ratio recovered within 48 days. In the first cycle after the injections, sulfide-production and sulfate-consumption rates decreased to 78 and 89%, respectively (Fig. 3). The kinetics of COD- and sulfate-removal rates recovered, showing an average of approximately 4.37 and 0.24 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively (Table 2). There are several studies in the literature testing the antimicrobial effect of TO, but no study was found regarding its effect against SRB activity. For instance, Papadopoulos et al. (2006) tested TO against *P. aeruginosa*, *P. putida*, and *P. fluorescens*, and the authors reported an effective concentration at approximately 4% (vol/vol). However, Carson and Riley

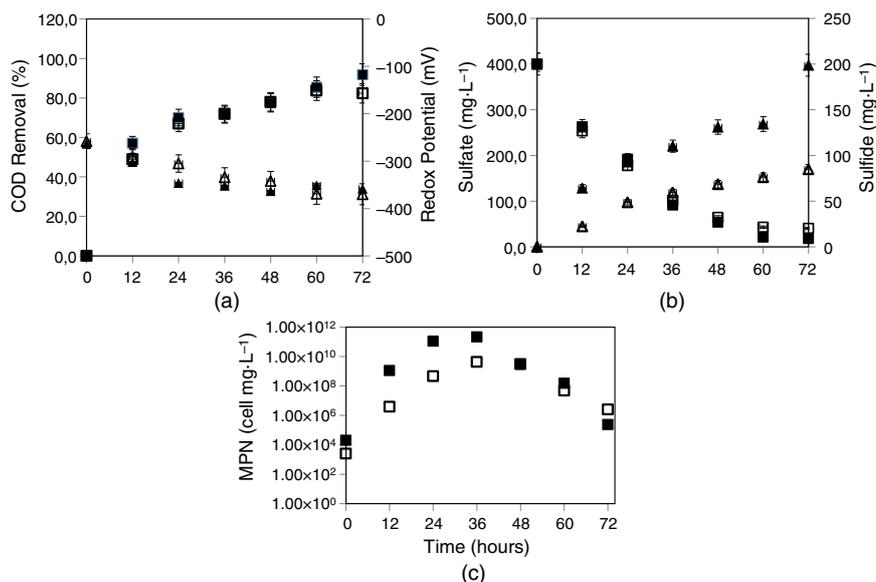
(1995) and Carson et al. (2006) reported an effective concentration of approximately 0.5% in experiments with *S. aureus* and *E. coli*. In this study, a TO concentration of 1.5% (vol/vol) was not only capable of hindering SRB growth for more than 15 days (initial density of  $10^8$  cells/cm<sup>3</sup>), but it also controlled SRB activity for 48 days.

The fifth biocide injected into the bioreactor was a blend combining RO and LG at a final concentration of 1.5% (vol/vol) each in the 138th cycle. Fig. 3 shows that the blend had the previous reported toxic effect observed with RO extract in COD-removal ratio, but the kinetics of COD recovery resembled the values reported with LG. Such a result suggests that the combination of RO extracts with the surfactant did not show a synergistic toxicological interaction. On the contrary, the addition of surfactant seemed to have favored the dilution of the oil extract and, thus, reduced the prolonged effect observed previously when using just RO. This demonstrates that the combination of biocides can have a significant impact on the desired effect of controlling SRB activity. The hypothesis of increased solubilization of the essential oil by the surfactant would support the conclusion that dilution and diffusion rates are both important factors for defining biocide effectiveness within a dynamic system.

The sixth biocide injected in the bioreactor was a 1.5% (vol/vol) solution of NO extract (azadirachtin) at the 154th cycle. Fig. 3 shows the most significant effect on controlling SRB activity as assessed by COD-removal rates. Sulfide-production and sulfate-reduction rates were minimal during 15 consecutive cycles (taking from 0.05 and 0.06 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively), and COD-removal ratio rates recovered after 60 days (Table 2). Consequently, NO was shown to be the best biocide for controlling SRB activity within the dynamic system. Nahlé et al. (2010) tested the efficiency of NO extracts as corrosion inhibitor (0.2 to 2 g·L<sup>-1</sup>). The authors reported an inhibition efficiency of approximately 87%. Bhola et al. (2014) also have evaluated the effect of NO extract on SRB consortium (*Desulfovibrio africanus*, *Desulfovibrio alaskensis*, and *Desulfomicrobium* sp.). The authors reported that NO extract (4% vol/vol) reduced biocorrosion rates by 50%.

The seventh and last biocide injected in the bioreactor was DZ (0.5% vol/vol) at the 177th cycle. This substance is commonly used by the petrochemical industry (Kaufman et al. 2008 and Erkenbrecher et al. 2015). Hence, this test was used as the experimental control for comparing the biocide's effect on SRB activity. The MIC-test results (Table 1) indicated that a similar concentration is used currently by the oil industry (authors' experience). Fig. 3 shows that DZ causes the highest loss of microbial biomass (COD washout) in the system, and COD-removal ratios decreased more than 90% compared with the control baseline. Nevertheless, SRB activity started recovering in the second cycle after the injection. Sulfide-production and sulfate-consumption recovery rates were 0.47 and 0.11 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively. Accordingly, regardless of the strong effect caused by DZ, the surviving bacterial cells were capable of rapidly repopulating the bioreactor, showing a complete recovery within 48 days. Jenneman et al. (2010) proposed an alternative approach for better controlling of the SRB's fast response to biocide applications. The authors suggested a combination of an SRB biocide with a metabolic inhibitor. An advantage of this method is that, in combination, such substances are used at lower MIC values. This contributes to reducing environmental impact. The results of the present research suggest that the controlling substances can show a better effect if reapplied at the correct moment to avoid SRB-population recovery. Sulfate-reducing recovery kinetics within a dynamic system (packed-bed bioreactor) can assist in defining such a period. Thus, the definition of the correct biocide concentration (MIC) is not the only important factor, but consideration also must be given to the identification of the correct frequency with which the substance is reapplied in situ.

To characterize the microbial activity during the batch cycle, both physicochemical and chemical profiling (redox potential, sulfide production, sulfate consumption, and COD-removal ratio) were performed before and after the tests (Fig. 4). Before the period of testing (steady-state equilibrium), sulfate-consumption rate was 7.19 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, and this was associated with a sulfide-production rate of 2.3 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (Table 2). However, the profiling after the period of testing (new steady-state equilibrium) showed a sulfate-consumption rate of 6.81 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> associated with a sulfide-production rate of 1.45 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (Table 2). These results suggest that the sulfate/sulfide ratio has shifted from 3:1 to 5:1, approximately. This indicates a potential change in the balance of microbial species within the reactor resulting from the tests. Nevertheless, COD-removal rates were similar before and after the test; average values were 2.91 and 2.73 mg COD·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 4). The redox potential was always lower than -250 mV. These results indicate that, despite the potential shift in microbial-species interactions, the sulfate-reducing activity was comparable and similarly sustained by the applied carbon sources (2.4 g·L<sup>-1</sup>·cycle<sup>-1</sup>). The next step in this research is to test the kinetics of SRB activity within a bioreactor operated under conditions closer to those of the environment (carbon sources and packed-bed matrix).



**Fig. 4—Chemical profiling characterizing a full 72-hour cycle was obtained in the steady-state period before and after biocide testing. Fig. 4a shows chemical variables before and after biocide testing as COD-removal rates (■ and □) and redox potential (▲ and △), respectively. Fig. 4b shows before and after sulfate-removal rates (■ and □) and sulfide-production rates (▲ and △), respectively. Fig. 4c shows SRB density variations on the bioreactors sample. Standard error variations were mostly less than 10% of the mean values.**

## Conclusion

This research showed that the use of a dynamic system (bioreactor) for assessing a biocide-controlling effect over SRB activity produced far more accurate results than batch test-tube results (MIC). Highly toxic biocides could almost extinguish SRB populations, but surviving cells quickly can reforest the system. Therefore, in this way, SRB control is short-lived, and such control methods require frequent biocide injections, with all the concomitant costs—financial and environmental—and these treatments do not eradicate resistant microbes. The tests show that biocide control should not only affect the number of killed cells, but it should also hinder SRB-recovery rates. Immiscible biocides not only can kill numerous cells, but they also can more effectively control SRB by reducing their recovery rates within a dynamic system. This result may be because of their slow diffusion through the system. Thus, this dynamic testing clearly assisted in testing not only the effect of minimal concentration but also the best interval of time for biocide reapplication. Batch testing (MIC) alone cannot yield for such information.

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Brazilian Research Council CNPq for the following Grants 402822/2013-7 and 309909/2014-7.

## References

- Bendahou, M., Benabdellah, M., and Hammouti, B. 2006. A Study of Rosemary Oil as a Green Corrosion Inhibitor for Steel in 2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. *Pigment & Resin Technology* **35** (2): 95–100. <https://doi.org/10.1108/03699420610652386>.
- Bhola, S. M., Alabbas, F. M., Bhola, R. et al. 2014. Neem Extracts as an Inhibitor for Biocorrosion Influenced by Sulfate Reducing Bacteria: A Preliminary Investigation. *Eng. Fail. Anal.* **36**: 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2013.09.015>.
- Carson, C. F. and Riley, T. V. 1995. Antimicrobial Activity of the Major Components of the Essential Oil of Melaleuca Alternifolia. *J. Appl. Bacteriol.* **78** (3): 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>.
- Carson, C. F., Hammer, K. A., and Riley, T. V. 2006. Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *J. Clin. Microbiol.* **19** (1): 50–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>.
- Christison, T., Pang, F., and Lopez, L. 2011. *Determination of Inorganic and Organic Acids in Apple and Orange Juice Samples Using Capillary IC*. Sunnyvale, California: Thermo Fisher Scientific.
- Cline, D. J. 1969. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters. *Limnol. Oceanogr.* **14** (3): 454–458. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454>.
- Conlette, C. O. 2014. Impacts of Tetrakis-hydroxymethyl Phosphonium Sulfate (THPS) Based Biocides on the Functional Group Activities of Some Oil Field Microorganisms Associated With Corrosion and Souring. *Br. Microbiol. Res. J.* **4** (12): 1463–1475. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/11943>.
- Domingos, J. S. S., Regis, A. C. D., Santos, J. V. S. et al. 2012. A Comprehensive and Suitable Method for Determining Major Ions From Atmospheric Particulate Matter Matrices. *J. Chromatogr. A.* **1266**: 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.074>.
- Dos Santos, E. S., Gritta, D. S., Taft, C. A. et al. 2010. Molecular Dynamics Simulation of the Adenylylsulphate Reductase From Hyperthermophilic Archaeoglobus Fulgidus. *Mol. Simulat.* **36** (3): 199–203. <https://doi.org/10.1080/08927020903177658>.
- Eckford, R. E. and Fedorak, P. M. 2002. Chemical and Microbiological Changes in Laboratory Incubations of Nitrate Amendment “Sour” Produced Waters From Three Western Canadian Oil Fields. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29** (5): 243–254. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000304>.
- Erkenbrecher, C. W., Nurnberg, S., and Breyla, A. D. 2015. A Comparison of Three Nonoxidizing Biocides and Chlorine Dioxide in Treating Marcellus Shale Production Waters. *SPE Prod & Oper* **30** (4): 1–7. SPE-174560-PA. <https://doi.org/10.2118/174560-PA>.
- Gieg, L. M., Jacs, T. R., and Foght, J. M. 2011. Biological Souring and Mitigation in Oil Reservoirs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92** (2): 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>.
- Gomez de Saraiva, S. G., Guiamet, P. S., and Videla, H. A. 2003. Prevention and Protection of the Effects of Biocorrosion and Biofouling Minimizing the Environmental Impact. *Rev. Metal.* **39**: 49–54. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2003.v39.iExtra.1096>.
- Hulecki, J. C., Foght, J. M., Gray, M. R. et al. 2009. Sulfide Persistence in Oil Field Waters Amended With Nitrate and Acetate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36** (12): 1499–1511. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0639-3>.
- Jenneman, G. E., Greene, A., and Voordouw, G. 2010. Inhibition of Biogenic Sulfide Production Via Biocide and Metabolic Inhibitor Combination. US Patent 7,833,551 B2.
- Jirka, A. M. and Carter, M. J. 1975. Micro Semi-Automated Analysis of Surface and Waste Waters for Chemical Oxygen Demand. *Anal. Chem.* **47** (8): 1397–1402. <https://doi.org/10.1021/ac60358a004>.
- Kaufman, P. B., Penny, G. S., and Paktinat, J. 2008. Critical Evaluation of Additives Used in Shale Slickwater Fracs. Presented at the SPE Shale Gas Production Conference, Fort Worth, Texas, 16–18 November. SPE-119900-MS. <https://doi.org/10.2118/119900-MS>.
- Kjellerup, B. V., Veeh, R. H., Sumithraratne, P. et al. 2005. Monitoring of Microbial Souring in Chemically Treated, Produced-Water Biofilm Systems Using Molecular Techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32** (4): 163–170. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0222-5>.
- Lavania, M., Sarma, P. M., Mandal, A. K. et al. 2011. Efficacy of Natural Biocide on Control of Microbial Induced Corrosion in Oil Pipelines Mediated by *Desulfovibrio Vulgaris* and *Desulfovibrio Gigas*. *J. Environ. Sci.* **23** (8): 1394–1402. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60549-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60549-9).
- Li, Y., Jia, R., Al Mahamedh, H. H. et al. 2016. Enhanced Biocide Mitigation of Field Biofilm Consortia by a Mixture of D-Amino Acids. *Front. Microbiol.* **7**: 896. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00896>.
- Lohithesh, M. D., Agnihotri, A. K., and Lal, B. 2008. Control of Sulfate Reducing Bacteria in Oil and Gas Pipelines. Presented at the Abu Dhabi International Petroleum Exhibition and Conference, Abu Dhabi, 3–6 November. SPE-118410-MS. <https://doi.org/10.2118/118410-MS>.
- Nahlé, A., Abu-Abdoun, I., Abdel-Rahman, I. et al. 2010. UAE Neem Extracts as a Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in HCl Solution. *Int. J. Corros.* **2010**: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/460154>.
- Nemati, M., Jenneman, G. E., and Voordouw, G. 2001. Mechanistic Study of Microbial Control of Hydrogen Sulfide Production in Oil Reservoirs. *Bio-technol. Bioeng.* **74**: 424–434. <https://doi.org/10.1002/bit.1133>.
- Papadopoulos, C. J., Carson, C. F., Hammer, K. A. et al. 2006. Susceptibility of Pseudomonads to Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil and Components. *J. Antimicrob. Chemother.* **58** (2): 449–451. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl200>.
- Postgate, J. R. 1965. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriol. Rev.* **29**: 425–441.
- Shaban, S. M., Saied, A., Towfit, S. M. et al. 2013. Corrosion Inhibition and Biocidal Effect of Same Cationic Surfactants Based on Schiff Base. *J. Ind. Eng. Chem.* **19** (6): 2004–2009. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.03.013>.
- Street, C. N. and Gibbs, A. 2010. Eradication of the Corrosion-Causing Bacterial Strains *Desulfovibrio Vulgaris* and *Desulfovibrio Desulfuricans* in Planktonic and Biofilm Form Using Photodisinfection. *Corros. Sci.* **52** (4): 1447–1452. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2009.12.022>.
- Velázquez-González, M. A., Gonzalez-Rodriguez, J. G., Valladares-Cisneros, M. G. et al. 2014. Use of Rosmarinus Officinalis as Green Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in Acid Medium. *Am. J. Anal. Chem. (AJAC)* **5**: 55–64. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.52009>.

- Walsh, J. M. 2014. Water Management for Hydraulic Fracturing in Unconventional Resources—Part 5: Methods for Controlling Biological Activity. *Oil and Gas Fac* **3** (1): 10–15.
- Wen, J., Zhao, K., and Gu, T. 2009. A Green Biocide Enhancer for the Treatment of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) Biofilms on Carbon Steel Surfaces Using Glutaraldehyde. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63** (8): 1102–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.007>.
- Xu, D., Jia, R., Li, Y., et al. 2017. Advances in the Treatment of Problematic Industrial Biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2203-4>.
- Xue, Y. and Voordouw, G. 2015. Control of Microbial Sulfide Production With Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating Bioreactors. *Front. Microbiol.* **6**: 1387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01387>.

**F. A. Chinalia** is currently a senior researcher at Federal University of Bahia (UFBA), Brazil. Before his current assignment at UFBA, he worked for two European institutions—National University of Ireland Galway and Cranfield University, UK. Chinalia is currently the program manager for the post-graduation course in biotechnology at UFBA. He is experienced in microbial ecophysiology, the operation of bioreactors at different redox potentials (aerobic/anaerobic), biodegradation, toxicity testing, and waste-to-bioenergy evaluations (methane and algal biodiesel). Since 2002, Chinalia has managed several funded projects, published a book and several articles, and submitted patents related to applied microbial bioprocesses. He holds a PhD degree in environmental microbiology from Aberdeen University, UK.

**Joaqueline de Azevedo Santos Ferreira** is currently a PhD-degree candidate in industrial engineering at UFBA. Previously, she worked for 22 years for Kordsa Global S/A as an engineer focusing on implementing energy-optimization strategies. Ferreira holds several biotechnological patents and is currently working on biological processes for recovering oil from mature wells.

**Paulo Fernando de Almeida** is a full professor at UFBA. He is an accomplished researcher in applied microbiology, having published 56 articles and 3 books and authored 27 patents, and is actively contributing to the development of human resources to work with advanced biotechnologies applied in the recovery of oil and natural gas from mature fields (Brazilian Governmental Organization for Oil and Gas–PRH-49, UFBA-ANP). Almeida's principal interest is the study and control of the biogenic production of sulfide.

**Jacson Nunes dos Santos** is currently head of the technical-support team in the biotechnology post-graduate program at UFBA. He has 30 years of experience working for oil companies such as Petrobras. Santos holds an MS degree in industrial engineering from UFBA.

**Igor Carvalho Fontes Sampaio** is a PhD-degree candidate in the biotechnology post-graduate course at UFBA. He has specialized in petroleum microbiology, working with fluorescence in-situ hybridization and molecular biology, targeting specific sulfate-reducing bacterial groups and archaea.

**Laís França Figueirêdo** is a biological science undergraduate student at Catholic University of Brazil, focusing on the control of biogenic sulfide generated through oil-recovery strategies applied to mature wells.

**Daniel Tereska** is an MSc-degree student in the biotechnology post-graduate course at UFBA, studying the reuse of industrial wastes for the production of biopolymers and enzymes that can be used for second-generation ethanol production, microbial inhibition, and oil recovery.

**UFBA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA POLITÉCNICA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI**

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA

CEP: 40.210-630

Telefone: (71) 3283-9800

E-mail: [pei@ufba.br](mailto:pei@ufba.br)

Home page: <http://www.pei.ufba.br>

