

**MAÍRA PAULA DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DE BACTERÍOFAGOS EM SISTEMAS DE  
FLUXO DINÂMICO (*LOOPINGS*) PARA CONTROLE DE BIOFILMES E  
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Coorientadores: Cynthia Canedo Silva  
Roberto Sousa Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S725a  
2023  
Sousa, Máira Paula de, 1981-  
Avaliação da tecnologia de bacteriófagos em sistemas de  
fluxo dinâmico (*loopings*) para controle de biofilmes e bactérias  
redutoras de sulfato na indústria do petróleo / Máira Paula de  
Sousa. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (302 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.245>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bacteriófagos. 2. Petróleo - Biodegradação. 3. Biofilmes.  
4. Sulfeto de hidrogênio. I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.  
III. Título.

CDD 22. ed. 579.26


**MAÍRA PAULA DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA TECNOLOGIA DE BACTERÍOFAGOS EM SISTEMAS DE FLUXO DINÂMICO (*LOOPINGS*) PARA CONTROLE DE BIOFILMES E BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 07 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 MAIRA PAULA DE SOUSA  
Data: 31/05/2023 10:12:05-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Maíra Paula de Sousa  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 SERGIO OLIVEIRA DE PAULA  
Data: 31/05/2023 10:41:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Sérgio Oliveira de Paula  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, amigos e familiares, pela paciência, apoio e carinho;

Ao CENPES - Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS, em especial à minha antiga gerência BIO – Gerência de Biotecnologia, onde este trabalho começou e à minha atual gerência TMEC – Gerência de Tecnologias para Materiais e Corrosão, pela continuidade dos esforços de P&D que seguem viabilizando o desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos para a indústria do petróleo;

A todos os amigos e colegas, pesquisadores excepcionais e inestimáveis do CENPES, que contribuíram de inúmeras maneiras diferentes com este trabalho, em especial aos amigos do Grupo de Pesquisa em Biocorrosão e Acidulação Biogênica, sem os quais eu não poderia ter realizado a pós-graduação e todas as atividades inerentes a este trabalho;

À UFV - Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar a pós-graduação, de modo que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

A todos os professores e colaboradores do Departamento de Microbiologia da UFV, pelo empenho e dedicação às atividades acadêmicas, de pesquisa e extensão que contribuem na formação profissional dos estudantes de pós-graduação com o mais alto nível de excelência do país (conceito 7 da CAPES);

Ao meu orientador e amigo prof. Sérgio Oliveira de Paula; ao coorientador e amigo Roberto de Sousa Dias; e, à coorientadora e amiga prof<sup>a</sup>. Cynthia Canedo Silva, pela orientação, coordenação, discussões, amizade, incentivo e parceria de mais de dez anos, desde o início do desenvolvimento desta pesquisa;

Aos laboratórios da UFV, LIVM – Laboratório de Imunovirologia Molecular e LAMP – Laboratório de Microbiologia Ambiental Aplicada e a todos os estudantes e profissionais excelentes de suas equipes;

E, em especial ao meu namorado-amigo-marido-companheiro, Marlos Reury de Paula, que sempre me incentivou e me apoiou, com muita paciência, atenção e carinho, ao longo desta trajetória, possibilitando a finalização desta Tese de Doutorado em meio aos imprevistos de uma pandemia (Covid-19) e frente às rotinas do dia a dia e desafios do trabalho concomitante no CENPES/PETROBRAS.

*“A ciência não passa do bom senso exercitado e organizado”*

Aldous Huxley

*“Para o bem e para o mal, os vírus ajudaram a moldar nossa evolução e nos tornar  
quem somos”*

American Museum of Natural History

## RESUMO

SOUSA, Maíra Paula de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação da tecnologia de bacteriófagos em sistemas de fluxo dinâmico (*Loopings*) para controle de biofilmes e bactérias redutoras de sulfato na indústria do petróleo.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Cynthia Canedo Silva e Roberto Sousa Dias.

A aplicação da tecnologia de bacteriófagos na indústria do petróleo tem sido considerada uma alternativa promissora para o controle de contaminações microbianas associadas à biocorrosão e à geração biogênica de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Essas contaminações estão presentes ao longo de toda a cadeia produtiva do petróleo, representando riscos ocupacionais e operacionais. Seu controle se dá principalmente pela aplicação de biocidas que, em geral, apresentam um baixo poder de penetração em biofilmes e, portanto, são pouco eficazes. Isso ocorre devido às substâncias extracelulares produzidas pelos microrganismos, que funcionam como uma barreira de proteção. Nesse contexto, os bacteriófagos podem conferir vantagens sobre os biocidas, uma vez que: podem se multiplicar no ambiente, possibilitando a redução da dosagem; possuem enzimas capazes de romper a matriz dos biofilmes, conferindo poder de penetração e maior eficácia; e, podem apresentar menores impactos ocupacionais, operacionais e ambientais. O presente trabalho teve como objetivos: **(i)** avaliar em sistemas de fluxo dinâmico (*Loopings*) o efeito de coquetéis fágicos sobre biofilmes enriquecidos com bactérias redutoras de sulfato (BRS), representativos de tanques de plataformas de petróleo; e, **(ii)** avaliar um coquetel fágico pré-selecionado quanto a potenciais impactos ambientais e operacionais. Os resultados obtidos demonstraram que os fagos avaliados possuem ação sobre esses biofilmes, com redução de cerca de 80% do H<sub>2</sub>S gerado e indicaram efeito na desaceleração do processo de corrosão e de formação de *pits*. Além disso, o coquetel fágico pré-selecionado, apresenta características vantajosas em comparação aos biocidas, tanto do ponto de vista ambiental (menor ecotoxicidade e maior biodegradabilidade), quanto operacional (menor corrosividade e menor impacto sobre o processo de nitrificação do sistema de tratamento biológico de água de produção).

Palavras-chave: Biocorrosão. Corrosão Influenciada por Microrganismos. Acidulação Biogênica. Bactérias Redutoras de Sulfato. Sulfeto de Hidrogênio. H<sub>2</sub>S. Bacteriófagos.

## ABSTRACT

SOUSA, Maíra Paula de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Evaluation of bacteriophage technology in dynamic flow systems (*Loopings*) to control biofilms and sulfate-reducing bacteria in oil industry.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Cynthia Canedo Silva and Roberto Sousa Dias.

The application of bacteriophage technology in the oil industry has been considered a promising alternative for the control of microbial contamination associated with biocorrosion and the biogenic generation of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). These contaminations are present throughout the oil productive chain, representing occupational and operational risks. Its control is mainly based biocide application that, in general, have a low penetration power in biofilms and, therefore, are not very effective. This is due to the extracellular substances produced by microorganisms, which act as a protective barrier. In this context, bacteriophages can confer advantages over biocides, since: they can multiply in the environment, allowing the dosing reduction; they have enzymes with the ability to break the biofilm matrix, providing penetration power and greater effectiveness; and may have lower occupational, operational and environmental impacts. The present work had the following objectives: **(i)** to evaluate in dynamic flow systems (*Loopings*) the effect of phage cocktails on biofilms enriched with sulfate-reducing bacteria (SRB), representatives of oil platform tanks; and **(ii)** to evaluate a pre-selected phage cocktail regarding potential environmental and operational impacts. The results obtained showed that the evaluated phages have action on these biofilms, with a reduction about 80% of the H<sub>2</sub>S generated and indicated an effect in slowing down the processes of corrosion and pit formation. In addition, the pre-selected phage cocktail has advantageous characteristics compared to biocides, both from an environmental (lower ecotoxicity and greater biodegradability) and from an operational point of view (lower corrosivity and lower impact on the nitrification process of the biological treatment system of production water).

Keywords: Biocorrosion. Microbial Influenced Corrosion. Biogenic Souring. Sulphate Reducing Bacteria. Hydrogen Sulfide. H<sub>2</sub>S. Bacteriophages.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistemas da etapa de perfuração de poços de petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....29
- Figura 2.** Sistemas da etapa de completção de poços de petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....30
- Figura 3.** Sistemas da etapa de produção do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....31
- Figura 4.** Processo de geração biogênica de H<sub>2</sub>S no interior dos reservatórios de petróleo estimulado pela injeção de água do mar e consequente produção de petróleo e água produzida com altos níveis de contaminação microbiana e H<sub>2</sub>S (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....34
- Figura 5.** Sistemas da etapa de escoamento do petróleo em plataformas susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....35
- Figura 6.** Sistemas da etapa de escoamento e armazenamento do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....36
- Figura 7.** Sistemas da etapa de refino do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....37
- Figura 8.** Sistemas da etapa de armazenamento e distribuição de derivados do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016). .....38
- Figura 9.** Corrosão influenciada por microrganismos (MIC - microbiologically influenced corrosion) devido à formação de células de aeração diferencial ocasionada pela deposição de biofilmes em superfícies metálicas (SKOVHUS; ENNING; LEE, 2017). .....54
- Figura 10.** Corrosão influenciada por microrganismos (MIC - microbiologically influenced corrosion) devido à ação de microrganismos sulfetogênicos. **(A)** Na biocorrosão elétrica (EMIC) os elétrons (e<sup>-</sup>) são extraídos diretamente do ferro metálico (Fe<sup>0</sup>) gerando ferro(II) (Fe<sup>2+</sup>); o sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) é utilizado como aceptor final de elétrons gerando sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S); o Fe<sup>2+</sup> reage com o H<sub>2</sub>S ou com o bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) presente na água, formando depósitos de sulfeto de ferro (FeS) e carbonato de ferro (FeCO<sub>3</sub>), respectivamente; e, o excesso de elétrons captados pode ser liberado na forma de H<sub>2</sub> ao reagir com H<sup>+</sup> via hidrogenases. **(B)** Na biocorrosão química (CMIC), os compostos orgânicos (representados genericamente como "<CH<sub>2</sub>O>") são utilizados como doadores de elétrons, enquanto o sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

) é utilizado como aceptor final de elétrons; os compostos orgânicos e o  $\text{SO}_4^{2-}$  são reduzidos gerando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e  $\text{H}_2\text{S}$ ; o  $\text{H}_2\text{S}$  reage com o  $\text{Fe}^0$ , resultando em depósitos de  $\text{FeS}$ ; e, o  $\text{H}_2$  liberado penetra e se acumula nas microfissuras do metal provocando a fragilização por  $\text{H}_2$  (ENNING; GARRELF, 2014). .....57

**Figura 11.** Representação esquemática das etapas do ciclo de vida de biofilmes, seguida de imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes representativos das respectivas etapas: **(1) adesão inicial; (2) adesão irreversível; (3) maturação inicial; (4) biofilme maduro e (5) dispersão** (KARAGULER; KAHRAMAN; TUTER, 2017; VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019). .60

**Figura 12.** Representação esquemática da corrosão influenciada por microrganismos na superfície interna de um duto, demonstrando o baixo poder de penetração de biocidas, cuja ação se limita às camadas superficiais do biofilme. Modificado a partir de AMCA (2021). .....62

**Figura 13. (A)** Caixa de inspeção de uma faixa de dutos de escoamento de petróleo. **(B)** Trecho do duto desenterrado atravessando o interior da caixa de inspeção (escada de acesso ao fundo da imagem). **(C)** Sistema de monitoramento para gerenciamento da corrosão interna de dutos, o qual pode conter sonda corrosivimétrica e corpos de prova para avaliação da taxa de corrosão por perda de massa e quantificação microbiológica de biofilmes (SILVA; et al., 2008a, 2008b). .....64

**Figura 14. (A)** Um PIG (Pipeline Inspection Gauge) sendo introduzido em um lançador de PIG para início da passagem por um duto (NORD STREAM, 2021). **(B)** Um PIG sendo retirado de um duto após sua passagem, trazendo consigo os resíduos removidos das paredes internas do duto (PIPING WORLD, 2019). .....66

**Figura 15. (A)** Equipe entrando em um tanque de armazenamento de petróleo para realização da limpeza. **(B)** Limpeza interna de um tanque por jateamento (CHRYSALIDIS; KYZAS, 2020). .....66

**Figura 16.** Comparação do efeito de produtos biocidas e produtos biostáticos. No tratamento controle, o microrganismo exibe uma proliferação logarítmica. A aplicação de um produto biostático (ou de um produto biocida em concentrações muito baixas) inibe a proliferação, mas não reduz o número de células viáveis. A aplicação de um produto biocida reduz o número de células viáveis (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). .....71

**Figura 17.** Principais biocidas utilizados na indústria e sua posição relativa em um gradiente quanto à sua velocidade de ação e tempo de proteção. Os biocidas oxidantes estão representados em letras vermelhas e os biocidas não-oxidantes estão representados por letras roxas (biocidas líticos), rosas (biocidas eletrofílicos) e azuis (biocidas preservantes). **HClO** (ácido hipocloroso); **ClO<sub>2</sub>** (dióxido de cloro); **O<sub>3</sub>** (Ozônio); **PAA** (ácido peracético); **PFA** (ácido perfórmico); **DBNPA** (2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamida); **Acroleína** (2-propenal); **Quats** (aminas quaternárias); **TTPC** (cloreto de tributiltetradecilfosfônio); **Glut** (glutaraldeído); **THPS** (sulfato de tetrakis(hidroxi metil)fosfônio); **MBT** (metileno-bis(tiocianato)); **Bronopol** (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol); **THNM** (tris(hidroxi metil)nitrometano); **CMIT/MIT** (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona); **CTAC** (cloreto de 1-(cis-3-cloroalil)-3,5,7-triaza-1-azônia-

adamantano); **DMO** (4,4-dimetil-oxazolidina); **Dazomet** (3,5-dimetiltetrahydro-1,3,5-tiadiazinona-2-tiona); **MBO** (3,3'-metilenobis(5-metiloxazolidina)). Modificado de DOW MICROBIAL CONTROL (2013) e WALDOW; SOUSA e OLIVEIRA (2019). ..... 73

**Figura 18.** Estrutura molecular do biocida BAC - benzalkonium chloride – cloreto de benzalcônio (PUBCHEM, 2021a). ..... 76

**Figura 19.** Estrutura molecular do biocida THPS - Sulfato de Tetrakis Hidroximetil Fosfônio (PUBCHEM, 2021b). ..... 78

**Figura 20.** Representação molecular da reação de dissociação do biocida THPS (sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio) em solução aquosa, gerando o composto THP (tris hidroximetil fosfina), o qual apresenta a atividade antimicrobiana (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). ..... 79

**Figura 21.** Representação molecular das reações de oxidação e hidrólise (Sharma *et al.*, 2018) de conversão do THP (tris hidroximetil fosfina) a THPO (óxido de tetrakis hidroximetil fosfônio) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). ..... 80

**Figura 22.** Estrutura molecular do biocida DBNPA - 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide - 2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamida (PUBCHEM, 2021c). ..... 81

**Figura 23.** Estrutura molecular do biocida glutaraldeído, GA - glutaraldehyde ou Glut (PUBCHEM, 2021d). ..... 82

**Figura 24.** Estrutura molecular do glutaraldeído e um exemplo de reação de ligação cruzada (KAWAHARA *et al.*, 1997) onde cada uma das duas biomoléculas possui um grupo amina primária que é atacado por um dos grupos aldeído do glutaraldeído (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). ..... 83

**Figura 25.** Rotas de degradação sob condições óxicas e anóxicas do glutaraldeído no meio ambiente (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). ..... 84

**Figura 26.** Estrutura básica de um bacteriófago, indicando **(1) o capsídeo**, um arranjo complexo de **proteínas estruturais** que protege o **genoma viral**; e, **(2) a cauda**, que contém **fibras proteicas**, onde se localizam as proteínas de reconhecimento dos receptores da célula hospedeira, e uma **bainha contrátil**, que atua no processo de injeção do genoma viral na célula. Modificado de BIOPORTEFOLIO (2015). ..... 87

**Figura 27.** Ciclo lítico de um bacteriófago, indicando as etapas de: **(1) adesão** da partícula viral à superfície da célula microbiana; **(2) penetração** da parede microbiana e **injeção** do genoma viral; **(3) síntese de proteínas** virais e **replicação do genoma** viral; **(4) montagem** de novas partículas virais; e, **(5) lise** da célula com **liberação** das novas partículas virais para o meio, reiniciando o ciclo. Modificado de KIM (2015).. 88

**Figura 28.** Redução da bioluminescência emitida em função do aumento na concentração de uma substância tóxica em avaliação através de ensaio pelo sistema Microtox® (ALS, 2018). ..... 98

**Figura 29.** Representação esquemática do princípio do método de ensaio ecotoxicológico do sistema Microtox®, baseado na emissão de luminescência pela

bactéria <i>Vibrio fischeri</i> , quanto menor a bioluminescência observada, maior a ecotoxicidade da substância ou produto em avaliação (adaptado de GARCIA-ORDIALES et al., 2019).	98
<b>Figura 30.</b> Fluxograma esquemático do sistema de tratamento biológico de água de produção em terminais aquaviários de petróleo no Brasil.	106
<b>Figura 31.</b> Reator biológico em fase de aeração de uma ETE de tratamento de água de produção em terminal aquaviário de petróleo (SOUSA, 2017).	107
<b>Figura 32.</b> Localização dos terminais aquaviários de petróleo, São Sebastião (SP) e Angra dos Reis (RJ) com sistema biológico de tratamento de água de produção (TRANSPETRO, 2022).	108
<b>Figura 33.</b> Plataforma do tipo FPSO ( <i>Floating Production Storage and Offloading</i> ), na qual foram coletadas amostras do um tanque <i>slop</i> para obtenção de inóculos microbianos (HEFTOS, 2021).	111
<b>Figura 34.</b> Plataforma do tipo FSO ( <i>Floating Storage and Offloading</i> ), na qual foram coletadas amostras de tanques de armazenamento de petróleo para obtenção de inóculos microbianos (TECHNOBRAS, 2021).	112
<b>Figura 35.</b> Mapa de localização do Campo de Marlim, Rio de Janeiro, Brasil (ANP, 2016).	113
<b>Figura 36.</b> Sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico ( <i>Looping</i> ) do CENPES utilizado no primeiro estudo de avaliação do efeito de um coquetel fágico em biofilmes mistos de BRS de tanque <i>slop</i> de plataforma do tipo FPSO.	119
<b>Figura 37.</b> Etapas experimentais do primeiro estudo realizado no sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico ( <i>Looping</i> ) do CENPES, demonstrando os intervalos de tempo entre as amostragens dos cupons metálicos. Os números ordinais representam os dias do experimento e os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.	120
<b>Figura 38.</b> Sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos ( <i>Looping</i> ) instalados no novo espaço do LIVM da UFV, projetados e construídos para a realização de ensaios de desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos para controle de biofilmes e BRS na indústria do petróleo em parceria do CENPES com a UFV.	124
<b>Figura 39.</b> Sistema de purga de gás nitrogênio por engate rápido nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos ( <i>Loopings</i> ) da UFV. <b>(A)</b> Engate em cada um dos trechos da tubulação que contém os cupons. <b>(B)</b> Detalhe do engate rápido.	126
<b>Figura 40.</b> Suporte (“régua”) para o encaixe dos cupons de 0,9 cm de diâmetro nas tubulações dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos ( <i>Loopings</i> ) instalados na UFV.	126
<b>Figura 41.</b> Entradas dos suportes (“réguas”) dos cupons nas tubulações dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos ( <i>Loopings</i> ) da UFV.	127

<b>Figura 42.</b> Configuração e posição dos principais componentes dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (Loopings) instalados na UFV: (1) tanques, (2) bombas, (3) fluxômetro, (4) sistema de purga de N <sub>2</sub> , (5) válvulas de controle do fluxo, (6) manômetros, (7) entradas dos suportes (“réguas”) dos cupons, (8, 9 e 10) conexões para inserção dos sensores de pH, oxigênio dissolvido ou condutividade. ....	128
<b>Figura 43.</b> (A) Inoculação da cultura de BRS no tanque do Looping por meio de uma bomba peristáltica. (B) Local de entrada (seta vermelha) da mangueira de inoculação da cultura de BRS na tampa do tanque do Looping.....	129
<b>Figura 44.</b> Etapas experimentais do estudo preliminar realizado nos novos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (Loopings) da UFV, demonstrando os intervalos de tempo entre as principais atividades realizadas. Os números ordinais representam os dias do experimento e os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. ....	130
<b>Figura 45.</b> Controle de vazão e de temperatura dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (Loopings) da UFV. (A) Fluxômetro indicando (seta vermelha) a vazão de 50 L/h. (B) Painel de controle indicando (seta vermelha) o controle de 30°C no tanque em operação. ....	131
<b>Figura 46.</b> Preparo dos suportes (“réguas”) de cupons para início dos ensaios nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (Loopings) da UFV. (A) Inserção dos cupons de aço carbono X65 nos orifícios da “régua”. (B) “Régua” preenchida com os cupons sendo inserida na tubulação do Looping. ....	132
<b>Figura 47.</b> (A) Câmara de anaerobiose (Whitley A95) e (B) repique da cultura de BRS utilizadas para preparo do inóculo e inoculação nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (Loopings) da UFV.....	133
<b>Figura 48.</b> Procedimento de amostragem do fluido para realização das análises realizadas no estudo preliminar nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (Loopings) da UFV. ....	135
<b>Figura 49.</b> Representação esquemática das diluições seriadas do produto em avaliação e controles negativo e positivo para realização de teste de ecotoxicidade com a bactéria <i>Vibrio fischeri</i> pelo sistema Microtox®. ....	138
<b>Figura 50.</b> Frascos fechados incubados no escuro do ensaio de biodegradabilidade em água do mar (LABP, 2022).....	139
<b>Figura 51.</b> Células de vidro utilizadas nos ensaios de avaliação da corrosividade. ....	142
<b>Figura 52.</b> Microcosmos incubados sob agitação para realização dos ensaios de avaliação da potencial inibição provocada pelo coquetel fágico no processo de nitrificação do sistema biológico de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. ....	144
<b>Figura 53.</b> Etapas experimentais do estudo preliminar de avaliação do potencial impacto do coquetel fágico na inibição do processo de nitrificação no sistema biológico	

de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. Os números ordinais representam os dias do experimento, os números em círculos azuis representam os tempos em que foram realizadas as quantificações de amônia e os números em círculos verdes representam os tempos em que foram realizadas as quantificações dos fagos..... 146

**Figura 54.** Resultados do monitoramento dos parâmetros de temperatura, pH e oxigênio dissolvido (OD) ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons..... 150

**Figura 55.** Resultados do monitoramento do potencial redox (ORP) ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons..... 151

**Figura 56.** Quantificações microbiológicas do fluido (NMP/ml) e dos cupons (NMP/cm<sup>2</sup>) coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. NMP (Número Mais Provável); BANHT (Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais); BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato). ..... 152

**Figura 57.** Resultados das análises de MEV dos cupons coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. As barras de escala representadas referem-se a 100 µm. .... 153

**Figura 58.** Resultados das análises de perfilometria óptica dos cupons coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES..... 153

**Figura 59.** Aspecto visual dos cupons coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES..... 153

**Figura 60.** Teores de sulfetos (H<sub>2</sub>S) dissolvidos no fluido circulante no *Looping*, ao longo de aproximadamente 2 meses de execução do experimento com retirada dos cupons (tempos 1 a 8) e durante 5 meses após a retirada do último cupom (tempos 9 a 13). Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons..... 154

**Figura 61.** Resultados do monitoramento da temperatura (°C) nos tanques de alimentação ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. .... 156

**Figura 62.** Resultados do monitoramento da temperatura (°C) no fluido circulante nos sistemas ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. .... 157

**Figura 63.** Resultados do monitoramento do pH, nos sistemas Tratamento e Controle, ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do

coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons..... 158

**Figura 64.** Resultados do monitoramento do oxigênio dissolvido (OD), nos sistemas Tratamento e Controle, ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. .... 159

**Figura 65.** Resultados do monitoramento da densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ), nos sistemas Tratamento e Controle, ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. .... 160

**Figura 66.** Resultados do monitoramento dos teores de sulfato nos sistemas Tratamento e Controle amostrados ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ )..... 161

**Figura 67.** Resultados das análises de quantificação de BRS, pela técnica do NMP, no fluido (NMP/ml) **(A)** e nos cupons (NMP/cm<sup>2</sup>) **(B)** nos sistemas Tratamento e Controle amostrados ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. .... 162

**Figura 68.** Resultados das análises de quantificação de ATP no fluido (pg/ml) **(A)** e nos cupons (pg/cm<sup>2</sup>) **(B)** nos sistemas Tratamento e Controle amostrados ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ). .... 163

**Figura 69.** Resultados das determinações do título viral (estimativa do número de partículas virais) em UPF/ml, para cada uma das bactérias hospedeiras, *Escherichia coli* e *Enterobacter coclae*, no fluido circulante no *Looping* Tratamento no 42º dia (pré-fagos) e no 49º e 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV. .... 164

**Figura 70.** Imagens da MEV obtidas a partir dos cupons destinados às análises de perda de massa, amostrados nos sistemas Tratamento e Controle no 42º dia (pré-fagos) e no 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV. **(A)** Tratamento pré-fagos; **(B)** Controle pré-fagos; **(C)** Tratamento pós-fagos; e, **(D)** Controle pós-fagos. As barras de escala representadas referem-se a 10 µm..... 165

**Figura 71.** Imagens da Perfilometria Óptica obtidas a partir dos cupons destinados às análises de perda de massa, amostrados nos sistemas Tratamento e Controle no 42º dia (pré-fagos) e no 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV. .... 166

**Figura 72.** Resultados das determinações de Rugosidade Média Quadrática – Rq (µm) obtidas a partir dos cupons amostrados nos sistemas Tratamento e Controle no 42º dia (pré-fagos) e no 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ )..... 167

<b>Figura 73.</b> Resultados das análises de perda de massa <b>(A)</b> e determinação das taxas de corrosão <b>(B)</b> dos cupons amostrados nos sistemas Tratamento e Controle ao longo dos ensaios nos <i>Loopings</i> da UFV.....	168
<b>Figura 74.</b> Resultados de biodegradabilidade (%D) de cada produto avaliado, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de ensaio.....	172
<b>Figura 75.</b> Valores de pH medidos ao longo dos ensaios de corrosividade. ....	174
<b>Figura 76.</b> Taxas de corrosão (mm/ano) e perdas de massa (g) médias obtidas em cada um dos ensaios de corrosividade. ....	175
<b>Figura 77.</b> Taxas médias de remoção de amônia nos frascos Tratamento e Controle a 55 g/L de salinidade, dos ensaios de avaliação da potencial inibição do processo de nitrificação pelo coquetel fágico em sistemas de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. Os números em círculos azuis representam os tempos em que foram realizadas as quantificações de amônia. (*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).....	176
<b>Figura 78.</b> Taxas médias de remoção de amônia nos frascos Tratamento e Controle a 125 g/L de salinidade, dos ensaios de avaliação da potencial inibição do processo de nitrificação pelo coquetel fágico em sistemas de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. Os números em círculos azuis representam os tempos em que foram realizadas as quantificações de amônia. (*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).....	177
<b>Figura 79.</b> Concentrações médias de fagos (UFP/ml) ao longo do tempo para cada uma das células hospedeiras ( <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter clocae</i> ) na água de produção dos frascos a 55 e 125 g/L de salinidade (NaCl), tratados com o coquetel fágico. Os números em círculos verdes representam os tempos em que foram realizadas as quantificações dos fagos.....	178
<b>Figura 80.</b> Efeito de um bacteriófago sobre o biofilme formado por diferentes bactérias isoladas da água de alimentação de um sistema de osmose reversa de refinaria de petróleo (BELGINI et al., 2014; DIAS, 2014).....	183
<b>Figura 81.</b> Curva de crescimento demonstrando a influência de um fago lítico sobre o crescimento de uma bactéria isolada de água de produção (LIVM e CENPES, dados não publicados).....	183
<b>Figura 82.</b> Ensaio preliminares de avaliação do efeito de fagos não-específicos, isolados de amostras ambientais, sobre a formação de biofilmes de <i>Desulfovibrio alaskensis</i> em cupons metálicos (LIVM e CENPES, dados não publicados).....	184
<b>Figura 83.</b> Análises por MEV demonstrando o efeito dos fagos na inibição da formação de biofilme por <i>D. alaskensis</i> . <b>(A)</b> e <b>(D)</b> controle negativo (cupom e meio de cultura); <b>(B)</b> e <b>(E)</b> controle positivo (cultura pura de <i>D. alaskensis</i> ); <b>(C)</b> e <b>(F)</b> biofilmes de <i>D. alaskensis</i> tratados com o coquetel fágico. As barras de escala representadas referem-se a 100 $\mu\text{m}$ (LIVM e CENPES, dados não publicados).....	185

- Figura 84.** Análises por perfilometria óptica demonstrando o efeito dos fagos na inibição da formação de biofilme por *D. alaskensis* (LIVM e CENPES, dados não publicados)..... 185
- Figura 85. (A)** Biorreator piloto de laboratório (200 L) e **(B)** fermentadores de bancada instalados na UFV para otimização e escalonamento da produção de fagos. .... 188
- Figura 86.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos biofilmes formado pelo consórcio bacteriano em superfície de aço carbono na presença e ausência (controle) do fago vB\_EcoM-UFV13 no aumento de 3.500×. **(A)** Controle. **(B)** Biofilme formado com alta concentração do fago ( $10^{12}$  UFP/ml). **(C)** Biofilme formado com média concentração do fago ( $10^8$  UFP/ml). **(D)** Biofilme formado com baixa concentração do fago ( $10^4$  UFP/ml) (CARMO, 2019). .... 189
- Figura 87. (A)** Quantificação do número de células viáveis por citometria de fluxo e **(B)** quantificação de DNA, nos biofilmes formados sobre cupons de aço carbono para cada um dos tratamentos (tratamento 1, 2 e 3) com as concentrações alta ( $10^{12}$  UFP/ml), média ( $10^8$  UFP/ml) e baixa ( $10^4$  UFP/ml) do fago vB\_EcoM-UFV13, em comparação ao controle (ausência do fago) (CARMO, 2019). .... 190
- Figura 88.** Resultados de densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) após 48 e 72 horas de exposição ao coquetel fágico, em ensaios de formação de biofilmes em microplacas, com cultura de BRS de tanques de armazenamento de plataformas (LIVM e CENPES, dados não publicados). (\*) diferença estatisticamente significativa entre Controle e Tratamento, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ). .... 198

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estrutura molecular do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) e de alguns compostos sulfurados envolvidos na acidulação biogênica ou souring biogênico (biological souring). As esferas amarelas representam os átomos de enxofre, as vermelhas os átomos de oxigênio e as brancas os átomos de hidrogênio. Modificado de WALDOW (2018).....	44
<b>Tabela 2.</b> Limites de tolerância de exposição do trabalhador ao H <sub>2</sub> S na fase gasosa no ambiente de trabalho conforme NR-15 (NR-15, 1978).....	46
<b>Tabela 3.</b> Fatores de desvio para o cálculo do valor máximo (limite instantâneo) de exposição ao H <sub>2</sub> S conforme a NR-15 (NR-15, 1978). ....	47
<b>Tabela 4.</b> Concentrações de referência e reações e/ou consequências da exposição do ser humano ao H <sub>2</sub> S no ambiente de trabalho.....	49
<b>Tabela 5.</b> Principais diferenças entre biocidas oxidantes e não-oxidantes (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). ....	72
<b>Tabela 6.</b> Normas da ABNT para ensaios ecotoxicológicos aquáticos utilizados na avaliação da ecotoxicidade aguda e crônica em organismos marinhos (ABNT, 2022a). ....	96
<b>Tabela 7.</b> Normas da ABNT para ensaios ecotoxicológicos aquáticos utilizados na avaliação da ecotoxicidade aguda e crônica em organismos de água doce (ABNT, 2022a). ....	97
<b>Tabela 8.</b> Classificação da corrosividade de fluidos na indústria do petróleo segundo Norma NACE SP0775-2018-SG (NACE INTERNATIONAL, 2018). ....	103
<b>Tabela 9.</b> Principais atividades realizadas a cada dia relevante do primeiro estudo no sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico ( <i>Looping</i> ) do CENPES. ....	121
<b>Tabela 10.</b> Principais atividades realizadas no estudo preliminar realizado nos novos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (Loopings) da UFV. ....	130
<b>Tabela 11.</b> Tipo de amostra, análises e respectivos tempos de amostragem realizados no estudo preliminar nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (Loopings) da UFV. ....	136
<b>Tabela 12.</b> Composição da solução ácida (ASTM INTERNATIONAL, 2017) utilizada na decapagem dos cupons de aço carbono coletados nos ensaios nos <i>Loopings</i> da UFV. ....	136
<b>Tabela 13.</b> Soluções de nutrientes inorgânicos utilizadas no teste padrão de biodegradabilidade em água do mar (OECD, 1992b) .....	140

<b>Tabela 14.</b> Composição da solução ácida de Clarke (ASTM INTERNATIONAL, 2017; SINGH; KUMAR, 2003) utilizada na decapagem dos cupons de aço carbono dos ensaios de corrosividade.....	143
<b>Tabela 15.</b> Quantificações microbiológicas de campo nos pontos de amostragem. ....	147
<b>Tabela 16.</b> Quantificações microbiológicas realizadas nas amostras coletadas.....	147
<b>Tabela 17.</b> Identificação dos fagos selecionados para formulação do coquetel fágico. ....	148
<b>Tabela 18.</b> Classificação taxonômica dos fagos selecionados para formulação do coquetel fágico, segundo nova classificação do ICTV. ....	149
<b>Tabela 19.</b> Quantificações microbiológicas das culturas de BANHT e BRS-m inoculadas e na água do mar natural utilizada como alimentação nos ensaios no <i>Looping</i> do CENPES.....	149
<b>Tabela 20.</b> Quantificações microbiológicas da cultura de BRS-m inoculada e da água do mar natural utilizada como alimentação nos sistemas de <i>Looping</i> da UFV.....	155
<b>Tabela 21.</b> Resultados de ecotoxicidade aguda para ambientes marinhos pelo sistema Microtox®, utilizando a bactéria <i>Vibrio fischeri</i> como organismo teste.....	169
<b>Tabela 22.</b> Resultados das análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) para cada produto avaliado no teste de biodegradabilidade (%D) e respectivos valores estimados de Demanda Bioquímica de Oxigênio teórica (DBOt).....	169
<b>Tabela 23.</b> Teores de O <sub>2</sub> (mg/L) determinados nas duplicatas de cada produto avaliado, nos tempos de 0 (zero), 7, 14 e 28 dias de ensaio. ....	170
<b>Tabela 24.</b> Resultados de consumo de O <sub>2</sub> de cada produto avaliado, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de ensaio. ....	171
<b>Tabela 25.</b> Resultados de biodegradabilidade (%D) de cada produto avaliado, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de ensaio.....	172
<b>Tabela 26.</b> Resultados das medidas de área (A); massa dos corpos de prova ao início (m <sub>inicial</sub> ) e ao final (m <sub>final</sub> ) dos ensaios; após a decapagem (m <sub>decapagem</sub> ); variação de massa ( $\Delta m$ ) dos cupons e respectivas taxas de corrosão (TxCor) calculadas. ....	173
<b>Tabela 27.</b> Valores de pH medidos nos produtos puros. ....	173
<b>Tabela 28.</b> Análise comparativa dos valores de CE50 obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda para ambientes marinhos pelo sistema Microtox®, frente às concentrações de dosagem praticadas para biocidas e esperadas para o coquetel fágico em plataformas de petróleo. ....	208
<b>Tabela 29.</b> Concentração dos produtos utilizada no teste de biodegradabilidade em comparação às dosagens praticadas para biocidas e esperadas para o coquetel fágico em plataformas de petróleo.....	211

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACGIH	Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais [ <i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i> ]
ADBAC	cloreto de alquildimetilbenilamônio [ <i>alkyldimethylbenzylammonium chloride</i> ]
AMPP	<i>Association for Materials Protection and Performance</i> [Associação para Proteção e Performance de Materiais]
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	American Petroleum Institute
ARS	arqueias redutoras de sulfato
ASTM	<i>Sociedade Americana para Materiais e Testes</i> [ <i>American Society for Testing and Materials</i> ]
ATSDR	Agência para o Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças [ <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> ]
BAC	cloreto de benzalcônio [ <i>benzalkonium chloride</i> ]
BANHT	bactérias anaeróbicas heterotróficas totais
BIOTAN	Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal
BPA	bactérias produtoras de ácidos
BPA-a	bactérias produtoras de ácidos anaeróbicas
BRS	bactérias redutoras de sulfato
BRS-m	bactérias redutoras de sulfato mesófilas
BRS-t	bactérias redutoras de sulfato termófilas
BSW	sedimentos básicos e água [ <i>basic sediments and water</i> ]
CE50	Concentração de efeito a 50% da população do organismo teste
CLT	Consolidação das Leis do Trabalho
CMIC	MIC química [ <i>chemical MIC</i> ]
DBNPA	2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamida [ <i>2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide</i> ]
DNA	ácido desoxirribonucleico [ <i>deoxyribonucleic acid</i> ]
DO	densidade óptica
ECHA	Agência Europeia das Substâncias Químicas [ <i>European Chemical Agency</i> ]

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMIC	MIC elétrica [ <i>electrical MIC</i> ]
EPS	substâncias poliméricas extracelulares [ <i>extracellular polymeric substances</i> ]
FISPQ	Ficha de Segurança de Produto Químico
FPSO	unidade flutuante de produção, armazenamento e transferência [ <i>floating production storage and offloading</i> ]
FSO	unidade flutuante de produção e transferência [ <i>floating storage and offloading</i> ]
GA	glutaraldeído [ <i>glutaraldehyde</i> ]
HE	fragilização por hidrogênio [ <i>hydrogen embrittlement</i> ]
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IQUAI	Índice de Qualidade de Águas de Injeção
INC	Instrução Normativa Conjunta
LIVM	Laboratório de Virologia Molecular
LTEL	limite de exposição de longo prazo [ <i>long term exposure limit</i> ]
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBR	biorreator com membrana [ <i>membrane bioreactor</i> ]
MBT	metileno-bis(tiocianato) [ <i>methylene bis(thiocyanate)</i> ]
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MIC	corrosão influenciada por microrganismos [ <i>microbiologically influenced corrosion</i> ]
MVP	produto mínimo viável [ <i>minimum viable product</i> ]
NACE	<i>National Association of Corrosion Engineers</i> [Associação Nacional de Engenheiros de Corrosão]
NIOSH	Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional [ <i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> ]
NMP	número mais provável [ <i>most probable number</i> ]
OD	oxigênio dissolvido
OSHA	Administração de Segurança e Saúde Ocupacional [ <i>Occupational Safety and Health Administration</i> ]
P&D	pesquisa e desenvolvimento

PCR	reação em cadeia da polimerase [ <i>polymerase chain reaction</i> ]
PIG	medidor de inspeção de dutos [ <i>pipeline inspection gauge</i> ]
PRS	procariotos redutores de sulfato
QAC	composto de amônio quaternário [ <i>quaternary ammonium compound</i> ]
qPCR	PCR quantitativo [ <i>quantitative PCR</i> ]
SEPRT	Secretaria Especial de Previdência e Trabalho
SRP	procariotos redutores de sulfato [ <i>sulfate-reducing prokaryotes</i> ]
SSPC	<i>The Society for Protective Coatings</i> [Sociedade para Revestimentos de Proteção]
STEL	limite de exposição de curto prazo [ <i>short term exposure limit</i> ]
THP	tris hidroximetil fosfina [ <i>tris hydroxymethyl phosphine</i> ]
THPO	óxido de tetrakis hidroximetil fosfina [ <i>tris hydroxymethyl phosphine oxide</i> ]
THPS	sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio [ <i>tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate</i> ]
TLV	valor limite de exposição [ <i>threshold limit value</i> ]
TOC	carbono orgânico total [ <i>total organic carbon</i> ]
TOG	teor de óleos e graxas
TSI	três açúcares ferro [ <i>triple sugar iron</i> ]
TSR	redução termoquímica do sulfato [ <i>thermochemical sulfate reduction</i> ]
TWA	limite médio ponderado pelo tempo [ <i>time weighted average</i> ]
UFP	unidades formadoras de placa
UFV	Universidade Federal de Viçosa
URS	unidade de remoção de sulfato
USPTO	Escritório de Patentes e Marcas Registradas dos Estados Unidos [ <i>United States Patent and Trademark Office</i> ]
UV	Ultravioleta
VLP	partícula semelhante a vírus [ <i>virus-like particle</i> ]

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	25
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	27
2.1. CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO .....	27
2.1.1. Principais sistemas susceptíveis a contaminações microbianas .....	28
2.1.2. Principais problemas associados a contaminações microbianas .....	39
2.2. GERAÇÃO BIOGÊNICA DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> S).....	41
2.2.1. Limites de H <sub>2</sub> S em atividades ocupacionais .....	46
2.2.2. Limites de H <sub>2</sub> S em atividades operacionais .....	49
2.3. CORROSÃO INFLUENCIADA POR MICRORGANISMOS.....	53
2.3.1. Formação de células de aeração diferencial .....	54
2.3.2. Biocorrosão química ou CMIC (chemical MIC).....	55
2.3.3. Biocorrosão elétrica ou EMIC (electrical MIC).....	55
2.4. BIOFILMES .....	58
2.5. CONTROLE OPERACIONAL DAS CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS....	65
2.6. BIOCIDAS NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO .....	67
2.6.1. Princípio ativo biocida versus produto biocida.....	68
2.6.2. Biocidas versus antibióticos.....	69
2.6.3. Biocidas versus biostáticos.....	70
2.6.4. Biocidas oxidantes versus biocidas não-oxidantes.....	71
2.6.5. Biocidas oxidantes.....	74
2.6.6. Biocidas não-oxidantes.....	75
2.7. A TECNOLOGIA DE BACTERÍOFAGOS APLICADA À INDÚSTRIA DO PETRÓLEO .....	85
2.8. AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERÍOFAGOS 93	
2.8.1. Impactos ambientais.....	94
2.8.2. Impactos operacionais.....	102
3. OBJETIVOS .....	110
3.1. OBJETIVO GERAL .....	110
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	110
4. MATERIAS E MÉTODOS .....	111
4.1. AMOSTRAGEM .....	111
4.2. QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS .....	115
4.3. INÓCULOS MICROBIANOS .....	116
4.4. SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO.....	116

4.5.	SISTEMAS PILOTO LABORATORIAIS DE FLUXO DINÂMICO ( <i>LOOPINGS</i> )	117
4.5.1.	Primeiro estudo com bacteriófagos em <i>Looping</i> (sistema CENPES)	118
4.5.2.	Segundo estudo com bacteriófagos em <i>Looping</i> (novos sistemas UFV)	123
4.6.	AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERIÓFAGOS	137
4.6.1.	Ecotoxicidade	137
4.6.2.	Biodegradabilidade	139
4.6.3.	Corrosividade	141
4.6.4.	Inibição do tratamento biológico de água de produção	144
5.	RESULTADOS	147
5.1.	QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E INÓCULOS MICROBIANOS	147
5.2.	SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO	148
5.3.	PRIMEIRO ESTUDO COM BACTERIÓFAGOS EM <i>LOOPING</i> (SISTEMA CENPES)	149
5.3.1.	Inóculo	149
5.3.2.	Parâmetros físico-químicos	150
5.3.3.	BRS (NMP/ml e NMP/cm <sup>2</sup> )	151
5.3.4.	MEV e perfilometria óptica	152
5.3.5.	H <sub>2</sub> S dissolvido (mg/L)	154
5.4.	SEGUNDO ESTUDO COM BACTERIÓFAGOS EM <i>LOOPING</i> (NOVOS SISTEMAS UFV)	155
5.4.1.	Inóculo	155
5.4.2.	Temperatura (°C)	155
5.4.3.	pH	157
5.4.4.	Oxigênio dissolvido (mg/L)	158
5.4.5.	Densidade óptica (DO <sub>600nm</sub> )	159
5.4.6.	H <sub>2</sub> S dissolvido (mg/L)	160
5.4.7.	Sulfatos (mg/L)	160
5.4.8.	BRS (NMP/ml e NMP/cm <sup>2</sup> )	161
5.4.9.	ATP (pg/ml e pg/cm <sup>2</sup> )	162
5.4.10.	Título viral (UFP/ml)	163
5.4.11.	MEV	164
5.4.12.	Perfilometria óptica e rugosidade média quadrática – Rq (µm)	165
5.4.13.	Taxa de corrosão	167

5.5.	AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERIÓFAGOS	168
5.5.1.	Ecotoxicidade .....	168
5.5.2.	Biodegradabilidade .....	169
5.5.3.	Corrosividade.....	172
5.5.4.	Inibição do tratamento biológico de água de produção .....	175
6.	DISCUSSÃO .....	179
6.1.	QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E INÓCULOS MICROBIANOS	179
6.2.	SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO.....	180
6.2.1.	Concepção conceitual de um produto comercial aplicável .....	180
6.2.2.	Premissas de escalonamento para a viabilidade comercial .....	182
6.2.3.	Maturidade e resultados das atividades de pesquisa aplicada.....	182
6.3.	PRIMEIRO ESTUDO COM BACTERIÓFAGOS EM <i>LOOPING</i> (SISTEMA CENPES).....	191
6.4.	SEGUNDO ESTUDO COM BACTERIÓFAGOS EM <i>LOOPING</i> (NOVOS SISTEMAS UFV).....	193
6.4.1.	Inóculo .....	193
6.4.2.	Temperatura .....	194
6.4.3.	pH.....	196
6.4.4.	Oxigênio dissolvido (OD).....	196
6.4.5.	Densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ).....	197
6.4.6.	H <sub>2</sub> S dissolvido (mg/L) .....	199
6.4.7.	Sulfatos (mg/L) .....	200
6.4.8.	BRS (NMP/ml e NMP/cm <sup>2</sup> ) .....	201
6.4.9.	ATP (pg/ml e pg/cm <sup>2</sup> ) .....	201
6.4.10.	Título viral (UFP/ml).....	202
6.4.11.	MEV.....	202
6.4.12.	Perfilometria óptica e rugosidade média quadrática – Rq (µm).....	204
6.4.13.	Taxas de corrosão.....	205
6.5.	AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERIÓFAGOS	206
6.5.1.	Ecotoxicidade .....	206
6.5.2.	Biodegradabilidade .....	209
6.5.3.	Corrosividade.....	212
6.5.1.	Inibição do tratamento biológico de água de produção .....	214
7.	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS .....	217
7.1.	INÓCULOS MICROBIANOS .....	217

7.2.	SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO.....	217
7.3.	ESTUDOS EM SISTEMAS DE LOOPING .....	217
7.4.	POTENCIAIS IMPACTOS AMBIENTAIS .....	218
7.4.1.	Ecotoxicidade .....	218
7.4.2.	Biodegradabilidade .....	218
7.5.	POTENCIAIS IMPACTOS OPERACIONAIS.....	219
7.5.1.	Corrosividade.....	219
7.5.2.	Inibição do tratamento biológico de água de produção .....	219
8.	CONCLUSÃO GERAL .....	220
9.	PERSPECTIVAS.....	221
9.1.	ESTUDOS EM SISTEMAS DE LOOPING .....	221
9.2.	ECOTOXICIDADE.....	221
9.3.	BIODEGRADABILIDADE .....	222
9.4.	CORROSIVIDADE .....	223
9.5.	INIBIÇÃO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUA DE PRODUÇÃO ..	223
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	224
	APÊNDICE A - METODOLOGIAS .....	255

## 1. INTRODUÇÃO

Contaminações microbianas são comumente encontradas ao longo de toda a cadeia produtiva da indústria do petróleo e estão associadas, principalmente, a processos de biocorrosão e geração biogênica de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S).

Comumente denominada de biocorrosão, a corrosão influenciada por microrganismos (*microbiologically influenced corrosion* - MIC) está associada a diferentes grupos microbianos que atuam de forma dinâmica, formando biofilmes em diferentes superfícies, sobretudo metálicas. Um dos principais grupos microbianos envolvidos nesses processos é conhecido comumente como Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), que em geral, reduzem os íons sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) gerando o H<sub>2</sub>S, um gás extremamente tóxico, inflamável e corrosivo, que impacta as atividades industriais e representa potencial risco ocupacional, operacional e ambiental.

O controle e a mitigação dos processos de biocorrosão e de geração de H<sub>2</sub>S são realizados através de processos físicos nos sistemas operacionais e principalmente pela dosagem de produtos químicos, tais como biocidas, inibidores de corrosão e sequestrantes de H<sub>2</sub>S. Contudo, a efetividade de tais produtos é limitada por condições operacionais ou logísticas, além de apresentarem custos significativos.

Diante disso, novas tecnologias que atuem de modo mais efetivo para mitigar a biocorrosão e a geração do H<sub>2</sub>S tornam-se extremamente relevantes e, apesar de serem ainda um grande desafio, possuem grande potencial, pois relacionam-se com benefícios de grande impacto, tais como: **(i)** maior segurança ocupacional pela redução da exposição ao H<sub>2</sub>S; **(ii)** maior garantia de continuidade operacional e de integridade de ativos pela redução da corrosão e minimização de intervenções; **(iii)** menor risco ambiental decorrente de vazamentos e/ou descarte de produtos químicos; **(iv)** redução de custos, consumo e logística com produtos químicos; **(v)** redução da geração biogênica de H<sub>2</sub>S em reservatórios de petróleo; e, **(vi)** redução de impactos no refino decorrentes dos produtos sequestrantes de H<sub>2</sub>S utilizados na produção do petróleo.

Frente à relevância, dimensão e diversidade de cenários associados a problemas de biocorrosão e geração biogênica de H<sub>2</sub>S, a busca por novas tecnologias com foco em segurança de processo, integridade e confiabilidade das instalações e equipamentos é uma das prioridades da indústria do petróleo. E nesse contexto,

alternativas inovadoras na área de biotecnologia podem se destacar, dentre elas, a tecnologia de bacteriófagos.

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam especificamente bactérias, usurpando a maquinaria celular para replicação do seu material genético, formando novas partículas virais e provocando a lise da célula bacteriana hospedeira. Além disso, os fagos também podem apresentar ação direta sobre substâncias extracelulares que compõem a matriz dos biofilmes.

Devido a esses mecanismos de ação, os fagos apresentam potencial aplicação para controle de contaminações microbianas, em especial de biofilmes. Assim sendo, estudos de prospecção, isolamento e caracterização de fagos para cenários da indústria do petróleo veem sendo conduzidos pelo Laboratório de Virologia Molecular (LIVM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em parceria com o Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (CENPES).

Tais resultados têm demonstrado a ação de fagos em biofilmes associados à biocorrosão e geração de H<sub>2</sub>S, com potenciais vantagens em relação aos produtos biocidas usuais. Desse modo, é possível afirmar que o desenvolvimento dessa tecnologia aplicada a cenários da indústria do petróleo, vem avançando de forma consistente, tornando-se relevante, neste momento, o levantamento de parâmetros de aplicação, para disponibilizar e validar a tecnologia em escala industrial e em campo.

A pesquisa apresentada neste trabalho teve como objetivo principal avaliar, em sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (*Loopings*), a ação de fagos sobre biofilmes, representativos de sistemas associados à biocorrosão e geração biogênica de H<sub>2</sub>S em plataformas de petróleo, pré-estabelecidos na superfície de cupons metálicos. Adicionalmente, foram realizados alguns ensaios preliminares para avaliar potenciais impactos do uso de fagos sob o ponto de vista ambiental (ecotoxicidade e biodegradabilidade) e operacional (corrosividade e inibição do processo biológico de tratamento de água de produção), de modo a direcionar estudos mais detalhados no futuro.

Os resultados obtidos neste trabalho, além de subsidiarem a continuidade da pesquisa para o desenvolvimento de produtos à base de fagos, visam dimensionar e especificar testes piloto em escala de campo, a serem realizados em tanques de plataformas de petróleo para validação, implantação e disseminação da abrangência da tecnologia.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Ao longo de toda a cadeia produtiva da indústria do petróleo, desde os processos de exploração e perfuração de poços, passando pela produção e processamento primário do petróleo, armazenamento, escoamento e, finalmente, o refino e a produção e distribuição de derivados, vários sistemas operacionais são suscetíveis ao estabelecimento e proliferação de diversos tipos de microrganismos, sendo que alguns desses sistemas apresentam ambientes com condições especialmente favoráveis à colonização microbiana (AUGUSTINOVIC et al., 2012; LITTLE; LEE, 2007, 2015; LITTLE; WAGNER; MANSFELD, 1992; MORRIS; KRAAN, 2017).

Os microrganismos constituem a forma de vida mais antiga, abundante e disseminada do planeta (FENCHEL, 2011; GOULD, 1994; NEE, 2005; WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Além disso, são os organismos mais diversificados em termos evolutivos e metabólicos (FENCHEL, 2016; HUG et al., 2016) e estão envolvidos nas principais etapas de todos os ciclos biogeoquímicos da biosfera, de modo que o restante da vida na Terra não seria possível sem sua presença (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008; JELEN; GIOVANNELLI; FALKOWSKI, 2016).

Na indústria do petróleo, contaminações microbianas se estabelecem devido às características intrínsecas dos sistemas operacionais, bem como devido às condições físico-químicas encontradas nesses sistemas (temperatura, pH, salinidade, disponibilidade de água e nutrientes), as quais, associadas à enorme diversidade e flexibilidade fisiológica dos microrganismos, permitem que eles ocupem ambientes com amplas faixas de variáveis ambientais, sobrevivendo até mesmo em condições consideradas extremas (FENCHEL, 2011, 2016; GUERRERO; BERLANGA, 2006).

Esses ambientes incluem os fluidos circulantes nos sistemas, os poros das rochas reservatório e as superfícies internas e externas das diferentes instalações e equipamentos industriais, como dutos (oleodutos e gasodutos), tanques, vasos, bombas, válvulas, membranas, filtros, separadores água/óleo, sistemas de resfriamento e sistemas de tratamento de água e de efluentes (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Em síntese, os microrganismos são encontrados em qualquer ambiente onde exista uma quantidade mínima de água (até mesmo gotículas em suspensão no vapor) e nutrientes, em especial fontes de carbono (orgânico ou inorgânico), o que invariavelmente, inclui praticamente todos os ambientes da indústria do petróleo. Cabe aos profissionais dessa indústria o convívio com os microrganismos e o seu gerenciamento adequado para mitigar os efeitos nocivos dessas contaminações (WALDOW, 2018).

Dessa forma, a caracterização e o monitoramento dos principais sistemas susceptíveis a contaminações microbianas é uma atividade relevante para subsidiar a tomada de decisão quanto às medidas de controle e mitigação dos eventuais problemas operacionais, ocupacionais e ambientais relacionados à presença indesejada de microrganismos prejudiciais aos sistemas industriais (ECKERT; SKOVHUS, 2018b; LOMANS et al., 2016).

### **2.1.1. Principais sistemas susceptíveis a contaminações microbianas**

Conforme citado anteriormente, ao longo de toda a cadeia produtiva da indústria do petróleo, diversos sistemas operacionais apresentam condições que favorecem o desenvolvimento e estabelecimento de comunidades microbianas diversas, constituindo sistemas frequentemente susceptíveis a contaminações microbianas que podem causar problemas aos processos da indústria do petróleo.

Podemos identificar 7 etapas principais do processo de exploração, produção e processamento do petróleo: **(i) perfuração, (ii) completção, (iii) produção, (iv) escoamento, (v) armazenamento, (vi) refino e (vii) distribuição**, nas quais se destacam alguns sistemas comumente sujeitos a contaminações microbianas. Tais sistemas serão rapidamente apresentados a seguir **(Figuras 1 a 8)**, tomando-se como exemplo a produção de petróleo em ambientes *offshore*, ou seja, em plataformas localizadas no mar (PETROBRAS, 2016; THOMAS, 2001).

Na etapa de perfuração de poços realizada por navios-sonda **(Figura 1)**, **fluidos de perfuração** (também chamados de lamas de perfuração) são utilizados para **(i)** estabilizar, mecânica e quimicamente, as paredes do poço, **(ii)** limpar o fundo do poço transportando as rochas fragmentadas (cascalhos) até a superfície, **(iii)** manter os sólidos em suspensão, **(iv)** facilitar a separação dos cascalhos na superfície, **(v)** exercer pressão hidrostática para evitar o influxo garantindo a

integridade do poço, (vi) lubrificar e resfriar a broca e a coluna de perfuração, e (vii) controlar a pressão do reservatório (HAMED; BELHADRI, 2009; THOMAS, 2001).



**Figura 1.** Sistemas da etapa de perfuração de poços de petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

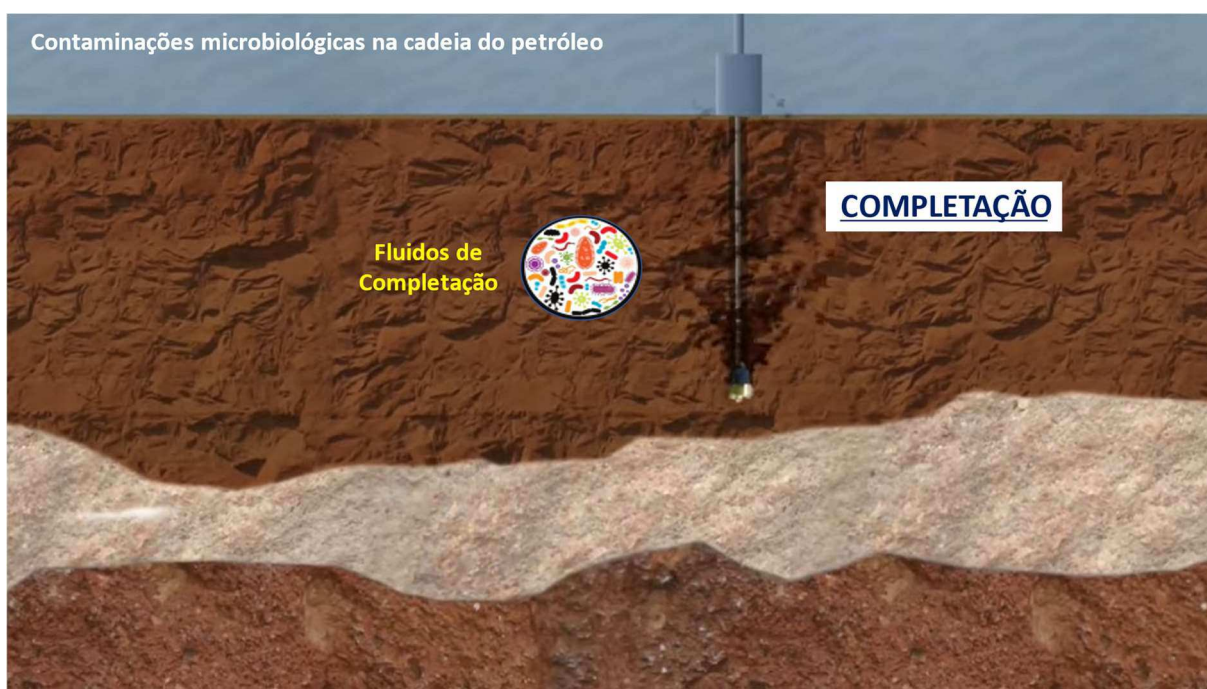
Os fluidos de perfuração são misturas complexas de sólidos, líquidos e diversos produtos químicos contendo diferentes tipos de polímeros que são misturados à água (fluidos de base aquosa) ou a solventes (fluidos de base oleosa), a depender das características físico-químicas e reológicas necessárias ao fluido (DAVIDSON; STEWART, 1997; HAMED; BELHADRI, 2009; THOMAS, 2001).

Ambos os tipos de fluidos estão sujeitos ao crescimento de microrganismos, os quais podem degradar seus componentes orgânicos, resultando em alterações de sua viscosidade, interferindo na eficiência e estabilidade da perfuração (AL-HUMAM et al., 2021). Além disso, as BRS também podem se proliferar nesses fluidos, ocasionando problemas adicionais devido ao H<sub>2</sub>S gerado, como risco de exposição ocupacional e corrosão dos equipamentos de perfuração (FREEMAN, 1983).

Esse tipo de problema é mais comum em fluidos de base aquosa, quando os microrganismos já estão presentes no sistema ou na própria água utilizada desde o início de seu preparo. Contudo, também pode ocorrer em fluidos de base oleosa, ao longo de sua utilização, uma vez que esses fluidos são reaproveitados na perfuração de vários poços, portanto, vão se misturando aos fluidos do próprio reservatório que

retornam à sonda (AL-HUMAM et al., 2021; FREEMAN, 1983; HAMED; BELHADRI, 2009).

Após a perfuração, segue-se a etapa de completção, a qual se refere ao conjunto de operações destinadas a equipar o poço para o início da produção de petróleo, em condições seguras ao longo de toda sua vida. Nessa etapa, são utilizados os chamados **fluidos de completção (Figura 2)**, os quais substituem os fluidos presentes no poço durante o condicionamento do revestimento da coluna de produção e instalação dos equipamentos de superfície e subsuperfície. O fluido de completção geralmente é uma solução salina de composição compatível ao reservatório, cujo objetivo é evitar danos à formação que possam restringir a vazão do poço. Além disso, apresentam densidade capaz de fornecer pressão hidrostática no fundo do poço de modo a impedir o refluxo (THOMAS, 2001).



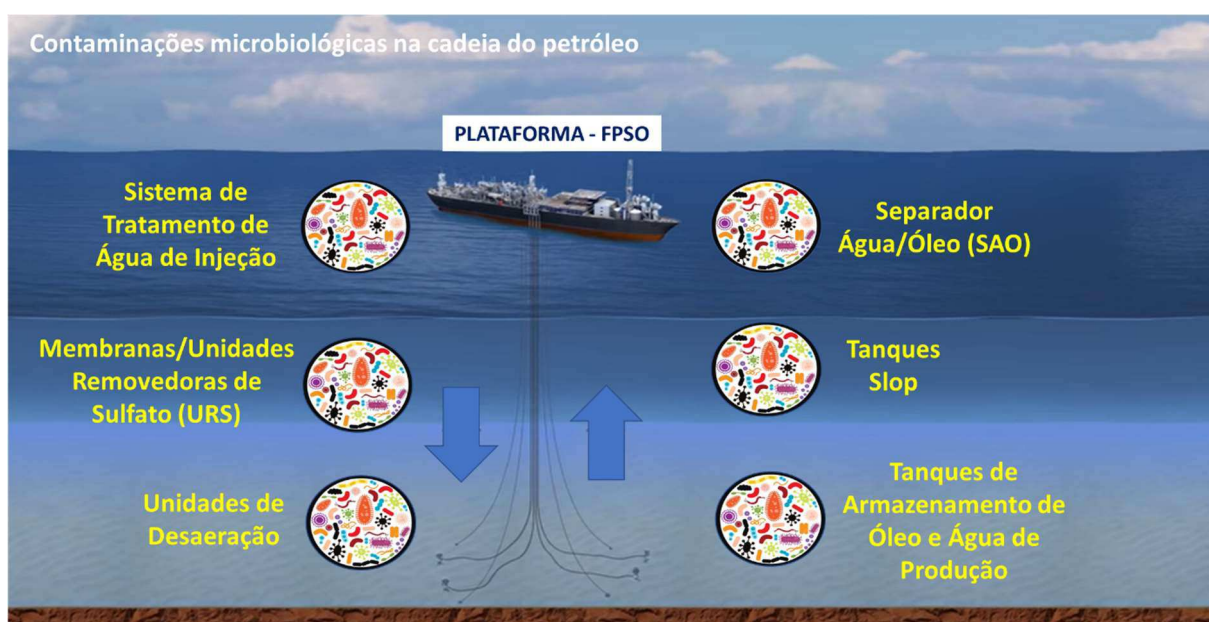
**Figura 2.** Sistemas da etapa de completção de poços de petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

Assim como nos fluidos de perfuração, os fluidos de completção são susceptíveis ao crescimento indesejado de microrganismos que podem utilizar seus componentes como fonte de nutrientes e degradá-los alterando suas propriedades. Dentre esses componentes, destaca-se a goma xantana, um polissacarídeo contendo glicose, manose e ácido glicurônico amplamente utilizado como viscosificante

(CHATURVEDI et al., 2021). Portanto, para evitar a degradação dos fluidos e a geração de  $H_2S$ , faz-se necessário o tratamento adequado dos fluidos com produtos biocidas, caso eles não sejam preparados e utilizados dentro de um período máximo de 24 horas (OLIVEIRA; SOUSA; WALDOW, 2022; PETROBRAS, 2020).

Durante as etapas de perfuração e completação, contaminações microbianas, sobretudo associadas à corrosão e geração de  $H_2S$ , também podem ser encontradas em **duto de hibernação (Figura 1)**, os quais são lançados na coluna d'água e no leito marinho e geralmente preenchidos com água do mar. Esses dutos irão futuramente conectar os poços à plataforma, sendo que o tempo entre essas ações pode ser muito longo (de alguns meses a até anos), permitindo a proliferação de microrganismos em seu interior (LACERDA et al., 2011; OLIVEIRA, 2019; SANTOS et al., 2012).

Já na **etapa de produção**, contaminações microbiológicas podem ocorrer em diferentes sistemas desde o início da produção, como nos sistemas de tratamento de água do mar para injeção; ou podem aparecer nos sistemas de processamento primário, ao longo da vida útil da plataforma, geralmente, alguns anos após iniciada a injeção de água do mar para recuperação secundária do petróleo, à medida que o volume de água produzida aumenta (**Figura 3**).



**Figura 3.** Sistemas da etapa de produção do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

Nos **sistemas de tratamento de água do mar para injeção**, as contaminações microbianas estão associadas em geral à geração de  $H_2S$  e corrosão das linhas de injeção, o que além de reduzir a vida útil dessas linhas, aumentando riscos de falhas, furos e vazamentos, também pode contribuir com o aumento significativo no teor de sólidos (resíduos de corrosão e/ou biomassa microbiana) injetados no reservatório, provocando perda de injetividade por tamponamento/plugueamento dos poros das rochas, sobretudo quando é feita a reinjeção da água produzida (BADER, 2007; COTE et al., 2014; GAO et al., 2021; OLIVEIRA; WALDOW, 2021a, 2021b; OLIVEIRA; WALDOW; SOUSA, 2021).

Ainda nos sistemas de injeção, são pontos críticos de contaminação microbiana as **unidades de remoção de sulfatos (URS)**, também chamadas de dessulfatadoras e as **unidades desaeradoras**. As URS, são compostas por conjuntos de membranas de desulfatação, as quais limitam a passagem do íon sulfato, que por sua vez é concentrado e descartado como rejeito, mas permitem a passagem da água e demais sais, gerando uma água de injeção de melhor qualidade (BARAKA-LOKMANE et al., 2018; BENNETT, 2012; DAVIS; MCELHINEY, 2002; PEDENAUD; HURTEVENT; BARAKA-LOKMANE, 2012). Já as unidades desaeradoras, são compostas por um vaso, onde geralmente é dosado bissulfito de sódio com sequestrante de oxigênio ( $O_2$ ) para reduzir a corrosividade da água injetada (CARLBERG, 1976; DURDEVIC; RAJU; YANG, 2018; PEEL; HOWARTH; RAMSHAW, 1998; ROBINSON, 2010).

As URS passaram a ser utilizadas em plataformas mais recentemente com o objetivo de minimizar incrustações químicas. Contudo, muitas vezes elas apresentam perdas de fluxo (redução de vazão) devido ao crescimento de biofilmes microbianos na superfície das membranas (na face do concentrado/rejeito), processo conhecido por *biofouling* (o qual será definido com mais detalhes adiante), ocasionando paradas frequentes para limpeza, o que reduz sua vida útil e impacta sobretudo a injetividade, reduzindo a produção de petróleo (AKAMINE; SOUSA; WALDOW, 2021; BALDONI-ANDREY et al., 2015; HUPSEL et al., 2020; RIZK et al., 1998).

Já as unidades desaeradoras, normalmente possuem um recheio em seu interior para aumentar a superfície de contato e garantir a redução significativa do  $O_2$  dissolvido na água. Contudo, esse recheio também funciona como superfície para o crescimento microbiano e estabelecimento de biofilmes anaeróbios corrosivos, potenciais geradores de  $H_2S$ , o que pode comprometer a qualidade da água de injeção e integridade do sistema a montante (ECKERT, 2015; JENSEN et al., 2013;

SKOVHUS; ECKERT, 2014; SKOVHUS; ENNING; LEE, 2017; VIGNERON; HEAD; TSEMETZIS, 2018; WUNCH; STIPANIČEV; FRENZEL, 2021).

No extremo oposto ao sistema de injeção da plataforma, encontram-se os sistemas de produção de petróleo, conhecidos como **sistemas de processamento primário**, ou seja, todas as etapas e equipamentos responsáveis pelo processamento do petróleo a partir dos poços produtores. Nessas etapas, basicamente, ocorre a separação do óleo, do gás e da água de produção (THOMAS, 2001).

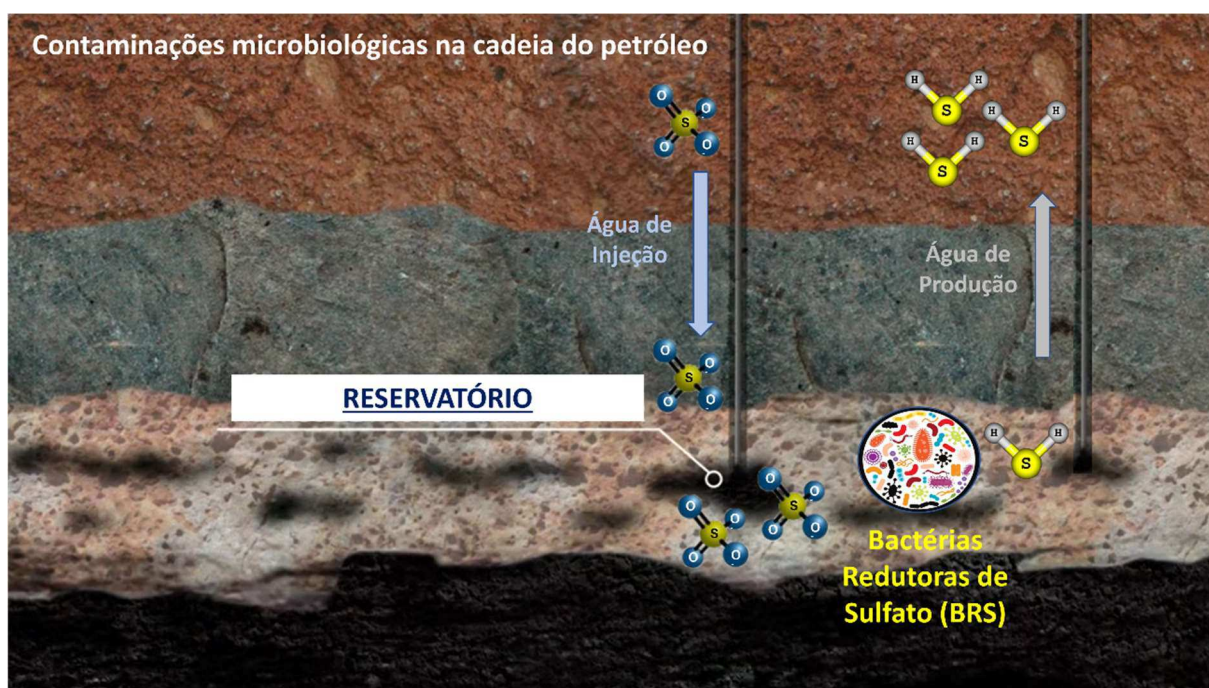
Após a separação, o óleo segue para tanques de armazenamento na própria plataforma ou diretamente para oleodutos. O gás é dessecado e segue para gasodutos ou é utilizado na própria plataforma e a água de produção segue para um tanque denominado *Slop*, para enquadramento no teor de óleos e graxas (TOG) conforme legislação ambiental (CONAMA, 2007), para posterior descarte no mar (FAKHRU'L-RAZI et al., 2009a; IGUNNU; CHEN, 2014; JIMÉNEZ et al., 2018; THOMAS, 2001).

Entretanto, ao longo da vida útil de uma plataforma, os volumes de água de produção vão aumentando substancialmente em relação ao volume de petróleo produzido, de modo que os sistemas de separação e armazenamento de petróleo e água não conseguem mais manter os níveis de eficiência. Assim, alguns sistemas passam a receber e acumular a água produzida, gerando pontos críticos de crescimento microbiano associados a problemas de corrosão e geração de H<sub>2</sub>S (CLARK; VEIL, 2009; GABARDO et al., 2011; THOMAS, 2001).

Tais problemas ocorrem sobretudo no **sistema de separação água/óleo (SAO)**, que passa a produzir petróleo com maiores teores de água e com maior tempo de detenção. Os **tanques Slop** passam a apresentar menor eficiência no enquadramento do TOG limitando, conseqüentemente, a produção de petróleo e aumentando a necessidade de transferência da água de produção para tratamento em terminais terrestres. Os **tanques de armazenamento de petróleo**, passam a conviver continuamente com maiores teores de água, aumentando a corrosão e a geração de H<sub>2</sub>S, o que além aumentar os riscos de furos, vazamentos e exposição ocupacional, contamina o petróleo gerando a necessidade de uso frequente de sequestrantes de H<sub>2</sub>S.

Considerando ainda a etapa de produção do petróleo, porém com foco agora no reservatório e não nas instalações de superfície, o processo de injeção de água do mar, leva consigo a injeção contínua de sulfato ao interior do reservatório, sobretudo

nas plataformas de campos maduros, mais antigas, que não possuem URS (MORAIS, 2013). Dessa forma, o sulfato se torna disponível e abundante tanto para os microrganismos autóctones, já presentes no reservatório, quanto para aqueles injetados junto com a água do mar, dentre eles as BRS, as quais podem se proliferar nos reservatórios gerando petróleo, água e gás com altos níveis de  $H_2S$  já nos poços produtores da plataforma (BASAFÁ; HAWBOLDT, 2019; GIEG; JACK; FOGHT, 2011; JOHNSON et al., 2017; VANCE; THRASHER, 2014) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Processo de geração biogênica de  $H_2S$  no interior dos reservatórios de petróleo estimulado pela injeção de água do mar e consequente produção de petróleo e água produzida com altos níveis de contaminação microbiana e  $H_2S$  (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

Esta **produção de  $H_2S$  biogênico no interior dos reservatórios** (que será abordada com maiores detalhes à frente, assim como a biocorrosão) é uma das situações mais críticas e de difícil mitigação, uma vez que a realização de processos ou a utilização de produtos efetivos no interior do reservatório são inviáveis. Portanto, os mesmos problemas de corrosão e de segurança ocupacional citados anteriormente, surgem de forma intrínseca ao poço produtor. Ou seja, o petróleo já chega na plataforma com altos teores de  $H_2S$  e de contaminação microbiana e então podem ser disseminados por todos os sistemas de processamento primário, escoamento e armazenamento do petróleo (HIDALGO et al., 2021).

Após concluídas todas as operações de processamento primário da etapa de produção, o petróleo segue para as etapas de **escoamento** e **armazenamento**, que compreendem as atividades de transferência, transporte e tancagem do petróleo (**Figuras 5 e 6**).

Em plataformas, o escoamento do petróleo pode ser realizado diretamente através de oleodutos submarinos, que conectam a plataforma a outras unidades *offshore* ou a terminais terrestres, ou através de um navio aliviador (mais conhecidos como navio de *offloading*) que coleta o petróleo dos tanques da plataforma através de um conjunto específico de mangotes e bombas (sistema de *offloading*) (**Figura 5**) e o transporta até os terminais terrestres (**Figura 6**), onde é armazenado em tanques (GROVE; STAMOPOULOS, 2022; LANQUETIN, 2006).



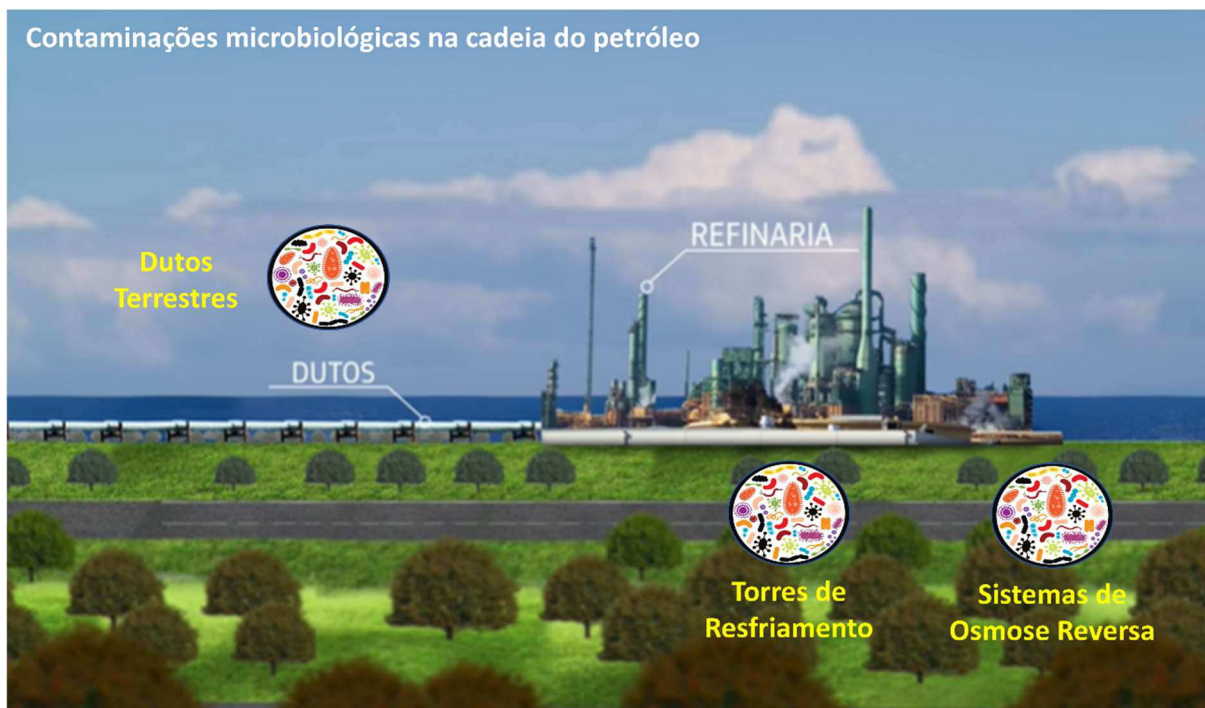
**Figura 5.** Sistemas da etapa de escoamento do petróleo em plataformas susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).



**Figura 6.** Sistemas da etapa de escoamento e armazenamento do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

Tanto os **oleodutos** e **sistemas de *offloading***, quanto os **tanques dos navios** e os **tanques dos terminais**, estão sujeitos às contaminações microbianas e aos problemas de corrosão e geração de  $H_2S$  associados. De modo geral, esses problemas tendem a ser mais severos, quanto maiores forem os teores de água de produção transportados e armazenados, podendo incorrer em riscos de furos e vazamentos, bem como riscos de exposição ocupacional ao  $H_2S$  em todas as etapas de movimentação do petróleo (BURGER et al., 2007; DEVRIES; SCOLES, 1984; PENKALA et al., 2004; ROBINSON et al., 2010).

A partir dos terminais terrestres, o petróleo é distribuído para as **refinarias** através de **oleodutos terrestres (Figura 7)**, nos quais, os problemas associados a contaminações microbianas tendem a ser menores, uma vez que os percentuais de água de produção são muito mais baixos, em torno de 1%, conforme a prática recomendada (NUNES et al., 2011)



**Figura 7.** Sistemas da etapa de refino do petróleo suscetíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

Entretanto, maiores concentrações de água eventualmente podem ser transportadas e algumas situações, mesmo quando a água se encontra enquadrada, podem favorecer o crescimento microbiano e a corrosão, como por exemplo, baixo fluxo de escoamento ( $> 1\text{m/s}$ ), fluxo intermitente, pontos de estagnação na malha de dutos e declives ou acíves na topografia do terreno que geram bolsões onde a água se acumula (SOOKNAH; PAPAIVINASA; REVIE, 2007; WANG; JAIN, 2016).

Ainda na etapa de refino, existem 2 sistemas operacionais da refinaria que estão sujeitos a contaminações microbianas, as membranas de osmose reversa e as torres de resfriamento (**Figura 7**).

As **unidades de osmose reversa**, fazem parte do sistema de tratamento de água para geração de água de processo de baixa salinidade para as operações de refino, visando sobretudo a prevenção de incrustações químicas nos sistemas operacionais (GARUD et al., 2011; KUCERA, 2015; WENTEN; KHOIRUDDIN, 2016).

Na superfície das membranas de osmose reversa, os biofilmes microbianos tendem a se formar provocando o *biofouling* (FLEMMING, 1997; HERZBERG; ELIMELECH, 2007; HERZBERG; KANG; ELIMELECH, 2009; MADDAH; CHOGLE, 2017; VROUWENVELDER et al., 2008), principalmente quando há reuso de efluentes, impedindo o fluxo através das membranas, provocando a queda da vazão e

consequentemente, impactando os processos de refino, principalmente a geração de vapor em caldeiras e portanto, a geração de energia para a refinaria (BELGINI et al., 2018; POTTS; AHLERT; WANG, 1981; SCHNEIDER et al., 2005).

Já as **torres de resfriamento**, realizam a troca térmica com linhas de processo do refino, onde o controle microbiológico é relevante na água da bacia da torre, para minimizar a formação de biofilmes e a corrosão nos trocadores de calor, o que pode reduzir a eficiência da troca térmica e provocar contaminação entre os fluidos, devido a furos nos trocadores, além de reduzir a vida útil do equipamento (AL-BLOUSHI et al., 2018; CHIEN et al., 2012; GULE; BEGUM; KLUMPERMAN, 2016; MATIJAŠEVIĆ, 2015; SPX COOLING TECHNOLOGIES, 2009; VEIGA, 2010).

Por fim, após o refino, os **derivados de petróleo** produzidos, também estão sujeitos a contaminações microbianas que podem causar tanto a degradação dos derivados, quanto a corrosão dos sistemas em que eles são transportados e armazenados (**Figura 8**).



**Figura 8.** Sistemas da etapa de armazenamento e distribuição de derivados do petróleo susceptíveis a problemas associados a contaminações microbianas (adaptado a partir de PETROBRAS, 2016).

Tais impactos da contaminação microbiana nos derivados, podem ocorrer tanto nos tanques da própria refinaria, quanto nos terminais de distribuição, postos de combustíveis ou mesmo em seu uso final, como por exemplo, com os combustíveis

de primeiro enchimento de moto geradores ou tanques e motores de veículos, tais como caminhões, navios e aeronaves, cujo tempo de armazenamento entre a fabricação e a comercialização, são normalmente mais longos (LAPUERTA; SÁNCHEZ-VALDEPEÑAS; SUKJIT, 2014; ROCHA et al., 2016).

Dada tal contextualização, é possível constatar que contaminações microbianas são susceptíveis de ocorrerem em uma ampla gama de sistemas e equipamentos ao longo de todas as etapas da cadeia produtiva da indústria do petróleo, de modo que os respectivos problemas associados à presença indesejada e nociva desses microrganismos, ainda são de grande relevância prática e um importante objeto de estudo para o desenvolvimento de tecnologias de prevenção e controle.

### **2.1.2. Principais problemas associados a contaminações microbianas**

De modo geral, os problemas relacionados às contaminações microbianas nos sistemas da indústria do petróleo se concentram em 5 efeitos nocivos: **(i) bioincrustação; (ii) biodegradação; (iii) biodeterioração; (iv) geração biogênica de H<sub>2</sub>S; e (v) biocorrosão** (AUGUSTINOVIC et al., 2012; DAVIS; UPDEGRAFF, 1954; FLEMMING, 2011; SANDERS; STURMAN, 2014; VIDELA, 2003, 1996; WALDOW, 2018; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

**A bioincrustação (biofouling) refere-se ao aumento excessivo de biomassa** microbiana em ambientes como poros das rochas, equipamentos, superfícies metálicas, revestimentos e membranas. A bioincrustação também pode estar associada a todos os demais problemas (biodegradação, biodeterioração, geração biogênica de H<sub>2</sub>S e biocorrosão) e inclui o depósito de resíduos resultantes da reação de metabólitos inorgânicos com íons metálicos, como a formação de sulfeto de ferro (FeS) devido à reação do H<sub>2</sub>S biogênico com o ferro (Fe<sup>2+</sup>) ou a formação de carbonato de ferro (FeCO<sub>3</sub>) devido à reação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) biogênico com o Fe<sup>2+</sup> (FLEMMING, 2011, 2008; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Os principais problemas causados pela bioincrustação são: obstrução e entupimento em reservatórios, equipamentos e dutos; perda de injetividade e de fluxo; redução da permeabilidade e eficiência de membranas; perda de estabilidade e excesso de peso em embarcações e equipamentos *offshore*, como *manifolds*, *risers* e dutos (FLEMMING, 2011; SANDERS; STURMAN, 2014; VIDELA, 2003).

A **biodegradação** e a **biodeterioração**, referem-se a alterações causadas em compostos orgânicos devido à ação de microrganismos e, muitas vezes, são termos utilizados como sinônimos (FALKIEWICZ-DULIK; JANDA; WYPYCH, 2015).

Em ciências da vida e ambientais, o termo biodegradação, é normalmente utilizado para se referir a um processo desejado e benéfico. Enquanto, o termo biodeterioração, em geral, é utilizado quando o processo é indesejado e maléfico, ocasionando danos e prejuízos (SCHMIDT, 2006). Já em ciências de materiais e na indústria do petróleo, classicamente, o termo biodegradação, se refere a fluidos, a produtos químicos e ao próprio petróleo e seus derivados, enquanto o termo biodeterioração, se refere aos materiais não metálicos (VIDELA, 2003, 1996).

A **biodegradação de fluidos e produtos químicos** ocorre quando os microrganismos se proliferam e degradam um ou mais de seus constituintes, fazendo com que as propriedades mínimas necessárias para sua utilização no processo aos quais se destinam, se percam ou sejam significativamente alteradas. Dentre os efeitos deletérios da biodegradação, podem ser citados: a alteração da viscosidade de fluidos de perfuração, de completação ou hidrostáticos; e a degradação de diversos produtos, como polímeros, melhoradores de escoamento, sequestrantes de oxigênio ( $O_2$ ) ou de  $H_2S$ , inibidores de incrustação, de corrosão, de parafinas ou de hidratos, viscosificantes, surfactantes, emulsificantes, desemulsificantes, floculantes, dispersantes, antiespumantes e até mesmo biocidas (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Já a **biodegradação do petróleo e seus derivados** se refere à oxidação parcial ou completa dos hidrocarbonetos, o que pode levar a uma perda da qualidade tanto do petróleo original presente nos reservatórios (HEAD; GRAY; LARTER, 2014; HEAD; JONES; LARTER, 2003), quanto do petróleo após sua produção e refino (derivados) presentes em dutos e tanques, onde qualquer residual de água pode favorecer a proliferação microbiana (GAYLARDE; BENTO; KELLEY, 1999; PASSMAN, 2013; YEMASHOVA et al., 2007).

E a **biodeterioração de materiais** pode ser vulgarmente considerada a “biocorrosão” de materiais não metálicos, pois se refere à formação de biofilmes nas superfícies de materiais compósitos ou de polímeros orgânicos utilizados como revestimento em diversos equipamentos ou superfícies de dutos e *risers*, levando à perda ou alteração das propriedades destes materiais, como a resistência mecânica,

ou expondo outras superfícies (geralmente metálicas) mais suscetíveis a processos corrosivos (GU, 2012; VIDELA, 2003).

Por fim, a **geração biogênica de H<sub>2</sub>S** e a **biocorrosão** se referem aos principais problemas e focos de interesse para o desenvolvimento de tecnologias de controle microbiano e mitigação dos problemas associados, bem como de metodologias de avaliação, caracterização e monitoramento, mais eficientes e adequadas às necessidades da indústria do petróleo. A geração biogênica de H<sub>2</sub>S e a biocorrosão, são os problemas abordados neste estudo e, portanto, serão apresentados com mais detalhes a seguir.

## 2.2. GERAÇÃO BIOGÊNICA DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S)

Na indústria do petróleo, a geração biogênica de H<sub>2</sub>S, também conhecida como **acidulação biogênica** ou **souring biogênico** (*biological souring*) é um processo que ocorre em reservatórios e em diferentes sistemas de produção (BARTON; FAUQUE, 2009; GIEG; JACK; FOGHT, 2011; HAMILTON, 1985; JOHNSON et al., 2017; MUYZER; STAMS, 2008; VIDELA, 1996).

A injeção de água do mar nos reservatórios *offshore* é utilizada convencionalmente como processo de recuperação do petróleo. A água do mar é rica em sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), apresentando tipicamente concentrações na ordem de 2.700 mg/l (28 mM) (PEDENAUD; HURTEVENT; BARAKA-LOKMANE, 2012). Devido a tais concentrações, o sulfato se relaciona a dois problemas operacionais em sistemas de produção de petróleo: **(i) a incrustação química** e **(ii) a geração biogênica de H<sub>2</sub>S**.

A incrustação química ocorre devido à mistura da água do mar injetada nos reservatórios de petróleo, rica em sulfato, com a água de formação do reservatório, a qual geralmente é rica em bário (Ba<sup>2+</sup>) e estrôncio (Sr<sup>2+</sup>), resultando em incrustações de sulfato de bário (BaSO<sub>4</sub>) e sulfato de estrôncio (SrSO<sub>4</sub>) (PEDENAUD; HURTEVENT; BARAKA-LOKMANE, 2012). Essas incrustações podem causar sérios problemas operacionais, como a perda de injetividade, o tamponamento dos reservatórios e até mesmo a perda de poços injetores, resultando em enormes prejuízos operacionais.

Já a geração biogênica de H<sub>2</sub>S, ocorre devido à atividade de microrganismos sulfetogênicos, com destaque para os **Procariotos Redutores de Sulfato (PRS)** - *Sulfate-Reducing Prokaryotes* (SRP) (BARTON; FAUQUE, 2009; GIEG; JACK;

FOGHT, 2011; MUYZER; STAMS, 2008; RABUS et al., 2015; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2013). Os PRS englobam tanto as **Arqueias Redutoras de Sulfato (ARS)** quanto as **Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)**. Contudo, o termo BRS costuma ser utilizado num sentido amplo, incluindo também as ARS e, portanto, essa terminologia genérica (BRS) também foi adotada neste trabalho.

Os procedimentos convencionais de injeção de água nos reservatórios de petróleo e posteriormente, a presença da água produzida nos sistemas de superfície, geram condições favoráveis ao crescimento das BRS em diferentes cenários operacionais. Por serem microrganismos anaeróbicos que possuem metabolismo diverso, que tendem a crescer prioritariamente em ambientes anóxicos e que são metabolicamente ativos em uma ampla faixa de condições ambientais (GIEG; JACK; FOGHT, 2011; LI et al., 2017; TIAN et al., 2017; VOORDOUW et al., 1996).

Conforme explanado anteriormente, os problemas decorrentes desse tipo de contaminação podem ocorrer ao longo de toda a cadeia produtiva do petróleo, desde os sistemas de injeção, passando pelos reservatórios, até os sistemas de processamento primário, escoamento e armazenamento do petróleo.

Além da geração biogênica, o  $H_2S$  também pode ser formado no interior dos reservatórios através de três **processos abióticos**: **(i)** a redução termoquímica do sulfato (TSR - *thermochemical sulfate reduction*); **(ii)** a termólise de compostos aromáticos organossulfurados; e, **(iii)** a dissolução redutiva de sulfetos metálicos (BASAFÁ; HAWBOLDT, 2019).

Contudo, estes processos ocorrem sob condições específicas e extremas de temperatura e pressão, de modo que em reservatórios, são processos que em geral ocorreram durante a formação geológica do petróleo, ou seja, nos casos em que a presença de  $H_2S$  foi gerada devido a processos termoquímicos, os teores de  $H_2S$  encontrados podem ser considerados intrínsecos àquele petróleo e não se alteram ao longo do tempo de exploração e produção daquele reservatório. Enquanto o  $H_2S$  devido à geração biogênica pode aparecer em petróleos que não apresentavam elevados teores de  $H_2S$  no início da produção e tendem a aumentar ao longo do tempo de produção, conforme aumentam os volumes de água injetada em relação ao volume de óleo no reservatório.

O enxofre (S) é um elemento químico essencial para o metabolismo assimilatório de todos os organismos vivos, pois é utilizado na síntese de proteínas, coenzimas e agrupamentos ferro-enxofre (FIKE; BRADLEY; ROSE, 2015; KESSLER,






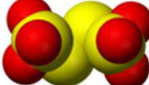
2006). Já os compostos sulfurados servem como doadores e aceptores de elétrons no metabolismo dissimilatório de diversos microrganismos (GREIN et al., 2013; MUYZER; STAMS, 2008).

O enxofre ocorre no meio ambiente principalmente em três formas: **(i)** o enxofre elementar ( $S_n^0$ ), encontrado em fontes termais e em regiões vulcânicas; **(ii)** os sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), encontrados em minerais como a gipsita ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ), que se forma sob condições óxicas; e **(iii)** os sulfetos ( $S^{2-}$ ), encontrados em minerais como a pirita ( $FeS_2$ ), que se formam sob condições anóxicas. Por sua vez, essas 3 (três) formas de enxofre estão envolvidas nos processos dissimilatórios mais importantes do ciclo biogeoquímico do enxofre: **(i)** a redução ou dismutação do enxofre elementar; **(ii)** a redução do sulfato; e, **(iii)** a oxidação do  $H_2S$  (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Todos os processos do ciclo do enxofre ocorrem comumente em ambientes da indústria do petróleo, contudo, a redução do sulfato (ou de outros compostos sulfurados) ainda é o processo mais estudado e que recebe maior atenção e preocupação devido à geração do  $H_2S$  e de seus potenciais riscos ocupacionais e operacionais.

O mecanismo metabólico de geração biogênica de  $H_2S$  clássico mais conhecido envolve a utilização do sulfato comoceptor final de elétrons na respiração anaeróbia, reduzindo-o a  $H_2S$  (DALL'AGNOLL; MOURA, 2010; MÜLLER et al., 2015; PLUGGE et al., 2011). Entretanto, vários compostos sulfurados oxidados (**Tabela 1**) além do sulfato, como por exemplo, sulfito ( $SO_3^{2-}$ ), tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), enxofre elementar ( $S_n^0$ ) e tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ), podem ser utilizados por diferentes microrganismos no processo de respiração anaeróbica levando à geração do  $H_2S$  (WALDOW, 2018).

**Tabela 1.** Estrutura molecular do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e de alguns compostos sulfurados envolvidos na acidulação biogênica ou *souring* biogênico (*biological souring*). As esferas amarelas representam os átomos de enxofre, as vermelhas os átomos de oxigênio e as brancas os átomos de hidrogênio. Modificado de WALDOW (2018).

Composto sulfurado	Fórmula Química	Representação molecular
Sulfeto de hidrogênio	H <sub>2</sub> S	
Sulfato	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Sulfito	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	
Tiosulfato	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	
Enxofre elementar	S <sub>n</sub> <sup>0</sup>	
Tetrationato	S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	

Quanto à distribuição taxonômica, dentre os microrganismos conhecidos, capazes de reduzir compostos sulfurados, são encontrados representantes distribuídos tanto no domínio Bacteria, quanto Archaea.

No domínio Bacteria, já foram identificados até o momento, representantes em quatro filós: **(i) Proteobacteria**, em vários gêneros da classe Deltaproteobacteria; **(ii) Firmicutes**, em vários gêneros da classe Clostridia; **(iii) Nitrospira**, no gênero *Thermodesulfovibrio*; e **(iv) Thermodesulfobacteria**, nos gêneros *Thermodesulfobacterium* e *Thermodesulfatator* (BARTON; FAUQUE, 2009; MUYZER; STAMS, 2008; YOUSSEF; ELSHAHED; MCINERNEY, 2009).

Já no domínio Archaea foram identificados representantes de três gêneros em dois filós: **(i) Euryarchaeota**, no gênero *Archaeoglobus* (AMIN ALI et al., 2020; BEEDER et al., 1994; BIRKELAND et al., 2017; STETTER et al., 1987); e **(ii) Crenarchaeota**, nos gêneros *Thermocodium* e *Caldivirga* (ITOH; IINO, 2013; ITOH; SUZUKI; NAKASE, 1998; ITOH; SUZUKI; SANCHEZ, 1999; JAY et al., 2016).

Entretanto, por se tratar de microrganismos de difícil cultivo e que muitas vezes estabelecem relações simbióticas estreitas, poucos laboratórios de microbiologias dispõem de infraestrutura adequada para estudos de ampla investigação do metabolismo desses microrganismos, portanto, ainda há muito para se desvendar. Um trabalho razoavelmente recente, por exemplo, identificou genes marcadores para a redução de sulfito a sulfeto em treze outros filos de Bacteria e Archaea, dos quais oito não possuem nenhum membro cultivado (ANANTHARAMAN et al., 2018).

O  $H_2S$ , também denominado de **gás sulfídrico**, é um gás ligeiramente mais pesado que o ar, corrosivo, explosivo (de 4,3 a 45 % de volume no ar), inflamável (com temperatura de ignição de  $260^\circ C$ ) e extremamente tóxico, com elevado risco à saúde ocupacional. Quando em solução aquosa, as formas químicas de  $H_2S$  e de bissulfeto ( $HS^-$ ) se encontram em um equilíbrio dinâmico contínuo, independente da sua forma química, a denominação  $H_2S$  é geralmente utilizada por conveniência para se referir de maneira conjunta a essas duas espécies químicas (MALONE RUBRIGHT; PEARCE; PETERSON, 2017; MAY et al., 2018; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

A presença do  $H_2S$  reduz o valor de mercado do petróleo no qual se encontra dissolvido. Os petróleos que apresentam teores de enxofre acima de 0,5 % (m/m), também chamados de petróleos “azedos”, são menos valorizados, pois precisam passar por uma etapa de dessulfurização durante seu processo de refino. Essa remoção de enxofre é necessária pois o enxofre presente no petróleo e subsequentemente nos derivados e combustíveis, pode causar o envenenamento de catalisadores em unidades de reforma catalítica de refinarias e de conversores catalíticos em automóveis; além disso, a queima de combustíveis contendo enxofre resulta na emissão de dióxido de enxofre ( $SO_2$ ), que é um poluente atmosférico (GOGOI; BEZBARUAH, 2002).

Em sistemas operacionais, o  $H_2S$  é responsável por problemas e danos às instalações e processos devido à corrosão de superfícies metálicas, ocasionando necessidades de intervenções e manutenções, além da necessidade de procedimentos de segurança e classificação de risco em áreas com potencial presença de  $H_2S$ . Portanto, a geração de  $H_2S$  representa custos elevados de monitoramento, controle e mitigação para a indústria do petróleo (BARTON; FARDEAU; FAUQUE, 2014; GIEG; JACK; FOGHT, 2011; JOHNSON et al., 2017; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

### 2.2.1. Limites de H<sub>2</sub>S em atividades ocupacionais

Em relação à saúde ocupacional no Brasil, o risco de exposição do trabalhador ao H<sub>2</sub>S é regulamentado pela Norma Regulamentadora número 15 (NR-15) do antigo Ministério do Trabalho, atual Secretaria do Trabalho, uma subdivisão da Secretaria Especial de Previdência e Trabalho (SEPRT) do Ministério da Economia, a qual dispõe sobre “Atividades e Operações Insalubres” (NR-15, 1978).

A NR-15 estabelece as atividades que devem ser consideradas insalubres, gerando direito a adicional de insalubridade aos trabalhadores que exercem atividades ou operações nas quais é inerente a exposição a um agente químico insalubre. A caracterização de insalubridade ocorre quando são ultrapassados os limites de tolerância estabelecidos para os agentes químicos constantes no Anexo 11 da referida norma.

O Anexo 11 apresenta os agentes químicos cuja insalubridade é caracterizada por limite de tolerância e inspeção no local de trabalho, dentre eles o H<sub>2</sub>S, cujos limites de tolerância na fase gasosa do ambiente de trabalho, constam no Quadro 1 do referido Anexo e estão apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Limites de tolerância de exposição do trabalhador ao H<sub>2</sub>S na fase gasosa no ambiente de trabalho conforme NR-15 (NR-15, 1978).

LIMITES DE TOLERÂNCIA	Até 48 horas/semana	
	ppm*	mg/m <sup>3</sup> **
Agente químico		
Gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)	8	12

\* ppm - partes de vapor ou gás por milhão de partes de ar contaminado.

\*\* mg/m<sup>3</sup> - miligramas por metro cúbico de ar

Conversão: 1 ppm = 1,40 mg/m<sup>3</sup> (NIOSH, 2019)

Segundo a Secretaria do Trabalho, os limites de tolerância determinados na NR-15 utilizaram como base, valores do *Threshold Limits Values* (TLV) do texto da *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) de 1976, e foram adaptados, quando de sua criação, à jornada brasileira de 48 horas semanais, constante na Consolidação das Leis do Trabalho (CLT).

Os limites de tolerância são válidos para a absorção por via respiratória. Segundo a NR-15, a avaliação das concentrações do agente químico, através de métodos de amostragem instantânea, de leitura direta ou não, deverá ser feita pelo

menos em dez amostragens ao nível respiratório do trabalhador, respeitando-se um intervalo de no mínimo 20 minutos entre cada amostragem. Cada uma das concentrações obtidas nas referidas amostragens não deverá ultrapassar os valores calculados pela seguinte equação:

$$\text{Valor máximo} = \text{L.T.} \times \text{F.D.}$$

Onde: L.T. = limite de tolerância para o agente químico e F.D. = fator de desvio.

O fator de desvio encontra-se no Quadro 2 da referida norma e é definido por faixas de concentração do limite de tolerância para o agente químico. No caso do H<sub>2</sub>S, o fator de desvio será 2 ou 1,5 a depender da unidade de medição aferida, conforme apresentado na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Fatores de desvio para o cálculo do valor máximo (limite instantâneo) de exposição ao H<sub>2</sub>S conforme a NR-15 (NR-15, 1978).

LIMITES DE TOLERÂNCIA (ppm ou mg/m <sup>3</sup> )	FATORES DE DESVIO
1 a 10	2
10 a 100	1,5

Sendo assim, para o H<sub>2</sub>S, o limite de tolerância, ou seja, a concentração média ponderada (TWA - *time weighted average*, também denominada de LTEL - *Long Term Exposure Limit*) admitida à exposição do gás durante 8 horas consecutivas de trabalho é de 8 ppm, portanto, o valor máximo, também chamado de limite instantâneo, será de 16 ppm, ou seja, ao longo da jornada de trabalho, as atividades devem ser imediatamente interrompidas se a concentração de exposição ao H<sub>2</sub>S atingir 16 ppm.

Além desses valores de referência, geralmente os equipamentos de medição de H<sub>2</sub>S para monitoramento de atividades de risco ocupacional também trazem um alarme para um valor denominado STEL - *Short Term Exposure Limit*, que se refere à concentração máxima de exposição ao gás durante 15 minutos consecutivos, sem causar danos à saúde, a qual, para o H<sub>2</sub>S, é de 10 ppm (ENESENS, 2015).

É importante ressaltar que atividades laboratoriais exercidas em Instituições de Ciência e Tecnologia, tais como Universidades, Institutos e Centros de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), ou mesmo em laboratórios de serviços, utilizando microrganismos produtores de H<sub>2</sub>S, não caracteriza atividade ou operação insalubre segundo a NR-15. Nessas atividades, de modo geral, as concentrações de H<sub>2</sub>S no

ambiente de trabalho, ou seja, na fase gasosa, não ultrapassam os limites de tolerâncias estabelecidos na norma, mesmo quando altas concentrações na fase aquosa de culturas microbianas e/ou experimentos laboratoriais são observadas (tipicamente de 100 a 1000 mg/L).

Ainda assim, é facilmente possível sentir o odor característico do H<sub>2</sub>S em atividades de rotina em laboratórios de microbiologia que trabalham com microrganismos sulfetogênicos, e apesar de não oferecer risco ocupacional segundo a NR-15, é altamente recomendável que todas as atividades com eventual geração de H<sub>2</sub>S sejam realizadas em cabine de segurança biológica ou capela química, bem como os ambientes laboratoriais permaneçam com boa ventilação ou preferencialmente, com exaustão forçada.

O H<sub>2</sub>S é um gás incolor com forte odor característico de ovo podre. Segundo as recomendações da NIOSH - *The National Institute for Occupational Safety and Health* dos EUA, a exposição ao H<sub>2</sub>S pode causar irritação aos olhos e ao sistema respiratório e, em situações críticas, pode levar à apneia, coma, convulsões, tontura, dor de cabeça, fraqueza, irritabilidade, insônia, dores de estômago e, se líquido, ulceração pelo frio (NIOSH, 2019).

O atendimento e adequação dos ambientes de trabalho aos limites de exposição ao H<sub>2</sub>S são extremamente relevantes, pois a exposição do ser humano a altas concentrações de H<sub>2</sub>S pode levar à morte imediata ou trazer drásticas consequências à saúde. A **Tabela 4** apresenta algumas concentrações de referência e as reações e/ou consequências da exposição do ser humano ao H<sub>2</sub>S no ambiente de trabalho (ASTDR, 2021; ECHA, 2021; MALONE RUBRIGHT; PEARCE; PETERSON, 2017; NIOSH, 2019; NR-15, 1978; OSHA, 1970).

**Tabela 4.** Concentrações de referência e reações e/ou consequências da exposição do ser humano ao H<sub>2</sub>S no ambiente de trabalho.

<b>Concentração de H<sub>2</sub>S no ambiente (ppm)</b>	<b>Reações/Consequências</b>
0,0005	Concentração mínima detectável pelo olfato humano (ATSDR)
2 a 5	Exposição prolongada pode causar náuseas, lacrimejamento, dores de cabeça, perda de sono e constrição brônquica (OSHA)
5	Limite de exposição ocupacional segundo a ECHA
8	Limite de exposição ocupacional segundo a NR-15
10	Limite de exposição ocupacional segundo a NIOSH
20	Fadiga, perda de apetite, dor de cabeça, irritação e tontura (OSHA)
50 a 100	Irritação ocular (conjuntivite), irritação do trato respiratório após 1 h de exposição, distúrbios digestivos (OSHA)
100 a 150	Tosse, perda do olfato após 2 a 15 min, respiração alterada, dor nos olhos e sonolência após 15 a 30 min, irritação na garganta após 1 h. Aumento gradual na gravidade desses sintomas quanto maior o tempo de exposição e dentro de 48 h (OSHA)
200 a 300	Conjuntivite grave, irritação do trato respiratório após 1 h e edema pulmonar por exposição prolongada (OSHA).
444	Concentração letal (CL <sub>50</sub> ) com 4 h de exposição (ECHA)
500 a 700	Colapso em 5 min, danos graves aos olhos, perda de consciência e morte em 30 min a 1 h (OSHA)
720	Concentração letal (CL <sub>50</sub> ) com 1 h de exposição (ECHA)
700 a 1000	Perda rápida da consciência com apenas 1 ou 2 inalações e morte em alguns minutos (ATSDR e OSHA)
1000 a 2000	Inconsciência imediata, interrupção da respiração e morte em poucos minutos, sendo que a morte pode ocorrer mesmo se o indivíduo for removido para o ar fresco de imediato (OSHA)

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR, 2021);

OSHA - Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 1970);

ECHA – European Chemical Agency (ECHA, 2021);

NR-15- Norma Regulamentadora 15 (NR-15, 1978);

NIOSH - The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH, 2019).

### **2.2.2. Limites de H<sub>2</sub>S em atividades operacionais**

Além dos riscos ocupacionais apresentados acima, relacionados à exposição humana ao gás sulfídrico no ambiente, a presença do H<sub>2</sub>S em sistemas industriais representa um grande risco e uma série de problemas operacionais em diferentes sistemas e processos da indústria do petróleo.

A geração biogênica do H<sub>2</sub>S geralmente ocorre na fase aquosa de fluidos (que é onde os microrganismos se proliferam), portanto, quando em mistura com o petróleo o problema tende a ser mais impactante quanto maior for a proporção de água em relação ao volume total de petróleo, ou seja, quanto maior for o teor de sedimentos e água presentes no petróleo (ou BSW - *Basic Sediments and Water*), maiores serão os riscos associados e a necessidade de monitoramento e enquadramento adequado.

De modo geral, o H<sub>2</sub>S produzido torna os fluidos mais corrosivos, pois se dissocia na fase aquosa reduzindo significativamente o pH do fluido, além disso, em contato com superfícies metálicas, reage com o íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>), gerando **depósitos de sulfeto de ferro** (FeS) conforme a reação abaixo (ENNING; GARRELFs, 2014; VENZLAFF et al., 2013).



Os depósitos de FeS quando secos, em contato com o ar, podem entrar em ignição espontânea, portanto, representam outro grave problema de segurança, armazenamento e descarte (SMART, 2011).

A reação de formação do FeS libera hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>), que tem alta fugacidade, ou seja, grande capacidade de difusão em materiais metálicos, ocasionando um tipo de corrosão denominada **fragilização por hidrogênio** (*hydrogen embrittlement - HE*), à qual, praticamente todas as ligas metálicas estão sujeitas (ORIANI, 1978; WOODTLI; KIESELBACH, 2000). Sendo assim, o H<sub>2</sub>S acaba sendo um dos principais influenciadores de danos causados pela fragilização por H<sub>2</sub> (GARCIA et al., 2012; HINCAPIE-LADINO; FALLEIROS, 2015; MINGOTTI, 2017).

A fragilização por hidrogênio é responsável pelo crescimento subcrítico de trincas no material, início de fratura e falha catastrófica, com subsequente perda de propriedades mecânicas do material. Isso ocorre devido ao fato do H<sub>2</sub> penetrar e se dispersar através de inclusões, poros ou microfissuras do metal, formando bolhas que aumentam a pressão local, propagando gradativamente microfissuras e rachaduras ao ponto de ocasionar falha abrupta e rompimento de toda a extensão de uma superfície metálica, como por exemplo, a parede de um duto ou um tanque (DWIVEDI; VISHWAKARMA, 2018; NAGUMO, 2016; WOODTLI; KIESELBACH, 2000).

Além disso, os biofilmes não se desenvolvem de modo homogêneo nos sistemas industriais, portanto, a corrosão associada a biofilmes e à geração biogênica de H<sub>2</sub>S pelas BRS, é um fenômeno localizado e não uniforme, que se dá pela

formação de pontos de corrosão localizada denominados de *pits*. Esse tipo de corrosão é comumente chamada de **corrosão pitiforme** e trata-se de uma corrosão de difícil detecção pelos métodos convencionais que se baseiam na perda de espessura uniforme da superfície metálica (CHAVES; MELCHERS, 2011; KAKOOEI; ISMAIL; ARIWAHJOEDI, 2012; LARSEN; et al., 2010; LITTLE; LEE, 2014; LITTLE; WAGNER; MANSFELD, 1992; LOTO, 2017; SOOKNAH; PAPA VINASAM;; REVIE, 2008; STAROSVETSKY et al., 2001; VIDELA, 2003, 1996).

Em função dessas características, a prevenção e minimização dos riscos operacionais associados ao H<sub>2</sub>S se baseiam na medição e controle dos níveis de H<sub>2</sub>S nos sistemas industriais, sendo que para certos cenários, alguns limites de H<sub>2</sub>S foram estabelecidos, levando em consideração também a especificação dos materiais normalmente utilizadas na construção desses sistemas.

Do ponto de vista operacional, os principais limites de H<sub>2</sub>S recomendados são:

- (i) **2,0 ppm (mg/L) para águas de injeção** em reservatórios de petróleo (que atualmente engloba também **águas de reinjeção**), o qual se encontra estabelecido nos Manuais de Tratamento de Águas de Injeção de unidades operacionais, atribuído como uma das métricas de um índice denominado IQUAI – Índice de Qualidade de Águas de Injeção;
- (ii) **5,0 ppm (mg/kg) no petróleo para operações de *offloading***, tanto na transferência de petróleo de plataformas para os navios-aliviadores, quanto dos navios-aliviadores para os terminais, e nas unidades de produção *onshore*, o qual se encontra estabelecido nos padrões operacionais de cada unidade de produção;
- (iii) **0,1 ppm (mg/L) para hibernação de dutos flexíveis**, quando utilizada água doce como alternativa à água do mar tratada e o tempo de hibernação for inferior a 1 ano, porém, superior ao tempo recomendado pelo fabricante do duto flexível, o qual se encontra estabelecido em especificações técnicas da área de exploração e produção de cada unidade de produção.

O enquadramento dos teores de H<sub>2</sub>S nestes limites operacionais é realizado através de procedimentos para a minimização e controle da geração biogênica do H<sub>2</sub>S (procedimentos físicos e uso de produtos químicos biocidas, os quais serão abordados com maiores detalhes mais adiante) e em última instância, adotando

procedimentos de mitigação do H<sub>2</sub>S já produzido e acumulado nos fluidos e no petróleo, através do uso de produtos químicos sequestrantes de H<sub>2</sub>S.

Um cenário relevante de geração biogênica de H<sub>2</sub>S onde não há um limite de H<sub>2</sub>S mínimo estabelecido, porém, que merece ser citado com mais detalhes, por se tratar de um dos principais cenários potenciais de aplicação desse trabalho, são os **fluidos de sistemas em hibernação de plataformas**. Estes sistemas são aqueles que se encontram parados ou em funcionamento parcial por até 180 dias. Nesses casos, o H<sub>2</sub>S deve estar ausente no fluido de hibernação tratado e deve ser monitorado ao longo da hibernação a fim de se avaliar a necessidade de tratá-los novamente durante esse período. Tais procedimentos encontram-se estabelecidos como diretrizes operacionais em especificações técnicas para cada unidade de produção.

Especificamente para os fluidos hibernados em **sistemas de tratamento de óleo e água produzida de plataformas**, recomenda-se a medição do teor de H<sub>2</sub>S nos *vents* de todos os vasos e no fluido de hibernação. Esse monitoramento deve ser feito 15 dias após o início da hibernação com o intuito de identificar possível necessidade de reforçar a injeção de biocida, mediante recirculação interna do fluido de hibernação.

O tratamento dos sistemas de óleo e água produzida para início da hibernação consiste em: **(i) drenagem**, escoamento do máximo de fluido possível; **(ii) limpeza**, lavagem com água do mar desaerada com sequestrante de O<sub>2</sub> (bissulfito de sódio); **(iii) medição do TOG** residual na entrada do oleoduto, o qual deverá ser de no máximo de 100 ppm; e **(iv) preenchimento do sistema com o fluido de hibernação**, o qual consiste em água do mar tratada com 160 ppm de sequestrante de O<sub>2</sub> e 100 ppm de biocida THPS 75 %.

O sequestrante de O<sub>2</sub> deve ser dosado no ponto o mais próximo possível da entrada da água do mar, a fim de minimizar ao máximo a presença de O<sub>2</sub>. Já a injeção do biocida deve ser realizada em um ponto que garanta uma distância mínima de pelo menos 10 metros do ponto de injeção do sequestrante de O<sub>2</sub>, de forma a evitar a inativação do biocida pelo contato com o O<sub>2</sub> (idealmente o biocida só deve ser adicionado quando o teor de O<sub>2</sub> dissolvido for igual ou inferior a 0,1 ppm).

A injeção do biocida deve ser realizada a montante dos vasos, com o propósito de mitigar a proliferação dos microrganismos e, conseqüentemente, a geração

biogênica de H<sub>2</sub>S e a biocorrosão, visto que geralmente os vasos representam os pontos críticos de contaminação microbiana dos sistemas.

### 2.3. CORROSÃO INFLUENCIADA POR MICRORGANISMOS

A corrosão influenciada por microrganismos (MIC - *microbiologically influenced corrosion*), comumente denominada de biocorrosão, é a deterioração de superfícies metálicas causada ou acelerada pela presença de microrganismos ou pela presença de compostos provenientes do metabolismo microbiano. A biocorrosão pode ocorrer associada ou não à geração biogênica do H<sub>2</sub>S, podendo levar a falhas de equipamentos, rompimentos, vazamentos, colapso de estruturas, além de outros sérios problemas operacionais (ENNING; GARRELF, 2014; GU; MITCHELL, 2013; JAVAHERDASHTI, 2008; LIENGEN et al., 2014; LITTLE; LEE, 2007, 2015; RAJASEKAR et al., 2010; YEMASHOVA et al., 2007).

De modo geral, a maioria dos mecanismos de corrosão de superfícies metálicas é de natureza **eletroquímica**, onde ocorre uma reação anódica e uma reação catódica. A **reação anódica** consiste na **oxidação de um metal**, como por exemplo, o ferro, conforme a reação:  $\text{Fe}^0 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{e}^-$ .

A **reação catódica** pode ocorrer em condições óxicas ou anóxicas. A reação catódica em **condições óxicas** refere-se à **redução do dioxigênio (O<sub>2</sub>)**, conforme a reação:  $\text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{e}^- \rightarrow 4 \text{OH}^-$ .

Enquanto a reação catódica em **condições anóxicas** e ácidas (nas quais os prótons são derivados da dissociação da água ou de compostos ácidos), refere-se à **redução de prótons** conforme a reação:  $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ .

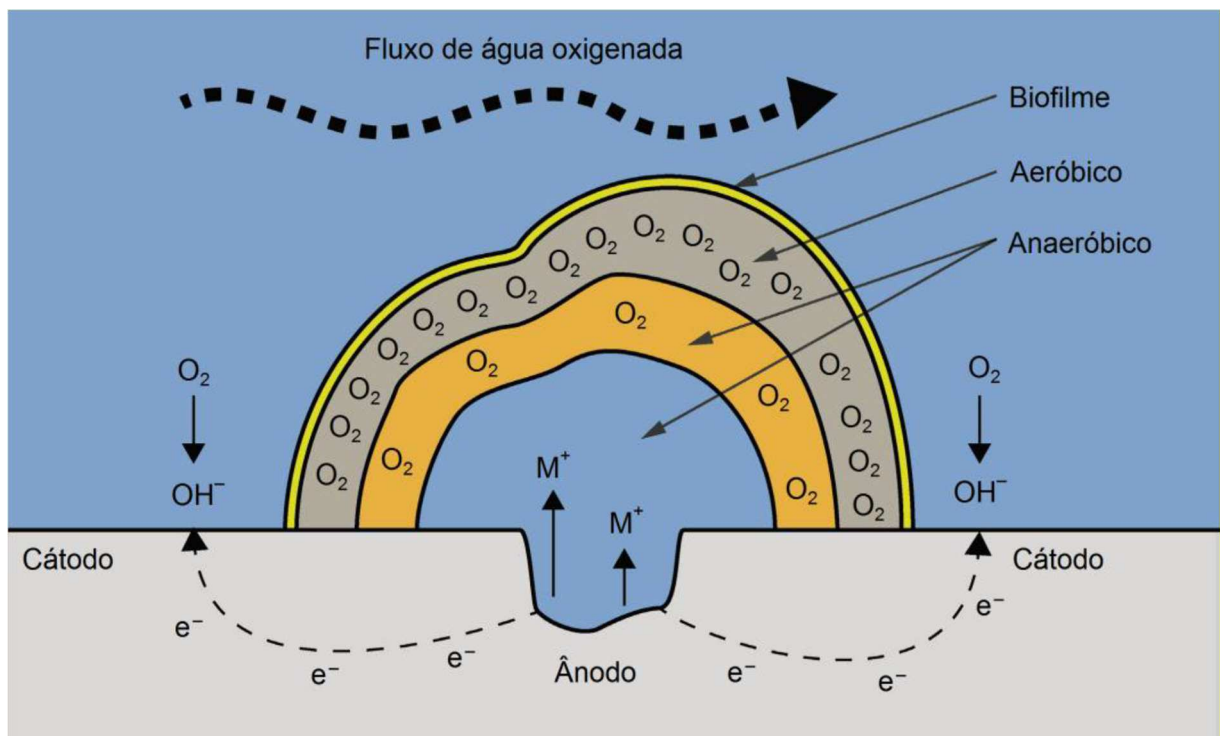
A biocorrosão é um processo complexo, que envolve diversos mecanismos e interações entre fatores ambientais, compostos químicos e agentes biológicos, sendo em geral, de difícil previsibilidade (MAXWELL, 2006).

Atualmente, são conhecidos três mecanismos principais nos quais os microrganismos desempenham importante papel na causa ou aceleração da corrosão de superfícies metálicas: (i) a **formação de células de aeração diferencial**; (ii) a **biocorrosão química** ou **CMIC (chemical MIC)**; e (iii) a **biocorrosão elétrica** ou **EMIC (electrical MIC)** (HASHEMI et al., 2018; SKOVHUS; ENNING; LEE, 2017; VIGNERON; HEAD; TSESMETZIS, 2018; WALDOW, 2018).

### 2.3.1. Formação de células de aeração diferencial

A formação de células de aeração diferencial como mecanismo de biocorrosão consiste na aceleração da corrosão abiótica causada pelo  $O_2$  devido à formação de um biofilme estratificado em relação à oxigenação, ou seja, camadas de biofilmes anóxicas se formam na superfície em contato direto com o metal, sobrepostas por camadas óxicas, com concentrações gradativamente maiores de  $O_2$ .

O  $O_2$  é uma dos compostos químicos mais corrosivos para superfícies metálicas devido ao seu elevado potencial de redução. Quando ocorre a formação de biofilmes em um fluido oxigenado, as superfícies metálicas cobertas pelos biofilmes ficam em contato com uma concentração de  $O_2$  menor do que as superfícies descobertas, ou seja, sem biofilmes e expostas às concentrações de  $O_2$  mais elevadas do fluido. Nessas condições, as superfícies mais cobertas tornam-se anódicas, sofrendo oxidação e as superfícies mais descobertas tornam-se catódicas, sofrendo redução (Figura 9) (SKOVHUS; ENNING; LEE, 2017).



**Figura 9.** Corrosão influenciada por microrganismos (MIC - *microbiologically influenced corrosion*) devido à formação de células de aeração diferencial ocasionada pela deposição de biofilmes em superfícies metálicas (SKOVHUS; ENNING; LEE, 2017).

### 2.3.2. Biocorrosão química ou CMIC (chemical MIC)

A **biocorrosão química** ou **CMIC - *chemical MIC*** refere-se ao mecanismo de biocorrosão mais estudado e, no caso de ligas baseadas em ferro, consiste na oxidação do ferro metálico ( $\text{Fe}^0$ ) a ferro (II) ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pela reação com metabólitos corrosivos produzidos pelos microrganismos. Esses metabólitos tratam-se sobretudo de ácidos, tanto orgânicos quanto inorgânicos, gerados na respiração anaeróbica e/ou na fermentação (ENNING; GARRELF, 2014; KRYACHKO; HEMMINGSEN, 2017).

Na CMIC de BRS, **(i)** os compostos orgânicos são utilizados como doadores de elétrons, enquanto o sulfato é utilizado como acceptor final de elétrons, **(ii)** os compostos orgânicos e o sulfato são reduzidos gerando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e  $\text{H}_2\text{S}$ . **(iii)** o  $\text{H}_2\text{S}$  reage com o  $\text{Fe}^0$ , resultando em depósitos de  $\text{FeS}$  e **(iv)** o  $\text{H}_2$  liberado penetra e se acumula nas microfissuras do metal provocando a fragilização por  $\text{H}_2$  (ENNING; GARRELF, 2014).

Os ácidos orgânicos mais relevantes nos processos de MIC são os de cadeia curta, tais como formato (C1), acetato (C2) e lactato (C3), produzidos pelos microrganismos fermentadores e acetogênicos, também conhecidos como bactérias produtoras de ácidos (BPA). Já os ácidos inorgânicos mais relevantes são o  $\text{H}_2\text{S}$  produzido na respiração anaeróbica dos microrganismos sulfetogênicos, como as BRS, e o ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) ou o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) gerados pela dissociação do  $\text{CO}_2$  na água. O  $\text{CO}_2$  por sua vez pode ser produzido pela oxidação de compostos orgânicos por diversos tipos de microrganismos organotróficos (WALDOW, 2018).

### 2.3.3. Biocorrosão elétrica ou EMIC (electrical MIC)

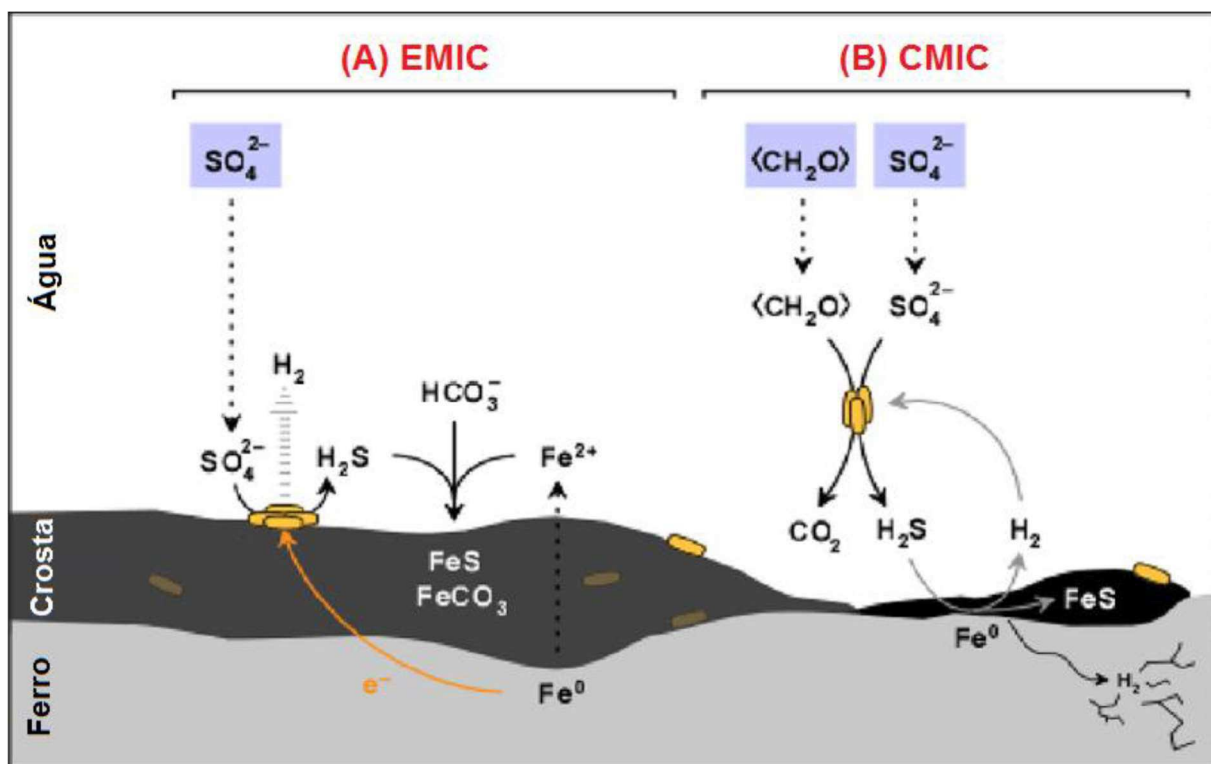
A **biocorrosão elétrica** ou **EMIC - *electrical MIC***, refere-se ao mecanismo de biocorrosão mais recentemente caracterizado e foi descrito por ENNING et al. (2012). A EMIC consiste na utilização do  $\text{Fe}^0$  como doador de elétrons na respiração anaeróbica de microrganismos litotróficos (ENNING et al., 2012; ENNING; GARRELF, 2014; KATO, 2016; KRYACHKO; HEMMINGSEN, 2017; SHARMA et al., 2018).

Na EMIC das BRS, **(i)** os elétrons ( $e^-$ ) são extraídos diretamente do  $\text{Fe}^0$  gerando  $\text{Fe}^{2+}$ , **(ii)** o sulfato é utilizado como acceptor final de elétrons gerando o  $\text{H}_2\text{S}$  e **(iii)** o  $\text{Fe}^{2+}$  reage com o  $\text{H}_2\text{S}$  e com o bicarbonato presente na água, formando depósitos

FeS e FeCO<sub>3</sub>, respectivamente. O excesso de elétrons captados pode ser liberado na forma de H<sub>2</sub>, ao reagir com H<sup>+</sup> via hidrogenases (ENNING; GARRELFs, 2014).

Os mecanismos pelos quais os microrganismos realizam a extração de elétrons das superfícies metálicas ainda é um amplo campo de investigação e caracterização. Contudo, discute-se que a captação dos elétrons pode ser realizada tanto de maneira direta, pelo contato com a superfície metálica, através de enzimas do tipo citocromo multi-heme ligadas à membrana celular ou através de nanofios (*nanowires*), quanto de maneira indireta, através da utilização de compostos redox solúveis, que atuam como carreadores de elétrons no meio extracelular (KATO, 2016; MARTINEZ; ALVAREZ, 2018).

A **Figura 10**, apresenta uma representação esquemática dos processos de EMIC e CMIC sobre uma superfície metálica (ENNING; GARRELFs, 2014), sendo que, devido à enorme diversidade taxonômica e metabólica dos microrganismos presentes nos biofilmes reais, em geral, ambos os processos ocorrem simultaneamente num ambiente industrial.



**Figura 10.** Corrosão influenciada por microrganismos (MIC - *microbiologically influenced corrosion*) devido à ação de microrganismos sulfetogênicos. **(A)** Na biocorrosão elétrica (EMIC) os elétrons ( $e^-$ ) são extraídos diretamente do ferro metálico ( $\text{Fe}^0$ ) gerando ferro(II) ( $\text{Fe}^{2+}$ ); o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) é utilizado como aceptor final de elétrons gerando sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ); o  $\text{Fe}^{2+}$  reage com o  $\text{H}_2\text{S}$  ou com o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) presente na água, formando depósitos de sulfeto de ferro ( $\text{FeS}$ ) e carbonato de ferro ( $\text{FeCO}_3$ ), respectivamente; e, o excesso de elétrons captados pode ser liberado na forma de  $\text{H}_2$  ao reagir com  $\text{H}^+$  via hidrogenases. **(B)** Na biocorrosão química (CMIC), os compostos orgânicos (representados genericamente como " $\langle\text{CH}_2\text{O}\rangle$ ") são utilizados como doadores de elétrons, enquanto o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) é utilizado como aceptor final de elétrons; os compostos orgânicos e o  $\text{SO}_4^{2-}$  são reduzidos gerando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e  $\text{H}_2\text{S}$ ; o  $\text{H}_2\text{S}$  reage com o  $\text{Fe}^0$ , resultando em depósitos de  $\text{FeS}$ ; e, o  $\text{H}_2$  liberado penetra e se acumula nas microfissuras do metal provocando a fragilização por  $\text{H}_2$  (ENNING; GARRELF, 2014).

Apesar da maior parte das pesquisas em biocorrosão estarem focadas prioritariamente em BRS, estudos indicam, cada vez mais, que vários outros grupos de microrganismos, tais como produtores de ácidos, oxidantes de ferro e metanogênicos, são tão relevantes quanto as BRS nos processos de biocorrosão (MAND et al., 2014; UCHIYAMA et al., 2010; VIGNERON et al., 2016; VIGNERON; HEAD; TSEMETZIS, 2018). Novos gêneros e/ou espécies estão sendo investigados

com o objetivo de serem propostos como biomarcadores para diagnóstico, monitoramento e classificação da biocorrosão (LAHME et al., 2021).

As BRS crescem em conjunto a esses vários outros grupos microbianos, formando biofilmes complexos, nos quais, a dinâmica das interações metabólicas entre os diferentes grupos favorece seu estabelecimento nos sistemas e desencadeiam os vários tipos diferentes de problemas operacionais já apresentados.

## 2.4. BIOFILMES

Os biofilmes representam a **principal forma de vida microbiana** (tanto para Bacteria, quanto para Archaea) encontrada no planeta. Estima-se que, a depender do habitat, de 40 a 80 % das células microbianas residem em biofilmes, portanto, são os biofilmes que, predominantemente, conduzem todos os processos biogeoquímicos da biosfera (FLEMMING; WUERTZ, 2019).

Apesar de poderem ser formados por populações de uma mesma espécie, em ambientes naturais e industriais, os biofilmes em geral, encontram-se em comunidades com diversas espécies, cujas interações são complexas e representam um nível de organização muito mais alto do que das células individuais (FLEMMING et al., 2016; FLEMMING; WUERTZ, 2019; VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019).

Biofilmes podem ser definidos como **agregados multicelulares** de microrganismos aderidos a uma superfície, circundados ou embebidos por uma matriz sintetizada pelas próprias células. Essa matriz é formada pelo que se denomina de **substâncias poliméricas extracelulares** ou **EPS (*extracellular polymeric substances*)** (FLEMMING et al., 2016; FLEMMING, 2008; NADELL; DRESCHER; FOSTER, 2016).

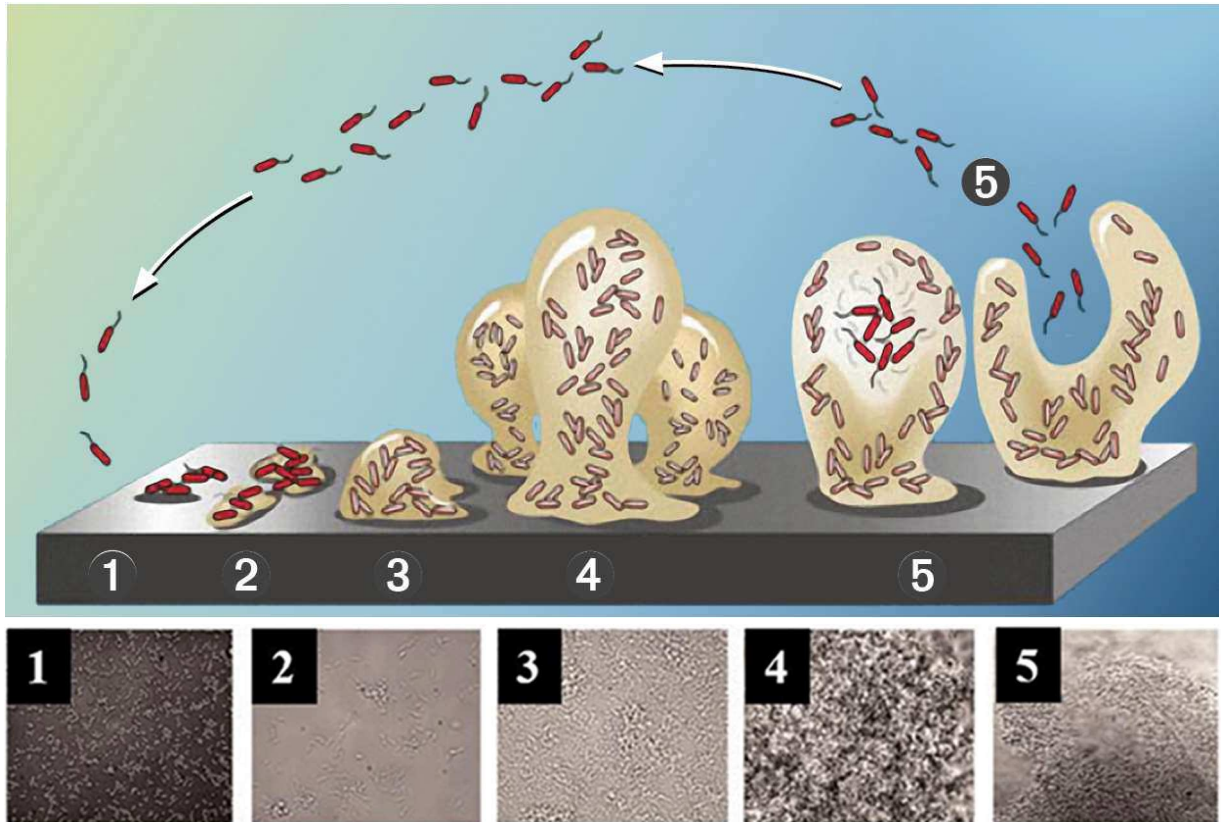
As superfícies colonizadas por biofilmes podem ser tanto superfícies sólidas (como sedimentos, rochas, estruturas e equipamentos), quanto interfaces líquido/líquido (como água/óleo) ou gás/líquido (como superfícies de ambientes aquáticos) (FLEMMING; WUERTZ, 2019).

A matriz de EPS dos biofilmes favorece o processo de adesão de mais células e é formada principalmente por polissacarídeos, mas também são encontradas proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BLENKINSOPP; COSTERTON, 1991; DAVIES, 2003; ELLWOOD et al., 1982; KARAGULER; KAHRAMAN; TUTER, 2017).

Os microrganismos que constituem os biofilmes possuem um ciclo de vida com duas fases: **(i)** uma **fase planctônica**, na qual as células se encontram livres, se dispersam pelo meio aquoso e podem alcançar novas superfícies formando novos biofilmes; e **(ii)** uma **fase séssil**, na qual as células se encontram fixas à superfície, compondo o biofilme, do qual eventualmente se desprendem para entrar na fase planctônica novamente (WALDOW, 2018).

A **Figura 11** representa esquematicamente o ciclo de vida de biofilmes o qual pode ser dividido em 5 etapas principais (KARAGULER; KAHRAMAN; TUTER, 2017; MONROE, 2007):

- (i) adesão inicial (ou fase de adesão I)**, na qual as células planctônicas encontram condições favoráveis para iniciar a fixação à superfície;
- (ii) adesão irreversível (ou fase de adesão II)**, na qual as células flageladas em geral perdem os seus flagelos e se inicia a produção de EPS, gerando uma forte adesão à superfície;
- (iii) maturação inicial (ou fase de maturação I)**, na qual as células se multiplicam rapidamente gerando um biofilme cada vez mais espesso e coeso;
- (iv) biofilme maduro (ou fase de maturação II)**, na qual o biofilme se encontra em um estágio avançado, bastante espesso e fortemente aderido, onde em geral, ocorre uma estratificação quanto à diversidade da microbiota e disponibilidade de nutrientes;
- (v) dispersão**, na qual células individuais ou camadas superficiais do biofilme começam a se desprender e podem ser dispersas no ambiente, colonizando novas superfícies e assim propagando os biofilmes.



**Figura 11.** Representação esquemática das etapas do ciclo de vida de biofilmes, seguida de imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes representativos das respectivas etapas: **(1) adesão inicial**; **(2) adesão irreversível**; **(3) maturação inicial**; **(4) biofilme maduro** e **(5) dispersão** (KARAGULER; KAHRAMAN; TUTER, 2017; VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019).

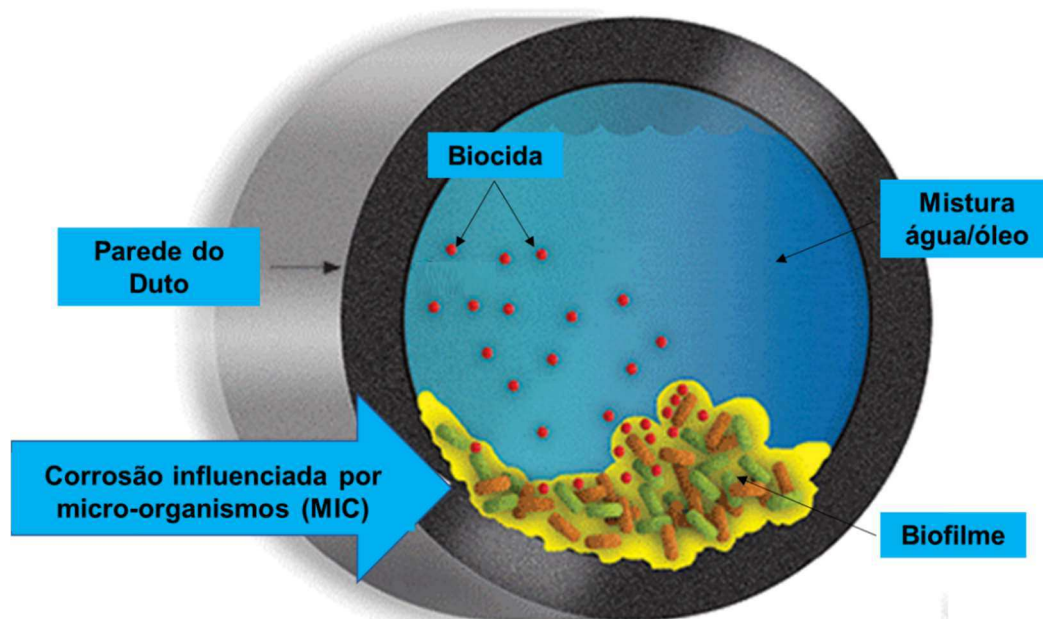
Alternativamente, muitos trabalhos descrevem o ciclo de vida de biofilmes como sendo um ciclo de três etapas: **(i) adesão**; **(ii) maturação** e **(iii) dispersão**, mas que em linhas gerais compreende as mesmas fases descritas acima, porém de um modo mais simplificado, pois unifica as duas fases da adesão e as duas fases da maturação.

Do ponto de vista operacional, apesar de muitas vezes os métodos de monitoramento microbiológico disponíveis ou viáveis serem métodos para detecção ou quantificação de células planctônicas, tais métodos buscam na verdade correlações, ainda que indiretas, com as células sésseis dos biofilmes, uma vez que são os biofilmes a condição mais relevante, em que de fato os microrganismos encontram-se de forma representativa e causadora dos problemas decorrentes das contaminações (ECKERT; CARRICK, 2014; FLEMMING; WUERTZ, 2019; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Sob a forma de biofilme, os microrganismos atuam em simbiose ou mesmo em sintrofia, incrementando suas capacidades de obtenção de nutrientes, suas

habilidades de sobrevivência, e a transferência horizontal de genes na comunidade microbiana. Nos biofilmes ocorre uma estratificação de nutrientes e da microbiota, de modo que microambientes se formam, favorecendo a resiliência da comunidade microbiana a estresses ambientais, tais como ao dessecamento, à oxigenação e até mesmo à ação de biocidas. Essa estrutura inerente aos biofilmes torna o controle dos microrganismos sésseis algo bem mais desafiador do que o controle de microrganismos planctônicos (ECKERT; CARRICK, 2014; FLEMMING, 2011; FLEMMING et al., 2016; KARAGULER; KAHRAMAN; TUTER, 2017; MADSEN et al., 2012; WALDOW, 2018).

Os biofilmes interferem no desempenho e eficácia dos produtos biocidas, tanto a curto, quanto a longo prazo. A curto prazo, os biocidas apresentam um baixo poder de penetração nos biofilmes e, portanto, apesar de na maior parte dos casos se demonstrarem eficazes contra células planctônicas, são pouco efetivos operacionalmente, uma vez que em condições reais, os microrganismos se encontram majoritariamente na forma de biofilmes. Esse baixo poder de penetração ocorre devido à matriz de EPS do biofilme, que funciona como uma barreira de proteção, limitando a ação dos biocidas apenas às camadas mais superficiais do biofilme, conforme representado esquematicamente na **Figura 12** (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; GROBE; ZHALLER; STEWART, 2002; STEWART; GRAB; DIEMER, 1998; VIGNERON; HEAD; TSESMETZIS, 2018).



**Figura 12.** Representação esquemática da corrosão influenciada por microrganismos na superfície interna de um duto, demonstrando o baixo poder de penetração de biocidas, cuja ação se limita às camadas superficiais do biofilme. Modificado a partir de AMCA (2021).

Já a longo prazo, diante da diversidade, da resiliência e da transferência horizontal de genes favorável presente no universo dos biofilmes, a ação dos biocidas também é influenciada, pois uma aplicação de forma inadequada (como por exemplo, subdosagens, interrupções prolongadas ou incompatibilidade com outros produtos químicos utilizados) favorece a seleção de biofilmes microbianos cada vez menos suscetíveis à ação desses produtos (FRAISE, 2002; RUSSELL, 2003).

Na indústria do petróleo, os microrganismos são encontrados como biofilmes tanto no interior dos reservatórios de petróleo quanto nas instalações de subsuperfície e superfície, podendo ainda se estabelecerem tanto internamente, quanto em superfícies externas de estruturas e equipamentos. Muitos desses sistemas operacionais são de difícil acesso ou mesmo de acesso inviável, tornando a amostragem de biofilmes algo logisticamente impossível (ECKERT; SKOVHUS, 2018a).

O monitoramento microbiológico em sistemas industriais pode ser feito a partir de três tipos principais de amostragens:

- (i) **amostragem de fluidos**, que é a mais comum, na qual podem ser coletados fluidos de sistemas estagnados ou em circulação, mas que permite obter

apenas as células planctônicas, as quais nem sempre representam as células sésseis dos biofilmes causadores do problema que se pretende diagnosticar;

- (ii) **amostragem de biofilmes**, os quais podem ser obtidos pela **raspagem de trechos de superfícies**, onde os biofilmes se formam (desde que exista acesso a essas superfícies) ou a partir de **corpos de prova** instalados nos sistemas, onde os biofilmes se depositam e que podem ser coletados ao longo do tempo;
- (iii) **amostragem de resíduos**, os quais podem ser obtidos, como por exemplo, de fundos de tanques ou regiões de acúmulo ou *bypass* de tubulações, bem como de resíduos carregados pelo procedimento de passagem de PIGs (*Pipeline Inspection Gauges*) no interior dos dutos.

PIGs são dispositivos que realizam uma remoção física e carregam consigo fragmentos de incrustações depositadas nas paredes internas dos dutos, as quais incluem fragmentos de biofilmes. Contudo, uma vez que a distribuição e a composição dos biofilmes ao longo de um sistema não são homogêneas, essa amostragem não permite um diagnóstico localizado da contaminação e da corrosão em trechos específicos do duto.

Sendo assim, mesmo nesses dois últimos tipos de amostragem (a de biofilmes e de resíduos), que permitem a obtenção de células sésseis, não significa que o biofilme coletado naquele ponto de amostragem seja o mais representativo dos biofilmes distribuídos por todo o sistema, nem que seja representativo dos biofilmes que de fato estão causando os efeitos operacionais nocivos sob investigação. De qualquer forma, ainda assim, a amostragem de biofilmes é mais representativa que a avaliação apenas dos microrganismos planctônicos e, por isso, deve ser priorizada sempre que possível (LARSEN et al., 2008; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019; WRANGHAM; SUMMER, 2013).

Quanto aos corpos de prova, alguns sistemas operacionais contam com dispositivos instalados especificamente para tal finalidade (nos quais os corpos de prova são comumente chamados de “biocupons”), como por exemplo aqueles instalados em caixas de inspeção de dutos enterrados (**Figura 13**). Entretanto, na ausência de biocupons, é possível utilizar os cupons destinados ao monitoramento das taxas de corrosão por perda de massa, que normalmente estão presentes em grande parte dos sistemas (DANTAS, 1988; LIMA et al., 2008; SILVA; et al., 2008a; VINHAS et al., 2008).



**Figura 13. (A)** Caixa de inspeção de uma faixa de dutos de escoamento de petróleo. **(B)** Trecho do duto desenterrado atravessando o interior da caixa de inspeção (escada de acesso ao fundo da imagem). **(C)** Sistema de monitoramento para gerenciamento da corrosão interna de dutos, o qual pode conter sonda corrosivimétrica e corpos de prova para avaliação da taxa de corrosão por perda de massa e quantificação microbiológica de biofilmes (SILVA; et al., 2008a, 2008b).

Em qualquer diagnóstico de contaminação microbiana, é extremamente importante levar em consideração as limitações em relação à amostragem microbiológica (em especial de biofilmes) que pode ser executada na prática. Por sua vez, tais amostragens e o respectivo diagnóstico decorrente delas, deve considerar dois aspectos principais: **(i) a localização**, visto que se busca uma extrapolação de um diagnóstico global a partir de amostras pontuais, especialmente em sistemas cuja extensão e inacessibilidade impossibilitam uma avaliação em separado de diferentes pontos de coleta, tais como em dutos de grandes extensões e o interior dos

reservatórios; e, **(ii)** a **escala temporal**, visto que em muitos casos é inviável a realização de determinado procedimento operacional com frequência, tornando o intervalo entre amostragens de um mesmo ponto muito longo para se obter um diagnóstico detalhado (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

## 2.5. CONTROLE OPERACIONAL DAS CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS

O controle dos problemas decorrentes de contaminações microbianas na indústria do petróleo é realizado a partir de procedimentos operacionais e pela dosagem de produtos químicos, tais como os biocidas (CAMPBELL, 2017; KEASLER et al., 2017; MORRIS; KRAAN, 2017; XU; LI; GU, 2012; XUE; VOORDOUW, 2015), que atuam diretamente na causa do problema (os microrganismos) e os inibidores de corrosão (FINŠGAR; JACKSON, 2014; GREGG; RAMACHANDRAN, 2004; LI; WANG; ZHANG, 2019; RAHUMA, 2014) e sequestrantes de H<sub>2</sub>S (LEHRER; et al., 2015; NASR-EL-DIN; KELKAR; SAMUEL, 2007; RANA et al., 2017), que atuam nas consequências decorrentes da contaminação microbiana.

Os procedimentos operacionais em geral incluem processos físicos ou mecânicos, como por exemplo:

- (i)** o aumento da velocidade de escoamento, que dificulta a adesão dos microrganismos à superfície metálica;
- (ii)** a troca de inventário, que minimiza o acúmulo dos produtos microbianos corrosivos (como o H<sub>2</sub>S) em fluidos com alto tempo de residência ou estagnados;
- (iii)** a separação água/óleo no processamento primário e a frequente remoção do residual de água misturada ao óleo ao longo das unidades de processo (como em tanques, vasos e pontos de estagnação de tubulações), o que minimiza a contaminação microbiana;
- (iv)** a passagem de instrumentos de monitoramento e limpeza, conhecidos como PIGs (**Figura 14A**), que removem os depósitos de corrosão e biofilmes aderidos às paredes internas de dutos (**Figura 14B**);
- (v)** a limpeza interna de tanques por jateamento (**Figura 15**), que além de remover os depósitos e biofilmes das paredes internas, também podem remover grandes quantidades de borra (resíduos de corrosão misturados com petróleo) acumuladas no fundo de tanques;

(vi) a remoção do sulfato da água do mar injetada em reservatórios, através de utilização de membranas de dessulfatação.



**Figura 14.** (A) Um PIG (*Pipeline Inspection Gauge*) sendo introduzido em um lançador de PIG para início da passagem por um duto (NORD STREAM, 2021). (B) Um PIG sendo retirado de um duto após sua passagem, trazendo consigo os resíduos removidos das paredes internas do duto (PIPING WORLD, 2019).



**Figura 15.** (A) Equipe entrando em um tanque de armazenamento de petróleo para realização da limpeza. (B) Limpeza interna de um tanque por jateamento (CHRYSALIDIS; KYZAS, 2020).

Contudo, na maior parte dos casos estes processos são operacionalmente inviáveis, pois possuem limitações técnicas para sua execução, ou são difíceis de serem realizados com uma frequência suficiente para garantir um controle adequado e duradouro das contaminações microbianas, além de envolverem custos significativos de mobilização e operação.

O processo de dessulfatação foi desenvolvido para o controle de incrustações químicas, uma vez que, conforme citado anteriormente, o sulfato presente na água do mar injetada em contato com a água de formação do reservatório, geralmente rica em

bário ( $Ba^{2+}$ ) e estrôncio ( $Sr^{2+}$ ), resulta em incrustações de sulfato de bário ( $BaSO_4$ ) e sulfato de estrôncio ( $SrSO_4$ ) (PEDENAUD; HURTEVENT; BARAKA-LOKMANE, 2012). Contudo, a dessulfatação acarreta um benefício colateral ao reduzir a disponibilidade de sulfato para as BRS presentes no interior dos reservatórios, mitigando a ocorrência da acidulação biogênica (DAVIS; MCELHINEY, 2002; MCELHINEY; DAVIS, 2002; RIZK et al., 1998; VANCE; THRASHER, 2014).

Entretanto, as plataformas de campos maduros (aquelas que em geral iniciaram sua produção há mais de 20 anos) não possuem a etapa de dessulfatação e plataformas mais recentes, apesar de possuírem URS, enfrentam problemas frequentes de incrustações e *biofouling* nas membranas, impactando a injetividade e conseqüentemente a produção. Portanto, em ambos os casos, é preciso conviver e lidar de outras formas com os problemas do  $H_2S$  gerado, quer seja constantemente, quer seja ocasionalmente (BADER, 2007; BALDONI-ANDREY et al., 2015; RIZK et al., 1998).

Sendo assim, a dosagem de produtos químicos é um procedimento amplamente empregado para o controle dos problemas relacionados às contaminações microbianas, sendo os biocidas a única classe de produtos químicos capaz de atuar diretamente na causa do problema: os microrganismos.

## 2.6. BIOCIDAS NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO

O termo biocida é utilizado de forma genérica para se referir a agentes químicos utilizados para matar ou inibir o desenvolvimento de organismos considerados nocivos. Quando utilizados de maneira direcionada para combater determinados grupos de organismos, os biocidas podem ser denominados de forma específica, como por exemplo, algicidas (algas), esporicidas (esporos), fungicidas (fungos), herbicidas (plantas), inseticidas (insetos), moluscicidas (moluscos) e, por fim, microbiocidas ou antimicrobianos (microrganismos) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Biocidas direcionados ao combate de bactérias também costumam ser chamados de bactericidas ou antibacterianos, esses dois termos são utilizados de modo abrangente considerando todos os procariotos, ou seja, incluindo além das bactérias, também as arqueias. Segundo WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019, não se encontra uma terminologia específica para biocidas contra arqueias (tais como

arqueicida ou antiarqueiano), muito provavelmente devido tanto à escassez de arqueias causadoras de doenças em humanos e animais (SHIFFMAN; CHARALAMBOUS, 2012), quanto devido à classificação tardia das arqueias como um domínio da vida separado das bactérias (WOESE; FOX, 1977).

Contudo, é importante ressaltar que as arqueias desempenham papel relevante nos problemas decorrentes de contaminações microbianas no âmbito da indústria do petróleo. Portanto, os biocidas utilizados nos diferentes sistemas operacionais de produção, escoamento e armazenamento de petróleo são direcionados prioritariamente ao combate de bactérias e arqueias, e todas as terminologias (biocidas, microbiocidas, antimicrobianos, bactericidas ou antibacterianos) costumam ser utilizados como sinônimos (WALDOW, 2018; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Em relação a estudos com biocidas, principalmente em estudos que visam avaliar ou desenvolver produtos para uma aplicação industrial, alguns conceitos, distinções e características dos biocidas são relevantes:

### **2.6.1. Princípio ativo biocida versus produto biocida**

Enquanto princípio ativo biocida trata do composto químico que efetivamente possui a atividade antimicrobiana; produto biocida refere-se à formulação completa do produto, o qual pode conter um ou mais princípios ativos biocidas em conjunto a outros compostos, que são adicionados para atender a outros requisitos da formulação, tais como dar mais estabilidade, potencializar a ação do princípio ativo, ou conferir outras propriedades de interesse. Alguns produtos considerados multifuncionais, também chamados de produtos “combo”, podem conter compostos adicionais que podem exercer outras funções além da ação antimicrobiana, tais como inibidores de corrosão, surfactantes ou sequestrantes de H<sub>2</sub>S (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Operacionalmente, quando nos referimos à dosagem do biocida na indústria, estamos nos referindo à dosagem do produto biocida em si e não do princípio ativo. Essa consideração é muito importante, pois diferentes fabricantes, possuem diferentes formulações, que por sua vez podem apresentar percentuais muito variáveis de um mesmo princípio ativo biocida.

Todos os cálculos para a dosagem do biocida precisam considerar o dimensionamento do local de aplicação, bem como dos tanques e bombas dosadoras

desse biocida. Estes cálculos precisam ser feitos com base no volume total do produto biocida e seriam muito diferentes se fosse considerado apenas o percentual do princípio ativo, ao ponto de que uma eventual substituição de fornecedor poderia tornar inviável a aplicação. Além disso, os cálculos e custos de logística para transporte e armazenamento de qualquer produto também são baseados no volume total do produto e se tornariam imprevisíveis ou mesmo inviáveis, se fossem baseados no percentual do princípio ativo.

### **2.6.2. Biocidas versus antibióticos**

Enquanto os biocidas se caracterizam por possuírem um amplo espectro de ação, tanto no sentido de atacarem múltiplos componentes celulares, quanto de serem tóxicos para uma diversidade mais ampla de organismos; os antibióticos possuem um espectro de ação bem mais estreito quanto a estes mesmos aspectos (MCDONNELL, 2017; RUSSELL, 2003).

De modo geral, os mecanismos de ação dos antibióticos costumam ser mais bem elucidados do que os mecanismos de ação dos biocidas; a evolução de linhagens resistentes é mais comum para antibióticos do que para biocidas; e, os antibióticos tendem a ser menos tóxicos para os seres humanos e para outras espécies não alvo do que os biocidas (MANIVANNAN, 2008).

Sendo assim, os biocidas são geralmente utilizados como desinfetantes (para aplicação sobre superfícies e objetos), como antissépticos (para aplicação sobre um tecido vivo, como a pele ou mucosas) ou como preservantes (quando incorporados a alimentos, cosméticos, medicamentos, tintas ou tecidos). Já os antibióticos, são administrados como medicamentos para o tratamento de infecções, em geral, restritos à medicina e à veterinária (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

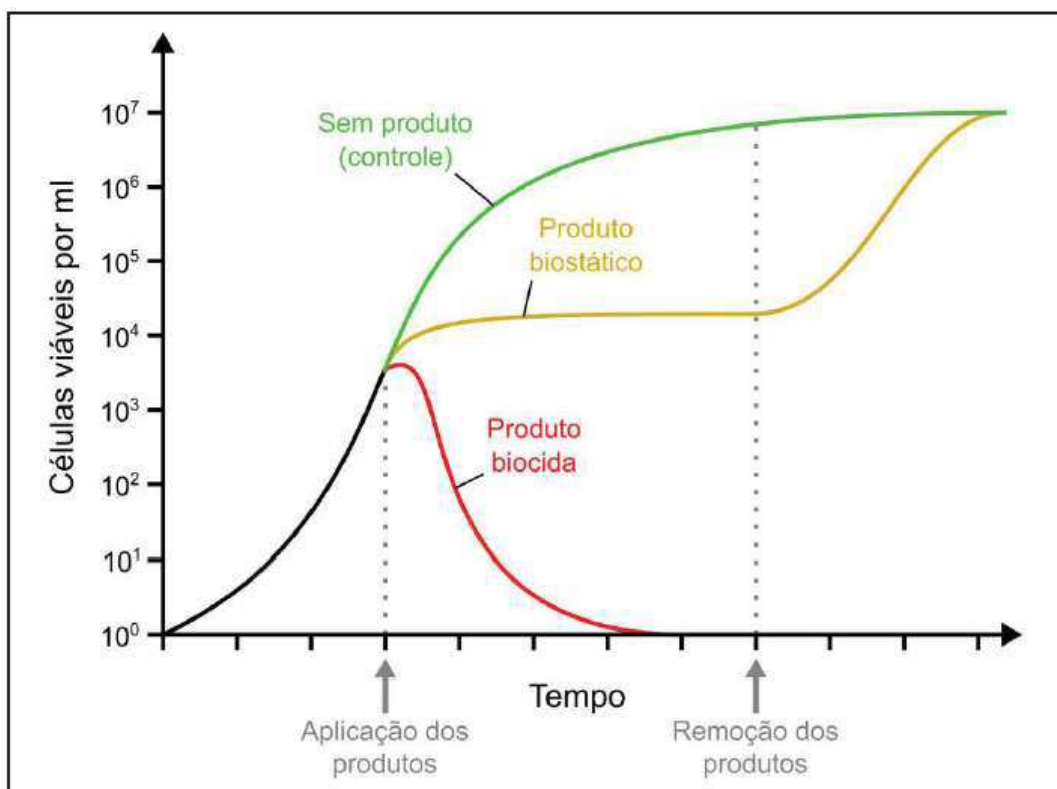
Para aplicações na indústria do petróleo, onde o foco abrange uma diversidade enorme de microrganismos e que ainda são pouco conhecidos, produtos biocidas de amplo espectro, porém estáveis e compatíveis às condições operacionais e aos demais produtos utilizados, são de grande interesse. Por isso, muitas empresas de petróleo mantêm parcerias constantes com as empresas fabricantes e fornecedoras de produtos biocidas, visando a avaliação, desenvolvimento e validação de novas formulações que atendam condições operacionais específicas e muitas vezes particulares da própria empresa ou de determinada unidade operacional. Contudo,

nos últimos anos, nenhum novo princípio ativo antimicrobiano e muito poucos produtos biocidas novos foram disponibilizados para a indústria do petróleo.

### **2.6.3. Biocidas versus biostáticos**

Um composto biocida provoca a morte de uma população ou comunidade microbiana, enquanto um composto biostático inibe ou reduz a atividade metabólica das células e, conseqüentemente, a proliferação daquela população ou comunidade. Sendo assim, quando o composto biostático é removido, consumido ou degradado, as células presentes retomam a atividade metabólica e voltam a se multiplicar.

Assim como as demais terminologias citadas anteriormente, o termo bacteriostático pode ser utilizado para designar compostos com ação biostática tanto sobre bactérias, quanto arqueias e um mesmo composto antimicrobiano pode apresentar ambas as atividades, biocida e biostática, a depender da concentração dosada, ou seja, pode apresentar uma ação biocida em altas concentrações e uma ação biostática em concentrações menores. A **Figura 16** ilustra esquematicamente a ação biocida em comparação à ação biostática em uma curva de crescimento microbiano (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).



**Figura 16.** Comparação do efeito de produtos biocidas e produtos biostáticos. No tratamento controle, o microrganismo exibe uma proliferação logarítmica. A aplicação de um produto biostático (ou de um produto biocida em concentrações muito baixas) inibe a proliferação, mas não reduz o número de células viáveis. A aplicação de um produto biocida reduz o número de células viáveis (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

#### 2.6.4. Biocidas oxidantes versus biocidas não-oxidantes

Os biocidas são normalmente classificados em duas categorias, os biocidas oxidantes e os biocidas não-oxidantes em função da propriedade química do seu modo de ação (WIENCEK; CHAPMAN, 1999).

São classificados como **biocidas oxidantes**, aqueles que atuam ocasionando a oxidação das moléculas orgânicas, enquanto os **biocidas não-oxidantes** atuam por diversos outros mecanismos, tais como a formação de ligações covalentes com grupos químicos nucleofílicos presentes nas biomoléculas, ou a desestabilização da membrana plasmática (MANIVANNAN, 2008).

Em geral, ocorre uma relação inversa entre a **velocidade de ação** e o **tempo de proteção** dos biocidas oxidantes em comparação aos biocidas não-oxidantes, de modo que os biocidas oxidantes apresentam velocidade de ação rápida e tempo de proteção curto, enquanto os biocidas não-oxidantes apresentam tais características

de modo inverso. A **Tabela 5** apresenta as principais diferenças quanto a características de ação de biocidas oxidantes em comparação a biocidas não-oxidantes (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

**Tabela 5.** Principais diferenças entre biocidas oxidantes e não-oxidantes (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

<b>Característica</b>	<b>Biocidas oxidantes</b>	<b>Biocidas não-oxidantes</b>
Velocidade de ação	Rápida	Lenta
Meia-Vida (persistência no ambiente)	Curta	Longa
Corrosividade	Maior	Menor
Tempo de contato para desinfecção	Menor	Maior
Eficiência contra biofilmes	Menor	Maior

A **Figura 17** apresenta os principais biocidas utilizados na indústria e a sua posição relativa em um gradiente quanto à sua velocidade de ação e tempo de proteção (DOW MICROBIAL CONTROL, 2013), representando a relação inversa que ocorre entre os biocidas oxidantes e não-oxidantes. Os biocidas oxidantes estão representados em letras vermelhas e os biocidas não-oxidantes (cujos subgrupos serão apresentados adiante) estão representados por letras roxas (biocidas líticos), rosas (biocidas eletrofílicos) e azuis (biocidas preservantes) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).



### 2.6.5. Biocidas oxidantes

Os biocidas oxidantes, também denominados de eletrófilos extremos (retiram elétrons das moléculas orgânicas), são compostos químicos altamente reativos (WIENCEK; CHAPMAN, 1999) e podem ser divididos em dois subgrupos: **(i) os compostos halogenados**, que atacam moléculas orgânicas por meio da halogenação e contêm cloro (Cl), bromo (Br) ou iodo (I); e **(ii) os compostos oxigenados**, que atacam moléculas orgânicas tanto pela oxidação direta quanto pela oxidação indireta relacionada à geração de radicais livres, como o ozônio (O<sub>3</sub>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o ácido peracético (CH<sub>3</sub>-COO-OH), o ácido perfórmico (HCO<sub>3</sub>H) e o dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Os biocidas oxidantes são considerados extremamente eficientes, pois, devido à sua inespecificidade e elevada reatividade, são capazes de oxidar uma quantidade muito grande de matéria orgânica (incluindo as células microbianas) em tempos de contato muito curtos (minutos a horas) (DOW MICROBIAL CONTROL, 2013). Contudo, é exatamente essa característica, um dos motivos que restringe sua aplicação na indústria do petróleo.

Em águas e efluentes com altas concentrações de teor de carbono orgânico total (TOC – *total organic carbon*), o biocida oxidante é consumido rapidamente por essa matéria orgânica e, portanto, terá ação limitada no controle das contaminações microbianas específicas e associadas aos problemas de biocorrosão. Isso porque, conforme explicado anteriormente, a contaminação relevante nesses cenários é aquela que se encontra na forma de biofilmes, nos quais, o biocida oxidante irá reagir em primeira instância com as moléculas orgânicas das camadas superficiais dos biofilmes, não conseguindo penetrar nas camadas mais profundas dos mesmos (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; GROBE; ZHALLER; STEWART, 2002; STEWART; GRAB; DIEMER, 1998; VIGNERON; HEAD; TSESMETZIS, 2018).

Além disso, em sistemas de tratamento de água de produção ou dutos e tanques com petróleo, não é adequada a utilização de biocidas oxidantes, uma vez que eles reagem como os hidrocarbonetos do petróleo, degradando-o, além de serem altamente corrosivos para as superfícies metálicas (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Os biocidas oxidantes, também podem inativar outros produtos químicos utilizados nos processos de produção do petróleo podendo gerar grandes quantidades

de subprodutos indesejáveis (tais como os organoclorados) de potencial impacto à saúde e ao meio ambiente (BADAMSHIN et al., 2021).

Conforme citado anteriormente, devido à alta reatividade, os biocidas oxidantes apresentam uma meia-vida curta, ou seja, persistem por pouco tempo no ambiente (DOW MICROBIAL CONTROL, 2013). Essa característica, pode ser considerada uma vantagem sob o ponto de vista ambiental, por não se tornarem potenciais poluentes, contudo, pode ser considerada uma desvantagem pois são biocidas que agem pontualmente, não alcançando pontos distantes do local de aplicação e nem prevenindo o reaparecimento das contaminações a longo prazo (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Nesse contexto, segundo MORRIS e KRAAN (2017), conclui-se que os biocidas oxidantes são efetivos quando utilizados para o pré-tratamento de águas, porém, para a indústria do petróleo são pouco efetivos para o controle de *souring* em reservatórios, onde para tal fim, devem ser combinados com biocidas não-oxidantes que tenham maior potencial em persistir no sistema e atingir regiões mais distantes. Sendo assim, na indústria do petróleo, os biocidas oxidantes são utilizados eficientemente apenas nos sistemas de tratamento de água de processo, quer seja a água do mar para plataformas marítimas, quer seja a água salobra em unidades de produção *onshore* ou a água doce de abastecimento de refinarias.

#### 2.6.6. Biocidas não-oxidantes

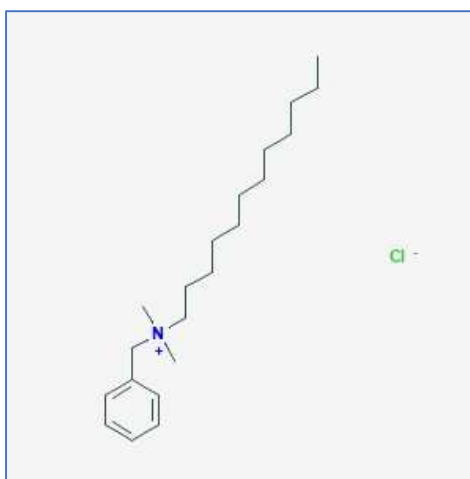
Os biocidas não-oxidantes são menos reativos, por isso tendem a permanecer por mais tempo no sistema após sua dosagem. Os mais utilizados na indústria do petróleo podem ser divididos em três subgrupos: **(i) os biocidas líticos**, **(ii) os biocidas eletrofilicos**; e **(iii) os biocidas preservantes** (KEASLER et al., 2017; WIENCEK; CHAPMAN, 1999).

Os **biocidas líticos** são moléculas surfactantes (possuem uma porção polar/hidrofílica e outra apolar/lipofílica), portanto, atuam na membrana celular dos microrganismos de modo a desestabilizar a bicamada fosfolipídica, podendo levar à morte devido ao descontrole osmótico (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Contudo, alguns trabalhos também já identificaram alvos intracelulares dos biocidas líticos, sendo assim, eles podem atuar também por outros mecanismos de ação (WESSELS; INGMER, 2013).

Na indústria do petróleo, os biocidas líticos mais utilizados são **compostos de amônio quaternário** ou **compostos de fosfônio quaternário**. Eles são normalmente conhecidos como **aminas quaternárias, QACs** (*quaternary ammonium compounds*) ou simplesmente **Quats** (KAHRILAS et al., 2015; KRAMER; O'BRIEN; STRBA, 2008).

Os Quats são considerados biocidas baratos, sendo geralmente aplicados em baixas concentrações e de modo contínuo, em conjunto a um biocida eletrofilico, que é aplicado em bateladas e em concentrações mais altas (o mais comum é a aplicação em conjunto com o THPS ou o glutaraldeído, os quais serão apresentados à frente). O objetivo dessa aplicação conjunta é manter um equilíbrio entre biocidas de ação mais rápida e biocidas mais persistentes a fim de se obter um controle mais consistente dos níveis de contaminação (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Em geral, essa aplicação conjunta é o tratamento adotado em sistemas de água de injeção em reservatórios de petróleo e o Quat mais utilizado é o cloreto de alquildimetilbenilamônio ou ADBAC (*alkyldimethylbenzylammonium chloride*), que é mais conhecido como **BAC** (*benzalkonium chloride – cloreto de benzalcônio*) e consiste num conjunto de compostos de amônio quaternário com um grupo benzeno, dois grupos metila e um grupo alquila com cadeia de tamanho variável (**Figura 18**) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).



**Figura 18.** Estrutura molecular do biocida BAC - *benzalkonium chloride* – cloreto de benzalcônio (PUBCHEM, 2021a).

Os Quats são considerados eficientes e também formam filmes sobre superfícies suscetíveis, podendo funcionar como inibidores de corrosão (ASKARI et al., 2021; WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Contudo, existem alguns problemas

relacionados ao seu uso, como a formação de espuma e a geração de emulsões, que podem impactar os processos de desaeração e a separação água/óleo (KAHRILAS et al., 2015; MCILWAINE, 2004). Além disso, eles podem precipitar em águas com altos teores de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), prejudicando a sua ação biocida. E, por terem carga positiva, são incompatíveis com alguns produtos químicos que possuem carga negativa, como alguns inibidores de incrustação e de corrosão (KELLAND, 2014).

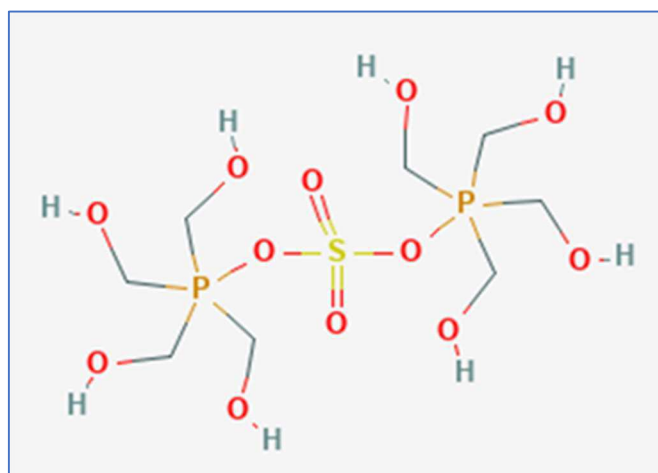
Sendo assim, os Quats não são utilizados como biocidas para o controle de contaminações do sistema de processamento primário do petróleo, pois adsorvem às interfaces água/óleo e às superfícies sólido/água, reduzindo a quantidade do princípio ativo disponível para interagir com os microrganismos (KAHRILAS et al., 2015; KELLAND, 2014). Muitas plataformas também já não utilizam mais os Quats no tratamento da água de injeção, tanto devido às questões de incompatibilidade, quanto por limitações operacionais e questões de custos relacionadas à dosagem de mais de um produto biocida no mesmo sistema.

Os **biocidas eletrofílicos** atuam por meio da formação de ligações covalentes com grupos funcionais nucleofílicos das biomoléculas (MCDONNELL, 2017; WIENCEK; CHAPMAN, 1999). Na indústria de petróleo, os biocidas eletrofílicos mais utilizados são: **compostos de fosfônio quaternário** (THPS), **aldeídos** (glutaraldeído, formaldeído e acroleína), **compostos orgânicos contendo enxofre e nitrogênio** (MBT e isotiazolonas) e **compostos orgânicos bromados** (DBNPA e Bronopol) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

No Brasil, os principais biocidas eletrofílicos utilizados na indústria do petróleo são: **(i) o THPS**, que é o biocida amplamente utilizado, sobretudo em unidades *offshore* e na maior parte dos processos, como o tratamento da água de injeção, o tratamento da água produzida, o tratamento de fluidos em tanques e dutos e o tratamento de fluidos hidrostáticos e de hibernação; **(ii) o DBNPA**, que junto com as isotiazolonas, são os únicos biocidas certificados quanto à sua compatibilidade com membranas de dessulfatação e de osmose reversa (BERTHEAS et al., 2009; KEASLER et al., 2017); e, **(iii) o glutaraldeído**, que é utilizado na formulação de fluidos de perfuração e completação e eventualmente no tratamento da água de injeção e de produção em unidades *onshore*.

O **THPS (tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate - sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio)** (Figura 19) é um biocida de amplo espectro especialmente eficaz contra as BRS (CRADDOCK, 2018; DOWNWARD; TALBOT; HAACK, 1997;

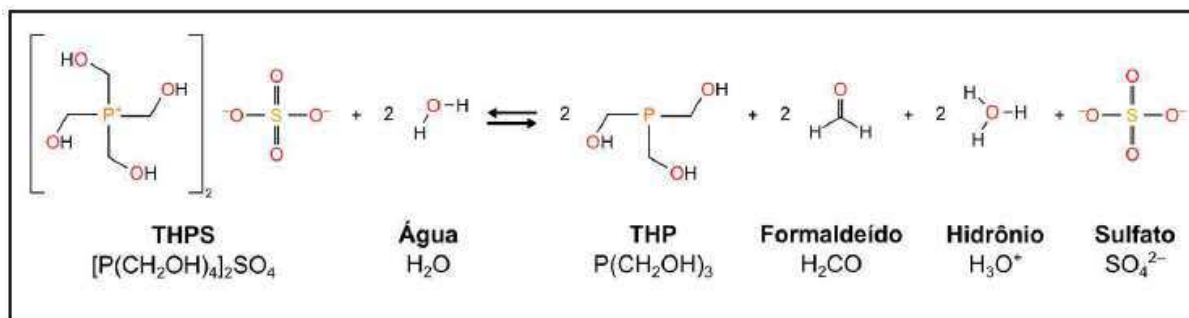
JONES et al., 2012, 2008; MCILWAINE, 2004). Desenvolvido na década de 1980, ele foi utilizado pela primeira vez em plataformas do Mar do Norte. Ele é o segundo biocida não-oxidante mais utilizado pela indústria de petróleo, atrás apenas do glutaraldeído (JONES et al., 2008). Contudo, no Brasil, ele é o biocida mais utilizado desde o final da década de 1990, quando a utilização do glutaraldeído foi restringida em plataformas *offshore* por questões de saúde ocupacional e motivação ambiental.



**Figura 19.** Estrutura molecular do biocida THPS - Sulfato de Tetrakis Hidroximetil Fosfônio (PUBCHEM, 2021b).

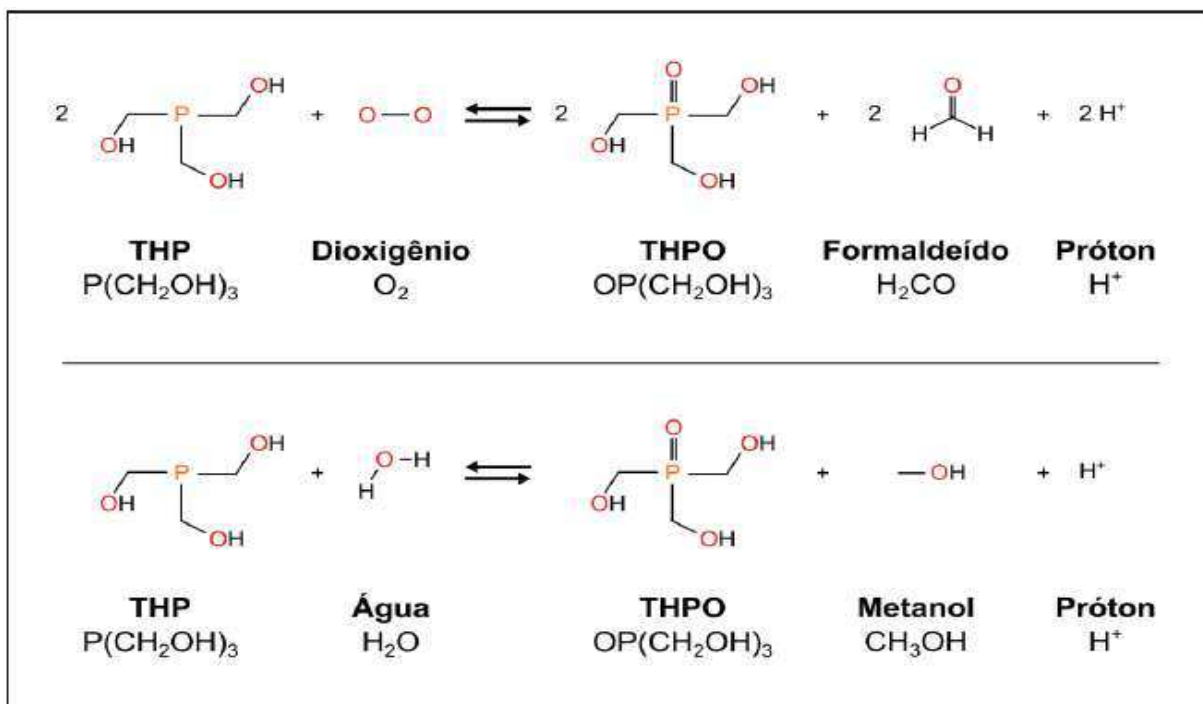
No THPS, o composto de fato responsável pela ação antimicrobiana é o THP (*tris hydroxymethyl phosphine* - tris hidroximetil fosfina). A ação biocida do THP ocorre principalmente pela reação com pontes dissulfeto (-S-S-) de proteínas e outras biomoléculas (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Além disso, o THPS possui uma vantagem adicional para os sistemas suscetíveis à corrosão, pois ele também atua como um quelante de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), dissolvendo os depósitos de  $\text{FeS}$  já existentes e minimizando a formação de novos depósitos (JONES et al., 2006).

A dissociação do THPS ocorre conforme a reação representada na Figura 20 (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Em contato com os íons hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) da água, forma o THP, liberando sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e formaldeído ( $\text{H}_2\text{CO}$ ), que é o composto que atua na dissolução dos depósitos de  $\text{FeS}$ .



**Figura 20.** Representação molecular da reação de dissociação do biocida THPS (sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio) em solução aquosa, gerando o composto THP (tris hidroximetil fosfina), o qual apresenta a atividade antimicrobiana (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

O THP é degradado por oxidação ou hidrólise abiótica gerando THPO (*tris hydroxymethyl phosphine oxide* - óxido de tetrakis hidroximetil fosfina), conforme representado na **Figura 21** (SHARMA et al., 2018). O THPO por sua vez, não possui ação antimicrobiana e por esse motivo o biocida THPS não deve ser dosado em sistemas aerados. Por outro lado, ele tende a apresentar uma menor ecotoxicidade, além de ser suscetível à fotodegradação e biodegradação, sendo considerado, portanto, um biocida ambientalmente mais seguro (ZHAO et al., 2008).



**Figura 21.** Representação molecular das reações de oxidação e hidrólise (Sharma *et al.*, 2018) de conversão do THP (tris hidroximetil fosfina) a THPO (óxido de tetrakis hidroximetil fosfônio) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

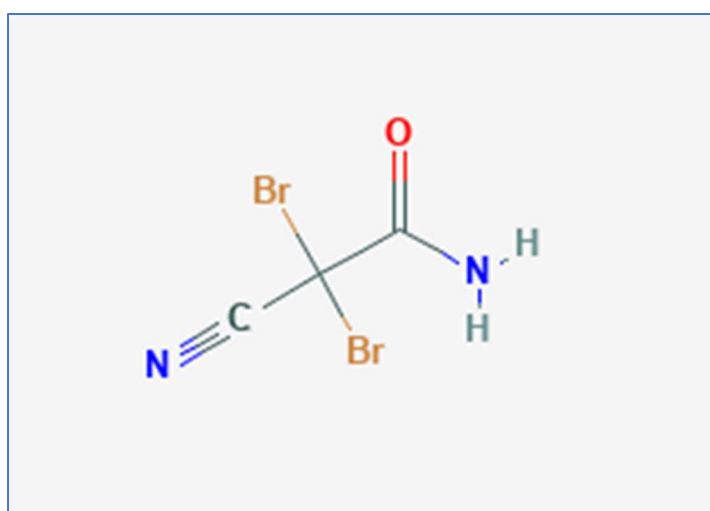
O THPS possui uma série de vantagens do ponto de vista de sua aplicação na indústria do petróleo, mas também apresenta desvantagens. Como principais vantagens podemos citar: **(i)** alta solubilidade em água, **(ii)** insolubilidade em óleo, **(iii)** estabilidade térmica até 160°C e **(iv)** não é tensoativo, ou seja, não forma espuma, não adsorve às rochas dos reservatórios e não interfere nos processos de desaeração ou separação água/óleo (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Já como principais desvantagens o THPS apresenta: **(i)** incompatibilidade com sequestrantes de  $\text{O}_2$  à base de bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), inclusive gerando  $\text{O}_2$  na reação com esses sequestrantes, **(ii)** limitado poder de penetração nos biofilmes e **(iii)** liberação de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) na sua dissociação, o qual pode reagir com cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e bário ( $\text{Ba}^{2+}$ ) formando precipitados de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) e sulfato de bário ( $\text{BaSO}_4$ ), podendo gerar incrustações e tamponamentos.

Além dos potenciais problemas associados a incrustações, o sulfato liberado na dissociação do THPS, pode ser utilizado pelas BRS, estimulando seu crescimento e aumentando a geração biogênica de  $\text{H}_2\text{S}$  e a CIM. A contribuição do THPS para a concentração disponível de sulfato é considerada desprezível em água do mar onde a concentração de sulfato é de aproximadamente 2.700 mg/L (28 mM), mas torna-se

considerável em reservatórios de petróleo e respectivos sistemas de produção que possuem baixas concentrações de sulfato (abaixo de 1 mM), onde, um tratamento frequente com uma dosagem de 200 ppm de THPS, contribui com cerca de 0,5 mM de sulfato (SHARMA et al., 2018).

O **DBNPA (2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide - 2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamida)** é um composto orgânico bromado (**Figura 22**) de ação rápida (com velocidade de ação próxima à dos biocidas oxidantes) e razoavelmente efetivo em baixas concentrações (KEASLER et al., 2017; MCILWAINE, 2004; PAULUS, 2004).



**Figura 22.** Estrutura molecular do biocida DBNPA - 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide - 2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamida (PUBCHEM, 2021c).

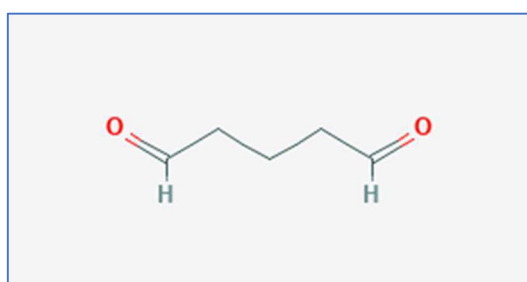
O modo de ação do DBNPA consiste na reação do bromo com grupos sulfidríla (-SH) das biomoléculas. Ele também pode reagir com as aminas primárias (-NH<sub>2</sub>). Contudo, na faixa de pH em que normalmente é aplicado, as aminas se encontram protonadas (-NH<sup>3+</sup>), condição na qual essa reação não é favorecida. A faixa de pH ótima de aplicação do DBNPA é entre 4,0 e 8,0, pois em pH alcalino ele é rapidamente hidrolisado (MCILWAINE, 2004).

Quanto à persistência no ambiente, o DBNPA apresenta uma meia-vida bem curta e se degrada em amônio (NH<sup>4+</sup>), íons brometo (Br<sup>-</sup>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (BALLANTYNE; JORDAN, 2004; KAHNILAS et al., 2015), característica que confere a ele bons resultados quanto ao grau de ecotoxicidade. Contudo, para contornar sua baixa solubilidade em água, solventes costumam ser adicionados nas formulações (KELLAND, 2014; NALEPA; WILLIAMS, 2010).

De modo abrangente, o DBNPA pode ser utilizado para o tratamento de águas de resfriamento, fluidos de perfuração, água de injeção e água para testes hidrostáticos (MCILWAINE, 2004; MORRIS; KRAAN, 2017). Mas, sua aplicação principal é nas membranas de dessulfatação e de osmose reversa, devido à compatibilidade certificada pelos fornecedores de membranas, conforme já citado anteriormente (BERTHEAS et al., 2009; KEASLER et al., 2017).

Quanto à compatibilidade com outros compostos químicos, apesar de ser compatível com biocidas oxidantes, o DBNPA é incompatível com altos teores de  $\text{H}_2\text{S}$  e com sequestrantes de  $\text{O}_2$  à base de bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019), o que pode ser um transtorno em unidades de dessulfatação que possuem o processo de desaeração antes do sistema de membranas. Assim, tanto o residual de bissulfito quanto o  $\text{H}_2\text{S}$  eventualmente gerado pelas contaminações microbianas nas membranas podem se tornar grandes problemas e reduzir significativamente a vida útil das membranas.

O **glutaraldeído** é um dialdeído saturado 1,5-pentanodial (*1,5-pentanedial*), conhecido popularmente por **GA** (*glutaraldehyde*) ou simplesmente **Glut** (**Figura 23**). Ele é o biocida não-oxidante tradicionalmente mais utilizado pela indústria de petróleo em todo o mundo, sendo geralmente aplicado em choque em conjunto com algum biocida lítico aplicado de modo contínuo (KEASLER et al., 2017; KELLAND, 2014; MCGINLEY et al., 2009).

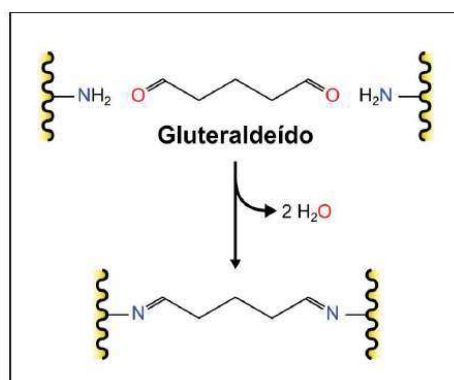


**Figura 23.** Estrutura molecular do biocida glutaraldeído, GA - glutaraldehyde ou Glut (PUBCHEM, 2021d).

O Glut tornou-se o biocida mais disseminado na indústria do petróleo devido a várias de suas características consideradas vantajosas, como: **(i)** ação rápida; **(ii)** alta solubilidade em água; **(iii)** alta tolerância à salinidade; **(iv)** tolerância ao  $\text{H}_2\text{S}$ , **(v)** não formação de espuma; **(vi)** baixa corrosividade; **(vii)** bom perfil ecotoxicológico; e, **(viii)** alta compatibilidade com a cloração e com vários outros produtos químicos

(WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Sendo assim, ele é amplamente utilizado no tratamento de água produzida, água de processo, fluidos de perfuração, completação e injeção (MORRIS; KRAAN, 2017).

Seu princípio de ação se dá pela reação de seus grupos aldeído com os grupos nucleofílicos das biomoléculas, sobretudo com as aminas primárias (-NH<sub>2</sub>). Por apresentar dois grupos aldeído, o Glut impede que biomoléculas adotem sua conformação funcional, pois consegue catalisar uma reação cruzada entre dois grupos funcionais nucleofílicos de uma mesma biomolécula ou entre duas biomoléculas diferentes (**Figura 24**) (KAWAHARA et al., 1997).

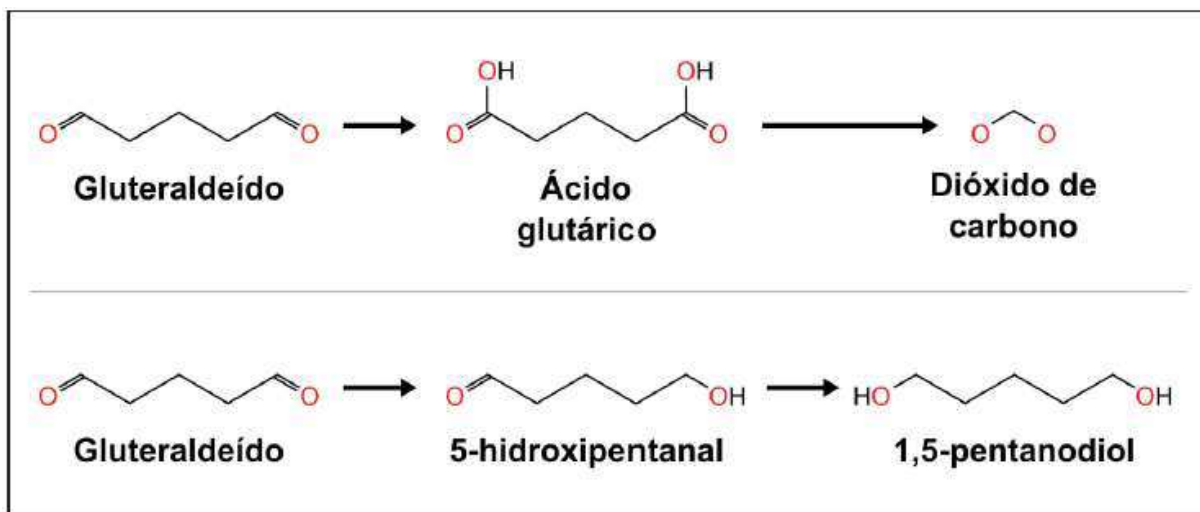


**Figura 24.** Estrutura molecular do glutaraldeído e um exemplo de reação de ligação cruzada (KAWAHARA et al., 1997) onde cada uma das duas biomoléculas possui um grupo amina primária que é atacado por um dos grupos aldeído do glutaraldeído (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

Quanto às suas desvantagens, o Glut perde eficiência em temperaturas muito elevadas e em fluidos com altos teores de aminas, amônio e sequestrantes de O<sub>2</sub> à base de bissulfito (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019). Além disso é mais estável em valores de pH ácido, porém sua velocidade de ação é maior em valores de pH básico, de modo que a faixa de pH entre 6,5 e 9,0 é na qual se obtém o melhor equilíbrio entre a estabilidade do residual e a eficiência biocida (MIGNEAULT et al., 2004).

Poucos estudos existem quanto à biodegradação do Glut no meio ambiente. Alguns estudos realizados em sistema de água fluvial indicaram as rotas principais de degradação do Glut (LEUNG, 2001a, 2001b; MCGINLEY et al., 2009). Em condições óxicas, o Glut primeiramente é convertido a ácido glutárico e depois completamente oxidado a dióxido de carbono, enquanto em condições anóxicas, o Glut é primeiramente convertido a 5-hidropentanal e depois a 1,5-pentanodiol (**Figura 25**).

Todos esses produtos da degradação do Glut são considerados de baixa ecotoxicidade e, portanto, ambientalmente menos agressivos (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).



**Figura 25.** Rotas de degradação sob condições óxicas e anóxicas do glutaraldeído no meio ambiente (WALDOW; SOUSA; OLIVEIRA, 2019).

No contexto especificamente deste estudo, serão utilizados como referência e comparação dois biocidas à base de THPS: **(i)** o THPS na concentração de 75 % de princípio ativo, que será denominado daqui em diante apenas de **biocida padrão (THPS 75 %)**; e, **(ii)** um biocida desenvolvido especificamente para o cenário de tanques de plataformas, o qual será denominado daqui em diante apenas de **biocida para tanques (THPS 40%)**.

O THPS 75 % é o biocida comercial padrão, considerado uma *commodity*, utilizado na maior parte dos cenários operacionais que aplicam biocidas à base de THPS. Além disso, é o biocida de referência de comparação utilizado na maior parte dos estudos e ensaios laboratoriais para avaliação tanto de produtos biocidas comerciais, quanto de produtos em desenvolvimento de diferentes naturezas, com propriedades antimicrobianas e potencial de aplicação na indústria do petróleo (como por exemplo, extratos vegetais, moléculas de síntese de química verde, biossurfactantes, nanopartículas metálicas, etc).

Já o biocida para tanques é um biocida comercial de diferentes fornecedores, cujas formulações foram desenvolvidas sob demanda especificamente para tanques de plataformas de petróleo. Em geral, eles apresentam um maior pH em comparação ao THPS 75 %, sendo, portanto, menos corrosivos podendo conter de 40 a 70 % de

THPS como princípio ativo principal, além de biodispersantes, cuja função segundo os fabricantes seria melhorar o efeito sobre os biofilmes e/ou outros ativos como inibidores de corrosão ou sequestrantes de H<sub>2</sub>S.

Os biocidas específicos para tanques de plataformas de petróleo foram disponibilizados há menos de dez anos e foram qualificados sobretudo devido ao seu desempenho em relação à corrosividade, ou seja, em água de produção, eles são menos corrosivos que o THPS 75 %. Contudo, quanto ao seu desempenho em relação à eficiência biocida, de modo geral eles são equivalentes ao THPS 75 %.

Sendo assim, a necessidade de desenvolvimento de produtos antimicrobianos mais adequados ao cenário de controle de contaminações microbianas associadas à geração de H<sub>2</sub>S em tanques de plataformas, continua sendo um desafio e uma grande oportunidade. Portanto, a busca por tecnologias alternativas e inovadoras é bastante relevante e, nesse contexto, algumas iniciativas biotecnológicas merecem investigações mais detalhadas, dentre elas, a **tecnologia de bacteriófagos**.

## **2.7. A TECNOLOGIA DE BACTERIÓFAGOS APLICADA À INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Assim como os microrganismos constituem a forma de vida celular mais abundante e onipresente na biosfera, os respectivos vírus que os infectam também estão presentes em abundância em todos os ambientes habitados pelos microrganismos (FENCHEL, 2011; NEE, 2004, 2005; WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Sendo assim, tal como os microrganismos estão presentes nos mais variados tipos de contaminações de sistemas operacionais ao longo da cadeia produtiva do petróleo, os vírus que os infectam também estão (PANNEKENS et al., 2019).

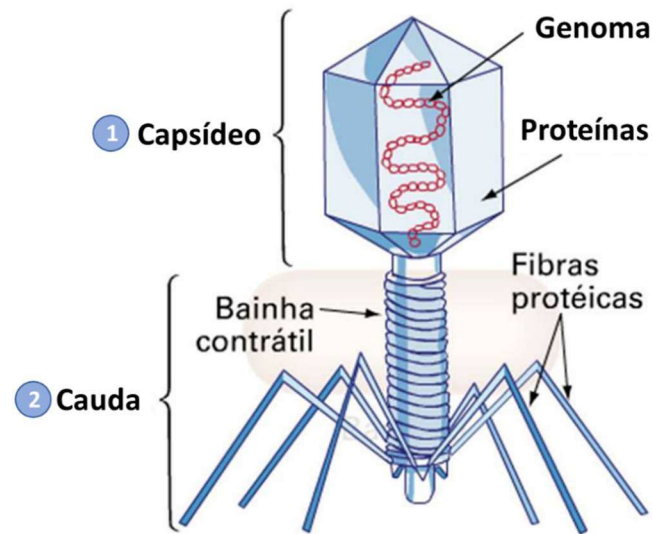
Comumente chamados de **fagos**, os **bacteriófagos** são os vírus que **infectam exclusivamente microrganismos procaríotos**, ou seja, não são capazes de infectar células eucarióticas, como as células humanas, animais ou vegetais. Os fagos são considerados os organismos mais abundantes do planeta. Estima-se que o número de partículas virais na biosfera seja de aproximadamente 10<sup>31</sup> (KEEN, 2012). Os fagos são encontrados naturalmente e em equilíbrio em qualquer ambiente onde se desenvolvem seus microrganismos hospedeiros (HAMBLY; SUTTLE, 2005; HOLMFELDT et al., 2007).

Embora inicialmente o termo fago tenha sido também utilizado para denominar os vírus que infectam microrganismos do domínio Archaea e inúmeras denominações já tenham sido utilizadas (*archaeobacterial phage*, *halophage*, *archaeobacterial virus*, *archaeobacteriophage*, *archaeal phage*, *archaeophage*, *archaeobacterial bacteriophage*, *archaeal virus*, *archaea virus*, *archaeovirus* e *archaeovirus*), existe uma tendência de transição do termo “fago” para o termo “vírus” e consolidação da denominação arqueovírus (*archeoviruses* ou *archaeal viruses*) quando se tratam de vírus de arqueias (ABEDON; MURRAY, 2013).

Contudo, apesar de se saber atualmente, que diversos tipos de vírus podem infectar arqueias e que a diversidade morfológica de vírus de arqueias é maior que a de fagos, existem vírus identificados em famílias de fagos (*Myoviridae* e *Siphoviridae*) que também infectam arqueias (PIETILÄ et al., 2014; PINA et al., 2011). Nesse contexto, não seria tão improvável que fagos isolados em bactérias cultiváveis possam ter ação também em arqueias.

Muitos fagos apresentam alta especificidade ao seu hospedeiro, ou seja, um determinado tipo de fago só é capaz de infectar uma determinada espécie microbiana ou até mesmo uma determinada linhagem microbiana, os quais são normalmente denominados de **fagos específicos ou monovalente**; enquanto outros possuem um amplo espectro de hospedeiros, sendo capazes de infectar diversas espécies microbianas, até mesmo de gêneros e famílias distintas, os quais são eventualmente chamados de **fagos não-específicos, promíscuos ou polivalentes** (ANDREWS; FIELDS, 2021; CAZARES et al., 2021; HYMAN, 2019; HYMAN; ABEDON, 2010; KELLY et al., 2011; KUTTER, 2009; MIRZAEI; NILSSON, 2015)

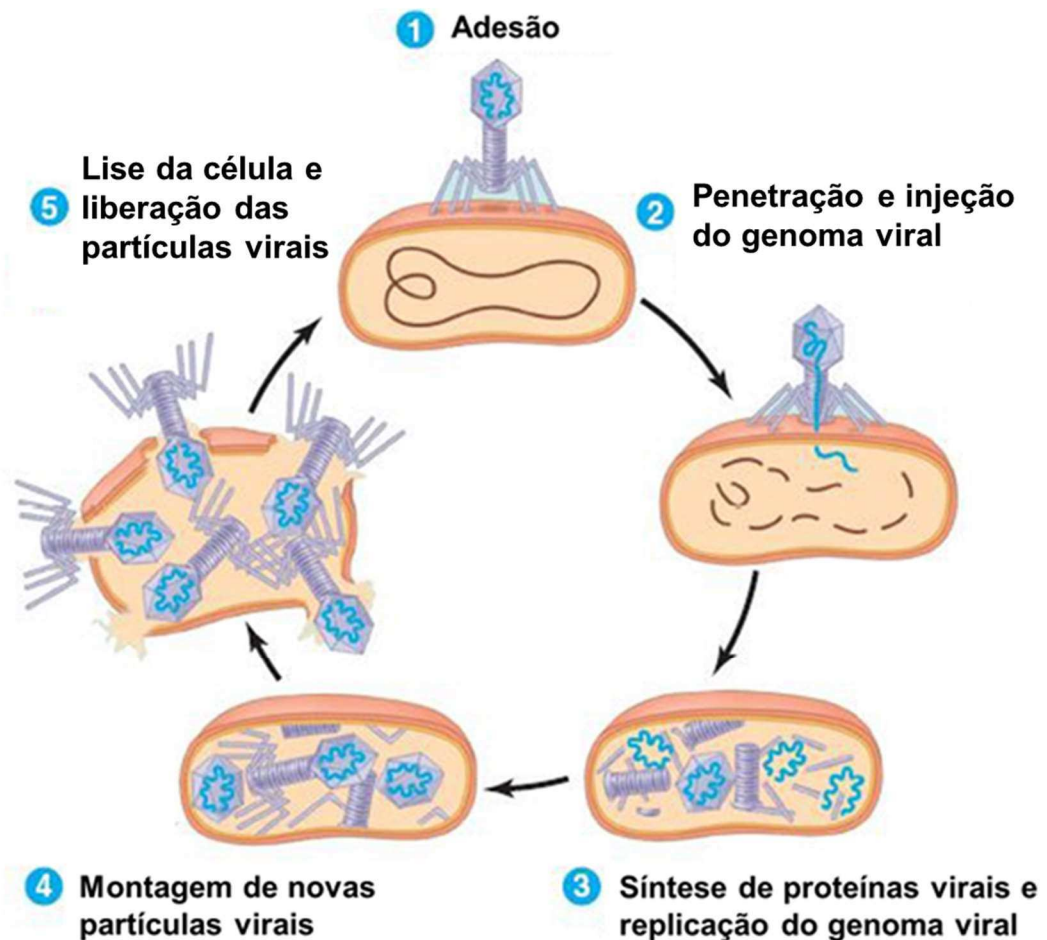
A estrutura básica de um fago está representada na **Figura 26** e compreende: **(i) o capsídeo**, um arranjo complexo de proteínas estruturais que protege o genoma viral; e, **(ii) a cauda**, que contém **fibras proteicas**, onde se localizam as proteínas de reconhecimento dos receptores da célula hospedeira e uma **bainha contrátil**, que atua no processo de injeção do genoma viral na célula (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020).



**Figura 26.** Estrutura básica de um bacteriófago, indicando **(1) o capsídeo**, um arranjo complexo de **proteínas estruturais** que protege o **genoma viral**; e, **(2) a cauda**, que contém **fibras proteicas**, onde se localizam as proteínas de reconhecimento dos receptores da célula hospedeira, e uma **bainha contrátil**, que atua no processo de injeção do genoma viral na célula. Modificado de BIOPORTEFOLIO (2015).

O **ciclo lítico** é o ciclo de vida básico dos fagos, ele representa o seu princípio de ação principal e está ilustrado esquematicamente na **Figura 27**. Em resumo, o ciclo lítico consiste nas seguintes etapas:

- (i) adesão** da partícula viral à superfície da célula microbiana por reconhecimento de proteínas receptoras;
- (ii) penetração** da parede celular microbiana e **injeção** do genoma viral no interior da célula;
- (iii) síntese de proteínas** virais e **replicação do genoma** viral utilizando a maquinaria metabólica da célula;
- (iv) montagem** de novas partículas virais;
- (v) lise** da célula com **liberação** das novas partículas virais para o meio, as quais podem então infectar novas células hospedeiras reiniciando o ciclo.



**Figura 27.** Ciclo lítico de um bacteriófago, indicando as etapas de: **(1) adesão** da partícula viral à superfície da célula microbiana; **(2) penetração** da parede microbiana e **injeção** do genoma viral; **(3) síntese de proteínas** virais e **replicação do genoma** viral; **(4) montagem** de novas partículas virais; e, **(5) lise** da célula com **liberação** das novas partículas virais para o meio, reiniciando o ciclo. Modificado de KIM (2015).

A tecnologia de bacteriófagos consiste na utilização de fagos para o controle de contaminações microbianas nocivas e/ou indesejáveis. Apesar de ser um campo de pesquisa com mais de 100 anos, tendo sido descritos de forma independente por Frederick Twort em 1915 e Felix d'Herelle em 1917 (ABEDON et al., 2017; SALMOND; FINERAN, 2015), observa-se que o interesse pela sua utilização tem crescido significativamente nos últimos anos, sobretudo visando a aplicação para o combate de bactérias patogênicas multirresistentes a antibióticos (BURROWES et al., 2011; SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001)

O potencial de utilização dos fagos é amplo, abrangendo diferentes áreas e setores industriais, de modo que estudos bem atuais são encontrados para uma ampla diversidade de aplicações, tais como:

- (i) saúde humana (AZEREDO; SILLANKORVA, 2018; FEBVRE et al., 2019);
- (ii) odontologia (BEN-ZAKEN et al., 2021; QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018);
- (iii) agricultura (BALOGH et al., 2010; DY; RIGANO; FINERAN, 2018; IRIARTE et al., 2007; RAVENSDALE, 2004; VONASEK et al., 2018; WANG et al., 2019);
- (iv) pecuária (ANGELOPOULOU et al., 2019; DEC; WERNICKI; URBAN-CHMIEL, 2020; DIAS et al., 2013; NGASSAM-TCHAMBA et al., 2020);
- (v) avicultura (FIRLIEYANTI; CONNERTON; CONNERTON, 2016; USHANOV et al., 2020);
- (vi) aquicultura (DUARTE et al., 2018; DY; RIGANO; FINERAN, 2018; KALATZIS et al., 2016; LAANTO et al., 2015; MATEUS et al., 2014);
- (vii) apicultura (JÓNCZYK-MATYSIAK et al., 2020; YOST; TSOURKAS; AMY, 2016);
- (viii) indústria de alimentos (EL-SHIBINY; EL-SAHHAR; ADEL, 2017; GANEGAMA ARACHCHI et al., 2013; GOODRIDGE; BISHA, 2011; GUTIÉRREZ et al., 2016; TOMAT et al., 2013);
- (ix) indústria de cosméticos (ABO-ELMAATY; EL DOUGDOUG; HAZAA, 2016);
- (x) saneamento, tratamento de águas e reuso de efluentes, para controle de *biofouling* em Reatores Biológicos a Membranas (MBR - *Membrane Bioreactor*) (BHATTACHARJEE et al., 2015), em membranas de osmose reversa (BELGINI et al., 2014; DIAS, 2014) e de ultrafiltração (GOLDMAN; STAROSVETSKY; ARMON, 2009).

No contexto da indústria do petróleo, o desenvolvimento e aplicação da tecnologia de bacteriófagos é mais recente, contudo, existem vários estudos relacionados ao tema, bem como algumas patentes já depositadas, cujo principal foco é, sobretudo, o controle das BRS (EYDAL et al., 2009; JOHNSON et al., 2017; SUMMER et al., 2011).

A utilização dos fagos como estratégia de controle de contaminações microbianas na indústria do petróleo pode conferir várias vantagens: (i) podem reduzir significativamente as concentrações e a frequência de dosagem em relação aos produtos biocida (BORIE; ROBESON; GALARCE, 2014; LOC-CARRILLO; ABEDON,

2011); **(ii)** possuem enzimas capazes de atacar diretamente a matriz dos biofilmes (KNECHT; VELJKOVIC; FIESELER, 2020); **(iii)** exercerem menor pressão seletiva que os agentes antimicrobianos, minimizando o surgimento de bactérias resistentes, além de evoluírem naturalmente no ambiente podendo ampliar seu espectro de hospedeiros (ELBREKI et al., 2014; KUTTER, 2009; LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011); e **(iv)** podem ser considerados uma tecnologia de menor impacto ocupacional, operacional e ambiental (DEC; WERNICKI; URBAN-CHMIEL, 2020; KUTTER et al., 2010; LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011; WRIGHT et al., 2009).

Devido ao ciclo lítico, no qual os fagos infectam as células microbianas, replicam seu genoma, montam novas partículas virais infectivas e causam a lise da célula liberando novas partículas que irão infectar novas células, o próprio ciclo de multiplicação dos fagos é também uma de suas principais vantagens, pois após uma primeira aplicação, eles irão se manter no ambiente enquanto houver células hospedeiras presentes, reduzindo significativamente as concentrações e a frequência de dosagem em relação aos produtos biocidas, ou até mesmo tornando desnecessárias novas aplicações em curto ou médio prazo (DRULIS-KAWA et al., 2013; GOODRIGE; ABERDON, 2003; LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011; SUTHERLAND et al., 2004).

Muitos fagos possuem enzimas do tipo depolimerases (KNECHT; VELJKOVIC; FIESELER, 2020), as quais agem diretamente sobre as EPS da matriz dos biofilmes, podendo levar à ruptura e completa desestruturação de biofilmes maduros pré-estabelecidos. Esta é a principal característica explorada para os fagos não-específicos selecionados para este estudo e pelos demais estudos do LIVM e CENPES cujos resultados levaram ao depósito da patente, **BR 10 2020 023886-8**, intitulada “PROCESSO DE PREPARO DE COMPOSIÇÕES DE BACTERIÓFAGOS, COMPOSIÇÕES DE BACTERIÓFAGOS E USO” (DIAS; DE PAULA; SOUSA, 2020).

Do ponto de vista ocupacional, por se tratar de vírus exclusivos de microrganismos procariotos, os fagos não possuem a capacidade de infectar células humanas (eucarióticas). Além disso, os fagos fazem parte natural do microbioma humano e são utilizados inclusive na Fagoterapia ou Terapia Fágica para o tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas (ALMEIDA; SUNDBERG, 2020; GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019; KUTTER et al., 2010).

Já existem até produtos farmacêuticos comerciais à base de fagos para o tratamento de problemas gastrointestinais, que podem ser ingeridos e prescindem de

prescrição médica (ELIAVA, 1923; LIFE EXTENSION, 2021). Além disso, segundo DEC; WERNICKI; URBAN-CHMIEL (2020), os fagos não deixam resíduos nos tecidos e não se faz necessário um intervalo de segurança entre as ingestões. Portanto, os fagos podem ser considerados produtos de baixo risco toxicológico quanto à sua manipulação por humanos (PIRNAY et al., 2015; WERNICKI; NOWACZEK; URBAN-CHMIEL, 2017).

Do ponto de vista operacional, um produto à base de fagos tende a ser um produto de **baixa corrosividade**, uma vez que as partículas virais em si, não possuem ação direta sobre os metais e não é necessário incorporar produtos químicos de alta corrosividade na formulação dos coquetéis fágicos. Em contraste, produtos biocidas, principalmente aqueles contendo THPS, apresentam uma corrosividade elevada, o que em muitos casos inviabiliza seu uso em concentrações mais altas e efetivas (KEASLER et al., 2017; SHARMA et al., 2017).

Do ponto de vista ambiental, os fagos tendem a ser considerados de menor impacto em relação aos produtos biocidas, uma vez que já se encontram naturalmente em abundância no meio ambiente (KEEN, 2012). Portanto, um eventual descarte ou acidente no meio ambiente, tende a ser depurado e entrar em equilíbrio natural. Contudo, não foram identificados estudos ecotoxicológicos ou de biodegradabilidade com formulações ou produtos comerciais à base de fagos de aplicação ambiental. Sendo assim, eles são extremamente necessários para um avanço da tecnologia.

Para fins regulatórios no Brasil, um produto à base de fagos não se enquadraria na mesma categoria dos biocidas, que são classificados como saneantes, mas sim como agentes biológicos de controle, a exemplo de inoculantes para a agricultura, que são regulamentados por uma INC (Instrução Normativa Conjunta) do MAPA, ANVISA e IBAMA (MAPA/ANVISA/IBAMA, 2006).

Apesar dessas vantagens, é importante considerar que os fagos podem perder atividade se armazenados inadequadamente por longo tempo (PIRNAY et al., 2015; WERNICKI; NOWACZEK; URBAN-CHMIEL, 2017). Além disso, as comunidades microbianas podem desenvolver resistência aos fagos pois possuem mecanismos celulares para combater as infecções fágicas (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010). Porém, sabe-se que as mutações em direção à resistência de um microrganismo a um fago específico são menos comuns do que no caso dos antibióticos e, além disso, se as bactérias resistentes a um fago aparecerem, é muito mais fácil encontrar outro fago do que descobrir ou sintetizar um novo antibiótico (ELBREKI et al., 2014).

Na prática, a forma de minimizar essas possíveis desvantagens é a elaboração de formulações contendo vários fagos, ou seja, desenvolver coquetéis fágicos (KUTTER et al., 2010), e eventualmente, encapsular os fagos para garantir maior durabilidade (LOH et al., 2021; MALIK, 2021; MALIK et al., 2017). Dessa forma, os coquetéis fágicos poderiam ser customizados não só ao cenário de aplicação, como ao efeito do coquetel na comunidade microbiana após determinado tempo de aplicação, de modo a alternar a utilização de dois coquetéis, por exemplo.

Um indicativo da resistência microbiana ao fago é a presença de pró-fagos (ou sequências de pró-fagos) no genoma microbiano. Os fagos conhecidos como fagos temperados, possuem a capacidade de permanecer em um estado latente, integrados no genoma de seu hospedeiro. Este ciclo de vida é denominado de ciclo lisogênico, no qual não há a produção de novas partículas virais nem a lise da célula hospedeira como ocorre no ciclo lítico. Quando o genoma do fago se encontra nessa condição, ele é denominado de pró-fago (LITTLE, 2014; OFIR; SOREK, 2018).

Os pró-fagos, além de replicarem seu genoma conforme a própria célula hospedeira se replica, também podem atuar em um processo denominado de conversão lisogênica, quando se induz a expressão de genes não essenciais, capazes de alterar o fenótipo e comportamento da célula hospedeira, tais como incrementar a patogenicidade, codificar fatores de virulência ou produzir toxinas, conferindo vantagens evolutivas mútuas (FEINER et al., 2015).

Em BRS, por exemplo, existem trabalhos que identificaram a presença de 128 elementos pró-fagos ao analisar 47 genomas de 33 espécies do gênero *Desulfovibrio*, um dos gêneros de BRS mais encontrados em cenários de contaminações microbianas na indústria do petróleo (CRISPIM et al., 2018).

Por outro lado, no contexto ecológico e evolutivo natural do ecossistema das contaminações microbianas, os fagos também podem evoluir no ambiente natural, ampliando sua gama de hospedeiros e assim passando a infectar novas bactérias (LETCUMANAN et al., 2016; LITTLE, 2014; SHARP, 2001). Além disso, a presença dos pró-fagos nas bactérias relacionadas aos problemas operacionais, pode ser algo interessante, pois sucessivas infecções fágicas, bem como as variações ambientais nos sistemas de produção de petróleo e os agentes químicos utilizados, tanto podem induzir estes pró-fagos a entrar no ciclo lítico, quanto podem induzir eventos naturais de recombinação e serem incorporados nos fagos utilizados, possibilitando uma ampliação do espectro de hospedeiros.

Condições de estresse para a célula microbiana, tais como choques de pH, salinidade e temperatura ou a presença de agentes químicos (como biocidas) ou físicos (como a radiação ultravioleta), capazes de provocar danos ao DNA e acionar a resposta SOS das células, podem induzir os pró-fagos a entrarem em ciclo lítico (CHATTERJEE; DUERKOP, 2019). Estudos com uma BRS do gênero *Desulfovibrio*, que possui sequências de três pró-fagos em seu genoma, demonstraram a produção de VLPs (*virus-like particles*) por indução dos pró-fagos por mitomicina C e também identificaram a presença de genes dos pró-fagos em vesículas de membrana externa, que são capazes de se dispersar no biofilme e podem estar relacionadas com a transferência horizontal de genes na comunidade microbiana do biofilme (CRISPIM et al., 2019).

Diante de tais vantagens e desvantagens, um aspecto essencial para o desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos é a importância de serem feitos estudos abrangentes e contínuos de caracterização da diversidade microbiana, sobretudo nos diferentes cenários da indústria do petróleo, onde tais informações e sua correlação prática com os problemas ou eventos operacionais ainda é algo muito escasso (MEADEN; KOSKELLA, 2013).

As pesquisas quanto à aplicação de fagos para o controle de contaminações microbianas na PETROBRAS iniciaram-se como estudos prospectivos da ação dos fagos em bactérias formadoras de biofilmes em sistemas de osmose reversa de refinarias de petróleo e detecção e isolamento de fagos em amostras industriais (BELGINI et al., 2014; DIAS, 2014). Em seguida, tais estudos ganharam maior abrangência e passaram a focar na aplicação dos fagos para o controle de biofilmes e, em especial, de BRS em cenários de produção de petróleo.

Os resultados obtidos até o momento, além de demonstrarem a efetividade dos fagos sobre biofilmes e sobre BRS, demonstram como principal vantagem em comparação aos biocidas, que as concentrações necessárias, bem como as frequências de dosagem tendem a ser significativamente menores (CARMO, 2019).

## **2.8. AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERIÓFAGOS**

Visando uma aplicação real de um produto à base de fagos em plataformas de petróleo, alguns parâmetros do produto são requisitos para se obter anuência para realização de testes piloto em campo. Posteriormente, esses parâmetros poderão

ser requisitos regulatórios para o registro e comercialização do produto. Já, outros parâmetros, relacionam-se diretamente a requisitos operacionais do cenário de aplicação.

Nesse contexto, algumas análises preliminares foram realizadas com o coquetel fágico selecionado nesse estudo, visto que não foram encontrados dados em literatura relativos a tais parâmetros com qualquer produto comercial à base de fagos, ou mesmo com soluções contendo um ou mais fagos. Produtos comerciais para a agricultura, por exemplo, apresentam esses parâmetros como riscos não conhecidos e produtos comerciais para a indústria de alimentos, por exemplo, adotam os parâmetros dos alimentos nos quais o produto fágico foi aplicado (INTRALYTIX, 2022; OMNILYTICS INC., 2022).

As análises preliminares realizadas abordaram os principais impactos potenciais que o uso de um produto em condições reais pode causar no meio ambiente ou na operação do sistema e/ou cadeia industrial onde o produto é aplicado. Os potenciais impactos avaliados foram divididos em dois tipos: **(i) impactos ambientais** e **(ii) impactos operacionais**.

### **2.8.1. Impactos ambientais**

Os impactos ambientais avaliados abordaram **(i) a ecotoxicidade** e **(ii) a biodegradabilidade** do coquetel fágico para ambientes marinhos em comparação aos produtos biocidas à base de THPS tradicionalmente utilizados em plataformas de petróleo *offshore* no Brasil.

A ecotoxicologia é a ciência que estuda o efeito dos agentes químicos, físicos e biológicos sobre os organismos vivos e se baseia na realização de bioensaios (testes ecotoxicológicos), utilizando organismos teste de diferentes níveis tróficos, para monitoramento e avaliação da qualidade da água (CALOW, 1998; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os testes ecotoxicológicos são normalmente empregados na avaliação da contaminação e potencial impacto de efluentes, permitindo a obtenção de um resultado referente ao efeito sinérgico ou antagônico dos diferentes compostos poluidores presentes, mas também podem ser aplicados para se avaliar o efeito de uma determinada substância ou de um produto (LOMBARDI, 2004; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

No Brasil, a Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 357 (CONAMA, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e fornece diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Nela, ensaios ecotoxicológicos estão definidos como sendo *“ensaios realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos aquáticos”* (artigo 2º, parágrafos XXI). Ela também define que não se deve verificar efeito ecotóxico agudo ou crônico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, sendo que isso deve ser comprovado pela realização de testes ecotoxicológicos padronizados.

Em caráter complementar, em 2011, foi publicada a Resolução CONAMA 430 (CONAMA, 2011), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e traz a definição de testes de ecotoxicidade como sendo os *“métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade de um agente tóxico provocar efeito nocivo, utilizando bioindicadores dos grandes grupos de uma cadeia ecológica”* (artigo 4º, parágrafo XIII). A CONAMA 430 passa a ser um pouco mais específica por estabelecer que os critérios de ecotoxicidade, devem utilizar organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos (artigo 18, inciso 1). Contudo, nenhuma resolução estabelece ou restringe quais organismos teste devem ser utilizados.

O tipo de ensaio ecotoxicológico, portanto, pode ser um critério definido pelo órgão ambiental competente do estado da federação em que se encontra o empreendimento, sendo variável em função do tipo de empreendimento e setor industrial, podendo ainda ser diferente entre empreendimentos de mesma natureza a depender da localidade e sensibilidade ambiental da região, o que, via de regra, é definido no licenciamento ambiental. Porém, pode se tornar mais ou menos restritivo ao longo da vida produtiva conforme resultados do monitoramento entregues pelo empreendedor ao órgão ambiental.

Vários ensaios ecotoxicológicos padronizados são adotados no Brasil e possuem norma técnica da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2022a), que por sua vez possui um comitê técnico específico para tais ensaios, o comitê ABNT/CEE-106 - Análises Ecotoxicológicas.

As normas brasileiras para ensaios ecotoxicológicos utilizados tanto para avaliação da ecotoxicidade aguda quanto crônica, para organismos marinhos e de água doce, encontram-se listadas nas **Tabelas 6 e 7**, respectivamente.

**Tabela 6.** Normas da ABNT para ensaios ecotoxicológicos aquáticos utilizados na avaliação da ecotoxicidade aguda e crônica em organismos marinhos (ABNT, 2022a).

Ensaio ecotoxicológico para organismos marinhos		Organismos teste
Ecotoxicidade aguda	<b>NBR 15411-1:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> . Parte 1: Método utilizando bactérias recém-cultivadas (ABNT, 2021a).	<i>Vibrio fischeri</i>
	<b>NBR 15411-2:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> . Parte 2: Método de ensaio utilizando bactérias desidratadas (ABNT, 2021b).	
	<b>NBR 15411-3:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> . Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas (ABNT, 2021c).	
	<b>NBR 15308:2017</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com misídeos (Crustacea) (ABNT, 2017).	<i>Misidopsis juniae</i> <i>Mysidium gracile</i>
	<b>NBR 16530:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Artemia sp</i> (Crustacea, Brachiopoda) (ABNT, 2021f).	<i>Artemia sp</i>
	<b>NBR 16723:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Método de ensaio com copépodos marinhos e estuarinos (Copepoda, Crustacea) (ABNT, 2021d).	<i>Acartia sp</i> <i>Nitocra sp</i> <i>Tisbe sp</i>
Ecotoxicidade crônica	<b>NBR 15350:2020</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea) (ABNT, 2020).	<i>Echinometra lucunter</i>
	<b>NBR 16456:2022</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio de curta duração com embriões de mexilhões (Mollusca - Bivalvia) (ABNT, 2022e).	<i>Perna perna</i>
	<b>NBR 16181:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade Crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas (ABNT, 2021e).	<i>Skeletonema costatum</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Minutocellus polymorphus</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Tetraselmis chui</i> <i>Isochrysis aff. galbana</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>

**Tabela 7.** Normas da ABNT para ensaios ecotoxicológicos aquáticos utilizados na avaliação da ecotoxicidade aguda e crônica em organismos de água doce (ABNT, 2022a).

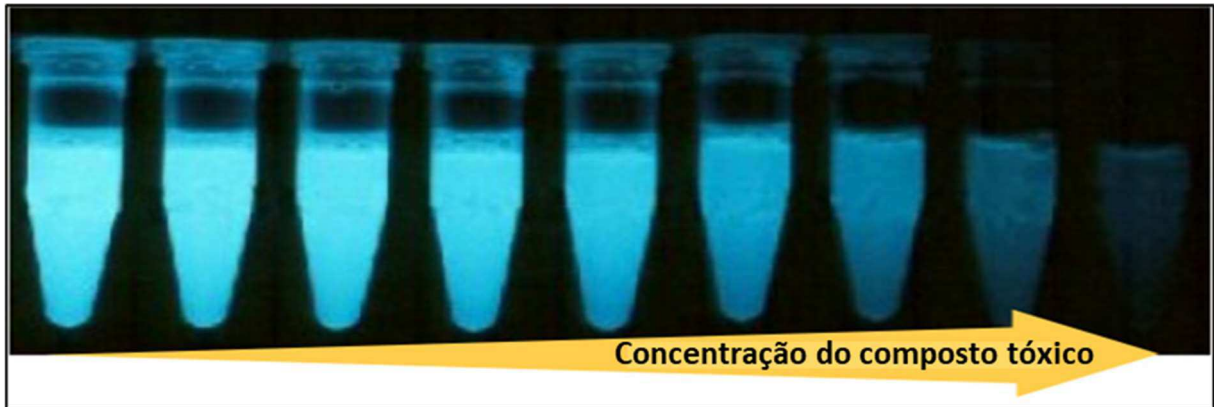
<b>Ensaios ecotoxicológicos para organismos de água doce</b>		<b>Organismo teste</b>
<b>Ecotoxicidade aguda</b>	<b>NBR 15411-1:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> . Parte 1: Método utilizando bactérias recém-cultivadas (ABNT, 2021a).	<i>Vibrio fischeri</i>
	<b>NBR 15411-2:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> . Parte 2: Método de ensaio utilizando bactérias desidratadas (ABNT, 2021b).	
	<b>NBR 15411-3:2021</b> - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i> . Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas (ABNT, 2021c).	
	<b>NBR 12713:2021</b> - Ecotoxicologia aquática: Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Daphnia spp</i> (Cladocera, Crustacea) (ABNT, 2022b).	<i>Daphnia similis</i>
	<b>NBR 15.088:2022</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae) (ABNT, 2022c).	<i>Danio Rerio</i> <i>Pimephales promelas</i>
<b>Ecotoxicidade crônica</b>	<b>NBR 13373:2022</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia spp</i> , (Crustacea, Cladocera) (ABNT, 2022d).	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
	<b>NBR 15499:2022</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes (ABNT, 2022c).	<i>Danio rerio</i> <i>Pimephales promelas</i>
	<b>NBR 12648:2018</b> - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) (ABNT, 2018).	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Desmodesmus subspicatus</i> <i>Monoraphidium dybowskii</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i>

No caso deste estudo, para a avaliação preliminar da potencial ecotoxicidade dos fagos, foram realizados ensaios ecotoxicológicos através de testes pelo sistema Microtox® (MICROBICS CORPORATION, 1992), conforme a norma ABNT-NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri*. Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas (ABNT, 2021c).

Os ensaios pelo sistema Microtox® avaliam a ecotoxicidade aguda de uma substância ou produto utilizando como organismo teste a bactéria *V. fischeri*, uma

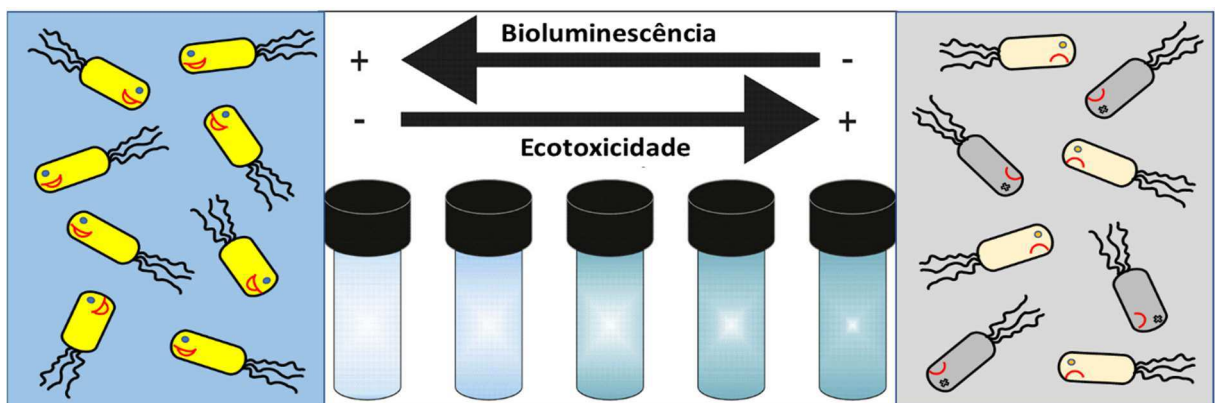
bactéria marinha, não patogênica, que emite luminescência como parte natural de seu metabolismo (CALOW, 1998; DE ZWART; SLOOFF, 1983).

O teste de ecotoxicidade, portanto, se baseia na redução da emissão de bioluminescência quando a bactéria é exposta a um composto tóxico, conforme observado na imagem da **Figura 28** (ALS, 2018).



**Figura 28.** Redução da bioluminescência emitida em função do aumento na concentração de uma substância tóxica em avaliação através de ensaio pelo sistema Microtox® (ALS, 2018).

Quanto menor for a luminescência observada, maior será a ecotoxicidade da substância ou produto em avaliação, conforme representação esquemática da **Figura 29** (adaptado de GARCIA-ORDIALES et al., 2019).



**Figura 29.** Representação esquemática do princípio do método de ensaio ecotoxicológico do sistema Microtox®, baseado na emissão de luminescência pela bactéria *Vibrio fischeri*, quanto menor a bioluminescência observada, maior a ecotoxicidade da substância ou produto em avaliação (adaptado de GARCIA-ORDIALES et al., 2019).

O resultado de testes de ecotoxicidade aguda em geral é expresso como concentração de efeito, de inibição ou letal a 50% dos organismos (CE50, CI50 ou CL50), ou seja, a concentração do produto que causou efeito, inibiu ou matou 50% da população do organismo teste (SINGLA; SANKAR; SINGH, 2020; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). No caso do sistema Microtox®, o resultado é expresso em CE50 e trata-se da concentração da amostra em que a bioluminescência foi reduzida pela metade em relação ao controle (MICROBICS CORPORATION, 1992).

A bactéria *V. fischeri* é um dos organismos teste mais utilizados em ecotoxicologia devido à sua sensibilidade, relevância ecológica e adaptação a variações de salinidade, permitindo seu uso tanto para ambientes marinhos, quanto de água doce. Além disso, é um ensaio de fácil e rápida execução (DE ZWART; SLOOFF, 1983; GHIRARDINI et al., 2009; PÉREZ et al., 2012). Neste estudo, os ensaios foram realizados com água do mar, visto que tais resultados pretendem subsidiar um futuro teste piloto com o coquetel fágico em uma plataforma de petróleo *offshore*.

Ainda em relação à legislação, no caso de plataformas de petróleo, existe também uma resolução específica, a Resolução CONAMA 393 (CONAMA, 2007), que dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo. Ela também traz uma definição genérica de ensaios ecotoxicológicos (artigo 2º, parágrafo V) e determina o “*monitoramento semestral da água produzida a ser descartada*”, tendo como parâmetro mínimo a ecotoxicidade crônica para organismos marinhos (artigo 10º, parágrafo IV).

De modo geral, segundo a CONAMA 393, o tratamento da água de produção descartada no mar em plataformas de petróleo consiste apenas no seu enquadramento quanto ao residual de TOG (média mensal de até 29 mg/L, com valor máximo diário de 42 mg/L) e prevê um monitoramento dos parâmetros químicos, bem como da ecotoxicidade crônica a ser encaminhado semestralmente ao órgão ambiental. Porém, na prática, geralmente esse monitoramento é realizado com maior frequência e a ecotoxicidade aguda também é monitorada.

Além disso, caso ocorra a necessidade de utilização de qualquer produto químico no processo de produção do petróleo, sobretudo passível de partição na água de produção a ser descartada no mar e que não esteja previsto no licenciamento ambiental da plataforma, o órgão ambiental deve ser informado, cabendo a ele prover

anuência quanto à utilização do produto, mesmo quando se trata de um produto para fins de estudos ou testes em campo.

Nesse contexto, considerando a perspectiva de que se pretende avaliar o coquetel fágico utilizado neste estudo, em futuros testes piloto em plataformas de petróleo, pressupõe-se a necessidade de se obter a anuência prévia do órgão ambiental para este fim e, portanto, se torna imprescindível a avaliação do coquetel fágico quanto aos aspectos de sua potencial ecotoxicidade e biodegradabilidade, sendo de interesse mais imediato que tais avaliações sejam feitas com organismos teste marinhos.

A biodegradabilidade por sua vez, ainda que não seja um parâmetro explicitamente exigido pela CONAMA 393, trata de uma característica normalmente requerida para avaliação ambiental de qualquer produto utilizado industrialmente e, nesse caso, essencial para se obter a anuência do órgão ambiental para realização de estudos em campo em plataformas de petróleo, sendo também um requisito de qualificação dos fornecedores de produtos químicos a serem utilizados em plataformas.

Visando um futuro registro de um coquetel fágico para uso industrial, todos os produtos comercializados no país, estão sujeitos ao atendimento da Norma Brasileira NBR 14725, que trata das informações de segurança, saúde e meio ambiente exigidas na classificação de produtos químicos transportados e comercializados em território nacional (ABNT, 2009b) e, portanto, serve como base para as análises que devem ser realizadas em novos produtos em desenvolvimento para sua futura aprovação, registro e comercialização.

Além de parâmetros físico-químicos e toxicológicos do produto, a NBR 14725, contempla as análises de ecotoxicidade e biodegradabilidade e indica os principais testes de referência que devem ser preferencialmente utilizados (ABNT, 2009a), os quais, em sua maior parte, referem-se aos testes padronizados das diretrizes para testes de produtos químicos da OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2002).

Como teste padrão de biodegradabilidade a NBR 14725 indica o teste no 301 da OECD: *Ready biodegradability* (OECD, 1992a) referente à biodegradabilidade para solo e ambientes de água doce, uma vez que a NBR tem como foco o transporte terrestre de produtos químicos em território nacional (ABNT, 2009a).

Contudo, no contexto de estudos ambientais e especificamente relacionados a plataformas de petróleo, os ensaios de biodegradabilidade devem priorizar a biodegradabilidade para ambientes marinhos, sendo, portanto, realizados segundo o teste nº 306: *Biodegradability in Seawater* (Biodegradabilidade em água do mar) da OECD (OECD, 1992b).

A biodegradabilidade consiste na susceptibilidade de um determinado composto sofrer degradação por ação microbiana (biodegradação), sendo que o processo de biodegradação decorre da atuação sinérgica de diferentes grupos microbianos que se utilizam de diversas vias metabólicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Conhecer a biodegradabilidade de um composto ou produto é uma informação importante para a avaliação do seu comportamento ecológico e fundamental pelo simples fato de que uma substância degradável não causará risco a longo prazo para o meio ambiente (PAGGA, 1997).

A biodegradabilidade de um determinado composto no meio ambiente, é influenciada por diversos fatores, tais como: **(i)** características físicas do composto, como solubilidade em água; **(ii)** características químicas do composto, como massa e estrutura molecular, **(iii)** presença de determinados grupos funcionais mais ou menos susceptíveis à ação enzimática; e **(iv)** presença e abundância de microrganismos adequados no meio ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

No caso de um coquetel fágico, o produto basicamente será composto pelas partículas virais em si e pelo residual dos nutrientes utilizados como meio de cultivo para crescimento das bactérias hospedeiras, sendo basicamente formado por fontes de carbono de fácil e rápida assimilação, tais como triptona, glicose, lactato, acetato, além de sais minerais e de aminoácidos e vitaminas essenciais, normalmente fornecidos pelo extrato de levedura (KRISCH; PRERE; TETART, 2012). Esta é uma das razões, pelas quais os fagos são considerados de baixa ecotoxicidade e alta biodegradabilidade pela literatura científica em geral (DEC; WERNICKI; URBAN-CHMIEL, 2020; KUTTER et al., 2010; LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011; WRIGHT et al., 2009).

Contudo, não foram encontradas publicações até o momento, nas quais ensaios ecotoxicológicos ou de biodegradabilidade tenham sido realizados de fato em produtos comerciais à base de fagos ou mesmo soluções contendo um ou mais fagos, quer seja por métodos padronizados reconhecidos internacionalmente ou não,

tornando o estudo desses parâmetros, ainda que de modo preliminar, algo de extrema relevância não só do ponto de vista da aplicação e avanço da tecnologia, mas também como algo de interesse e aprofundamento científico e acadêmico.

### 2.8.2. Impactos operacionais

Quanto aos potenciais impactos operacionais, análises realizadas nesse estudo, avaliaram **(i) a corrosividade** do coquetel fágico e **(ii) o seu efeito no tratamento biológico de água de produção**.

O grau de corrosividade, refere-se ao potencial do produto em provocar corrosão generalizada e consequente perda de espessura do material metálico. Os produtos biocidas em geral (mesmo os biocidas não oxidantes), normalmente possuem pH baixo e tendem a reduzir o pH dos fluidos onde são dosados, provocando problemas de corrosão nos sistemas, principalmente no sistema de dosagem do biocida (KEASLER et al., 2017; SHARMA et al., 2017).

Sendo assim, a avaliação da corrosividade do produto em si, é essencial para a qualificação de qualquer novo produto antimicrobiano candidato ao uso na indústria do petróleo, ou seja, um novo produto biocida ou qualquer outro produto alternativo, cujo objetivo seja controlar ou mitigar os efeitos da contaminação microbiana, não deve incrementar a corrosividade do fluido acima dos níveis já ocasionados pelos produtos convencionalmente utilizados.

A corrosividade de fluidos na indústria do petróleo é classificada com base na Taxa de Corrosão (**Tabela 8**) segundo a Norma **NACE SP0775-2018-SG: Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations** (NACE INTERNATIONAL, 2018), recomendada pela *NACE International - National Association of Corrosion Engineers* (Associação Nacional de Engenheiros de Corrosão), que recentemente se fundiu com a *SSPC - The Society for Protective Coatings* (Sociedade para Revestimentos de Proteção) e atualmente é denominada de *AMPP - Association for Materials Protection and Performance* (Associação para Proteção e Performance de Materiais).

**Tabela 8.** Classificação da corrosividade de fluidos na indústria do petróleo segundo Norma NACE SP0775-2018-SG (NACE INTERNATIONAL, 2018).

Taxa de Corrosão (mm/ano)	Corrosividade
$\geq 0,25$	Severa
0,13 a 0,25	Alta
0,025 a 0,12	Moderada
$\leq 0,025$	Baixa

Na maior parte dos sistemas de plataformas de petróleo no Brasil, o produto biocida de referência é o THPS 75%, sendo assim, qualquer outro produto antimicrobiano para ser qualificado para este uso, deve ter sua corrosividade comparada à do THPS 75%. No caso de tanques de plataformas, especificamente, a taxa de corrosão do produto puro não deve ser maior que 0,5 mm/ano, considerando o aço carbono API 5L Gr, analisada conforme a Norma da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) International, **ASTM G31-21: Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals** (ASTM INTERNATIONAL, 2021).

Nesse contexto, ensaios para a avaliação da corrosividade costumam ser customizados, podendo ser realizados de várias formas, frente a diferentes materiais metálicos e sob diversas condições físico-químicas. Contudo, em linhas gerais, uma avaliação comparativa da corrosão generalizada e uniforme provocada por produtos químicos em si, pode ser rapidamente feita através de ensaios de imersão de curta duração (5 a 7 dias). Já uma avaliação considerando uma potencial corrosão localizada, não uniforme, como é característica da corrosão microbiológica, deve ser feita preferencialmente em ensaios de longa duração (30 a 90 dias), de modo a permitir a nucleação de *pits* e, conseqüentemente, uma análise comparativa consistente da densidade e profundidade desses *pits*.

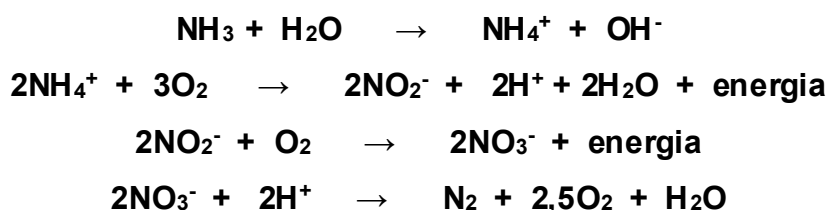
Sendo assim, em uma avaliação da corrosividade de um coquetel fágico em comparação a produtos biocidas comerciais, ainda que inicialmente a avaliação pretendida tenha por objetivo apenas a comparação dos produtos em si em um ensaio abiótico, é indicado que sejam realizados ensaios com um período de duração de pelo menos 30 dias, de modo a permitir uma comparação direta dos resultados em ensaios bióticos no futuro.

Já em relação à avaliação de um potencial impacto do coquetel fágico em um sistema biológico de tratamento de água de produção de terminais terrestres

aquaviários de petróleo, os ensaios visam avaliar um potencial efeito dos fagos sobre a atividade de remoção de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) pela microbiota do lodo biológico, visto que este é o principal processo desses sistemas e o mais susceptível a impactos que podem levar ao desenquadramento do efluente final tratado restringindo seu descarte (FAKHURU'L-RAZI et al., 2009b).

Processos biológicos são amplamente utilizados para remoção de amônia em efluentes industriais e águas residuárias não salinas, onde a atividade microbiológica é conhecida e controlada pelos parâmetros de processo dos sistemas de tratamento (VON SPERLING, 2016; YE et al., 2018). Entretanto, a presença de sal é um fator limitante para processos biológicos, posto que a salinidade tende a afetar a atividade metabólica dos microrganismos, reduzindo seu crescimento e as taxas de oxidação da amônia (ASLAN; SIMSEK, 2012; MOUSSA et al., 2006).

De modo geral, o objetivo do tratamento biológico é remover a amônia do efluente através da transformação do nitrogênio orgânico em nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ). Em sistemas de tratamento convencionais, esse processo é realizado através da atividade de bactérias nitrificantes (nitrificação) e desnitrificantes (desnitrificação). A nitrificação ocorre em condições aeróbias, onde bactérias nitrificantes convertem a amônia em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e posteriormente a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e a desnitrificação ocorre em condições anóxicas, onde as bactérias desnitrificantes convertem o  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ , conforme a sequência de reações abaixo (JETTEN; M.S.M.; HORN; S.J.; VAN LOOSDRECHT; M.C.M., 1997; LI; LI; LI, 2018; VON SPERLING, 2016; WALTERS et al., 2009; YE et al., 2018).



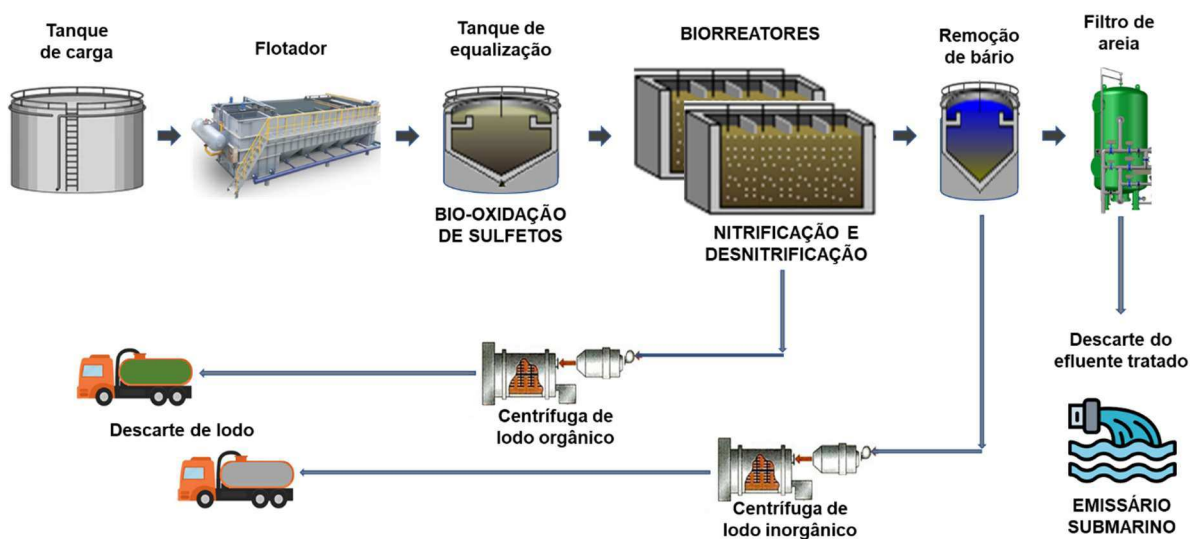
Em relação à legislação ambiental, para o adequado tratamento e descarte no mar da água de produção de plataformas de petróleo, de modo geral, basta o tratamento para enquadramento do TOG conforme CONAMA 393 (CONAMA, 2007). Contudo, a partir do momento que essa água chega aos terminais em terra, a legislação pertinente passa a ser a CONAMA 430, que dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores. Portanto, vários parâmetros além do TOG precisam ser

atendidos, dentre eles a concentração de amônia, que precisa ser enquadrada, sendo o valor máximo permitido 20 mg/L (CONAMA, 2011).

As estações de tratamento de efluentes (ETE) de terminais aquaviários de petróleo por rota biológica, foram introduzidas no Brasil no início da década de 2010, para ampliar a eficiência, robustez e capacidade de tratamento da água produzida, uma vez que comparado aos tratamentos químicos, o processo biológico além de ser um sistema robusto e de boa eficiência, possui menor custo e risco operacional, com menor consumo de produtos químicos e menor necessidade de disposição de resíduos classificados, bem como menor consumo energético (SINGH; SRIVASTAVA, 2011; ZHOU et al., 2011).

Essas ETEs em terminais, foram implantadas em sua menor parte, para tratamento das águas convencionais do próprio terminal (águas separadas nos processos de *offloading* e dos tanques) e, em sua maior parte, para permitir o tratamento de água produzida (não enquadrada para descarte em mar) proveniente diretamente de plataformas (com o objetivo de manter os níveis de produção de petróleo, sobretudo em reservatórios de campos maduros).

As unidades de tratamento biológico das ETEs consistem de reatores em bateladas sequenciais e o sistema como um todo compreende: **(i) tanque de carga**, onde todas as correntes de água a serem tratadas se misturam e são armazenadas para alimentar o sistema; **(ii) flotador**, que faz a separação de óleo residual; **(iii) tanque de equalização**, que regula a vazão de alimentação e onde também ocorre a bio-oxidação de sulfetos; **(iv) reatores biológicos**, onde ocorre a maior parte dos processos biológicos principais, ou seja, remoção de carbono e amônia (nitrificação e desnitrificação); **(v) remoção de bário** residual por processo químico; **(vi) centrífuga de lodo orgânico**, para descarte do lodo residual dos reatores biológicos; **(vii) centrífuga de lodo inorgânico**, para descarte do lodo proveniente da remoção de bário; **(viii) filtro de areia** e **(iv) descarte**, por emissário submarino, do efluente tratado (**Figura 30**).



**Figura 30.** Fluxograma esquemático do sistema de tratamento biológico de água de produção em terminais aquaviários de petróleo no Brasil.

O grande desafio desses sistemas foi a adaptação de um lodo biológico estável e operacionalmente eficiente para a remoção de amônia em salinidades mais elevadas (em torno de 45 a 55 g/L de NaCl) que da própria água do mar (35 g/L), uma vez que isso não foi possível de ser alcançado de forma convencional, ou seja, utilizando-se o descarte de lodo biológico de outras ETEs para a partida.

Essa partida convencional não foi possível na época pois, **(i)** não existia nenhuma outra ETE em condições salinas de tratamento biológico de água de produção; **(ii)** nem o lodo biológico de refinarias de petróleo, nem de estações de tratamento de esgoto, foram capazes de se adaptar eficientemente a tais condições de salinidade; e, **(iii)** dada a dimensão da ETE de um terminal, o volume mínimo de lodo necessário para tal partida era inviável em termos logísticos, econômicos e operacionais.

A **Figura 31** ilustra a dimensão dos reatores biológicos de uma ETE de tratamento de água de produção em terminais aquaviários de petróleo (SOUSA, 2017).



**Figura 31.** Reator biológico em fase de aerção de uma ETE de tratamento de água de produção em terminal aquaviário de petróleo (SOUSA, 2017).

Sendo assim, um amplo estudo de caracterização de diferentes lodos biológicos e estratégias de aclimação foram conduzidos em escala laboratorial e piloto, até se chegar a um processo que permitiu a construção das ETEs através de unidades industriais prévias para geração e aclimação de um inóculo de lodo biológico adaptado a maiores salinidades (QUARTAROLI et al., 2017a, 2017b; SILVA et al., 2018).

Atualmente existem duas ETEs com sistemas biológicos de tratamento em terminais aquaviários de petróleo, localizadas em São Sebastião (SP) e em Angra dos Reis (RJ), conforme ilustrado na **Figura 32** (TRANSPETRO, 2022).



**Figura 32.** Localização dos terminais aquaviários de petróleo, São Sebastião (SP) e Angra dos Reis (RJ) com sistema biológico de tratamento de água de produção (TRANSPETRO, 2022).

Ambas as ETEs operam, desde sua partida, atendendo eficientemente a remoção de amônia (com taxas bem próximas a 99%) e o enquadramento adequado do efluente final (amônia  $\leq 20$  mg/L para São Sebastião e  $\leq 5$  mg/L para Angra dos Reis), tratando assim, toda a água produzida transportada isoladamente por navios provenientes diretamente de plataformas nacionais.

Contudo, com o aumento contínuo da produção de petróleo na camada pré-sal, existe uma previsão de um aumento crescente nas concentrações salinas das águas de produção, que em alguns reservatórios pode atingir condições hipersalinas chegando até 290 mg/L de NaCl (ANDRADE et al., 2015; REBELLO; SIEPMAN; DREXLER, 2020). Isso poderá impactar significativamente o tratamento pela rota biológica. Por esse motivo, encontram-se em andamento projetos de P&D para prever os possíveis impactos desse aumento de salinidade e desenvolver alternativas tecnológicas para lidar com essa questão no futuro.

Esses estudos demonstraram até o momento, que com estratégias operacionais adequadas, o sistema biológico é capaz de garantir o tratamento, em concentrações salinas de até 140 g/L de NaCl, mantendo os níveis atuais de eficiência, através da aclimação e seleção de uma microbiota composta por microrganismos nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbios (NH/DA), adaptada e resistente a condições hipersalinas de até 200 g/L (SOUZA et al., 2022).

A remoção da amônia por microrganismos NH/DA têm a vantagem adicional de utilizar fontes de matéria orgânica, com isso, é possível remover, além da amônia, o carbono orgânico do efluente. Além disso, microrganismos NH/DA apresentam tolerância ao oxigênio tanto na etapa da nitrificação quanto na desnitrificação e, por isso, os mesmos microrganismos são capazes de realizar o processo completo de conversão da amônia a nitrogênio molecular (MARAZIOTI; KORNAROS; LYBERATOS, 2003; MATSUZAKA et al., 2003; ROBERTSON; KUENEN, 1983; SILVA et al., 2019; THIRD et al., 2005).

Nesse contexto, dada a sensibilidade e relevância dos sistemas biológicos de tratamento de água de produção, um estudo preliminar relevante deve buscar a avaliação de um potencial impacto da utilização do coquetel fágico em plataformas de petróleo sobre o processo de nitrificação. É relevante também, que este tipo de estudo considere ambos os cenários, o atual, com salinidades na faixa de 45 a 55 g/L de NaCl e um possível cenário futuro de tratamento de água hipersalinas, devido às águas produzidas do pré-sal com salinidades acima de 100 g/L de NaCl.

Tal como para a avaliação da ecotoxicidade e da biodegradabilidade citadas anteriormente, não foram encontradas quaisquer referências científicas que tenham avaliado bacteriófagos quanto ao seu impacto indireto em microbiotas industriais e/ou naturais do universo de aplicação proposto, sendo assim, quaisquer dados obtidos, ainda que preliminares, poderão direcionar estudos futuros mais detalhados.

### 3. **OBJETIVOS**

#### 3.1. **OBJETIVO GERAL**

Avaliar bacteriófagos: **(i) em sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (Loopings)**, visando sua ação sobre biofilmes pré-estabelecidos na superfície de cupons metálicos; e **(ii) quanto a possíveis impactos ambientais e operacionais** decorrentes de seu uso em campo.

#### 3.2. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (i) Selecionar um coquetel fágico com base em estudos e resultados laboratoriais já realizados e/ou em andamento, com foco na viabilidade do escalonamento da sua produção comercial e abrangência de aplicabilidade em campo na indústria do petróleo;
- (ii) Avaliar o efeito do coquetel fágico na redução de biofilmes (de culturas mistas de BRS, representativas de tanques de plataformas de petróleo críticos em geração de H<sub>2</sub>S e MIC), pré-estabelecidos em cupons de aço carbono, visando validar uma concentração de dosagem pré-selecionada;
- (iii) Avaliar a redução na geração de H<sub>2</sub>S pela utilização do coquetel fágico, visando estimar a redução no consumo de sequestrante de H<sub>2</sub>S;
- (iv) Avaliar a redução na taxa de corrosão do aço carbono pela utilização do coquetel fágico, visando considerar a extensão da vida útil de materiais e minimizar riscos de ocorrência de falhas, furos e vazamentos;
- (v) Avaliar o coquetel fágico quanto a potenciais impactos ambientais, do ponto de vista da ecotoxicidade e biodegradabilidade;
- (vi) Avaliar o coquetel fágico quanto a potenciais impactos operacionais, do ponto de vista da corrosividade e da inibição do processo biológico de tratamento da água de produção.

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAGEM

Amostragens de água de produção, para obtenção de inóculos microbianos representativos dos cenários de tanques de plataformas, foram realizadas em tanques de duas plataformas distintas, que apresentavam histórico de biocorrosão e geração biogênica de H<sub>2</sub>S.

A primeira amostragem foi realizada em um **tanque slop** de uma plataforma do tipo FPSO - *Floating Production Storage and Offloading* (**Figura 33**) e a segunda amostragem foi realizada em **tanques de armazenamento** de petróleo de uma plataforma do tipo FSO - *Floating Storage and Offloading* (**Figura 34**).

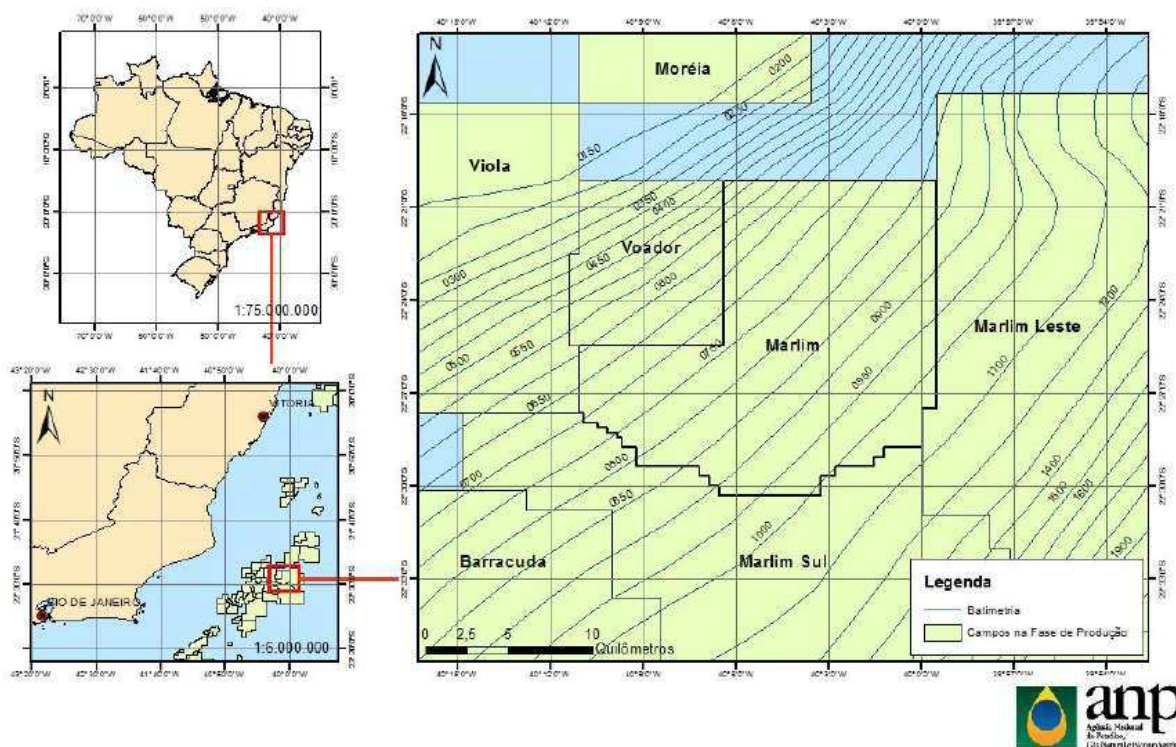


**Figura 33.** Plataforma do tipo FPSO (*Floating Production Storage and Offloading*), na qual foram coletadas amostras de um tanque slop para obtenção de inóculos microbianos (HEFTOS, 2021).



**Figura 34.** Plataforma do tipo FSO (*Floating Storage and Offloading*), na qual foram coletadas amostras de tanques de armazenamento de petróleo para obtenção de inóculos microbianos (TECHNOBRAS, 2021).

Estas plataformas operam no campo de Marlim, um campo gigante de águas profundas, descoberto na década de 1980 na Bacia de Campos, Rio de Janeiro, Brasil. O campo de Marlim se localiza a cerca de 110 km a leste do Cabo de São Tomé, no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro (**Figura 35**). A área abrange cerca de 257,63 km<sup>2</sup> distribuídos numa lâmina d'água média de 800 m, variando de 620 e 1.050 m. O reservatório se encontra a uma profundidade de 2.631 m e produz óleo entre 17 e 24° API, apresentando elevados índices de produtividade (ANP, 2016).



**Figura 35.** Mapa de localização do Campo de Marlim, Rio de Janeiro, Brasil (ANP, 2016).

Ambas as plataformas operam desde o início dos anos 2000, portanto, tratam-se de plataformas de um campo maduro, no qual os valores médios de BSW se encontram na ordem de 70 %.

A plataforma do tipo FPSO recebe a produção apenas dos poços conectados a ela, portanto a contaminação microbiana encontrada em seus sistemas de superfície provavelmente é proveniente dos próprios poços produtores e se intensifica no tanque *slop*, pois lá os microrganismos encontram condições mais favoráveis de proliferação em função das características operacionais inerentes a esse sistema.

Já a plataforma do tipo FSO recebe a produção de outras plataformas desse mesmo campo através de oleodutos. Portanto, a contaminação microbiana presente em seus tanques pode ser proveniente de diferentes unidades e dos próprios oleodutos, intensificando-se devido à proliferação dos microrganismos em função do tempo de residência e da recirculação entre os tanques de armazenamento conforme a dinâmica das atividades operacionais.

O petróleo de ambas as plataformas é escoado através de navios aliviadores e para realizar o procedimento operacional de *offloading*, ou seja, a transferência do petróleo da plataforma para o navio aliviador, é necessário enquadrar o H<sub>2</sub>S no óleo

ao limite de 5 ppm (mg/kg), utilizando produtos sequestrantes de H<sub>2</sub>S, sempre que necessário.

O monitoramento dos teores de H<sub>2</sub>S no petróleo é realizado a bordo como rotina, sempre precedendo o início da operação de *offloading*. O sequestrante de H<sub>2</sub>S é dosado durante a transferência do petróleo para o navio aliviador e a concentração dosada varia em função dos níveis de H<sub>2</sub>S observados nas análises e em função do tipo de sequestrante utilizado.

Para atender ao limite de enquadramento do H<sub>2</sub>S no petróleo, reduzir o consumo do sequestrante de H<sub>2</sub>S e minimizar os problemas de corrosão, existe uma rotina de aplicação de produto biocida à base de THPS específico para tanques de plataformas, que compreende a dosagem de 200 ppm do produto duas vezes por semana através das bombas de recirculação, para favorecer a mistura do produto na fase aquosa no fundo dos tanques.

As análises de rotina para monitoramento desses tanques, baseiam-se na medição do H<sub>2</sub>S tanto na fase aquosa, quanto na oleosa e, eventualmente, na gasosa. Contudo, não são realizadas análises microbiológicas de rotina, uma vez que o método de quantificação tradicional, a técnica do NMP - Número Mais Provável (COCHRAN, 1950), a qual encontra-se descrita com maiores detalhes no **APÊNDICE A**, não pode ser realizada a bordo e seu tempo de resposta para microrganismos anaeróbicos é de 28 dias (incubação), de modo que estes resultados não podem ser utilizados de imediato para a tomada de decisão de ações operacionais na plataforma.

Para este estudo foram utilizadas: **(i)** uma amostra única, coletada de um tanque *slop* da plataforma do tipo FPSO e **(ii)** duas amostras únicas, de tanques de armazenamento de petróleo da plataforma do tipo FSO, sendo uma de um tanque central e uma de um tanque a bombordo. Para a coleta, foram selecionados os tanques que se encontravam com maior volume de água e com o maior intervalo de tempo desde a última dosagem de biocida (2 a 3 dias).

As amostras foram coletadas em frascos de polietileno autoclaváveis estéreis. Os frascos foram enchidos por completo, de modo a manter o menor espaço livre (*headspace*) possível e foram imediatamente fechados com batoque e tampa rosqueável com lacre, a fim de minimizar o ingresso de O<sub>2</sub> e a contaminação da amostra durante o transporte.

As amostras foram obtidas a partir da fase aquosa no fundo dos tanques e o primeiro volume de água foi descartado antes do preenchimento dos frascos a fim de evitar a amostragem da água estagnada na tubulação.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo e enviadas por transporte aéreo da plataforma até o aeroporto, e de lá elas seguiram para a unidade operacional, de modo a serem processadas em um intervalo de no máximo 48 horas após o momento da coleta.

O processamento das amostras consiste na inoculação em kits de quantificação microbiológica pela técnica do NMP e posterior utilização dos frascos com cultivos ativos para obtenção de inóculos.

#### **4.2. QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS**

Conforme citado anteriormente, as metodologias convencionais de detecção e quantificação de microrganismos na indústria do petróleo empregam a técnica do NMP, baseada em cultivo (**APÊNDICE A**).

Essas análises devem ser realizadas no intervalo de até 48 h após a coleta e as amostras devem ser mantidas sob refrigeração ao longo de todo o tempo para minimizar alterações significativas da comunidade microbiana e garantir a análise comparativa dos resultados do monitoramento.

Neste estudo, empregou-se a técnica do NMP para quantificar quatro grupos microbianos comumente avaliados nos cenários de plataformas de petróleo: **(i)** Bactérias Redutoras de Sulfato Mesófilas (BRS-m); **(ii)** Bactérias Redutoras de Sulfato Termófilas (BRS-t); **(iii)** Bactérias Anaeróbicas Heterotróficas Totais (BANHT) e **(iv)** Bactérias Produtoras de Ácidos Anaeróbicas (BPA-a). A descrição da composição e preparo dos respectivos meios de cultivo, soluções e protocolos de leitura encontram-se detalhados no **APÊNDICE A**.

Todos os tanques coletados já apresentavam dados de quantificações de BRS-m e BANHT realizados pela unidade operacional. Na amostragem em tanque *s/op* foi feita novamente a quantificação tanto de BRS-m quanto de BANHT, enquanto na amostragem dos tanques de armazenamento de petróleo, foram feitas as quantificações de BRS-m, BRS-t e BPA-a.

### 4.3. INÓCULOS MICROBIANOS

Após o período de incubação dos kits de quantificação das amostras coletadas, os frascos que apresentaram crescimento foram transferidos para reatores de propagação de inóculos, conforme descrito no **APÊNDICE A**, contendo seu respectivo meio de cultura.

As culturas crescidas nos kits de quantificação das amostras dos dois tanques de armazenamento da plataforma tipo FSO foram misturadas, de modo a se obter um único inóculo de cada plataforma para cada meio de cultura.

Estes inóculos foram mantidos em incubação e realimentação constante (mensalmente) para serem utilizados como inóculos de referência de seus respectivos cenários operacionais para vários estudos com diferentes objetivos, principalmente na qualificação de novos produtos biocidas comerciais e na avaliação de antimicrobianos em desenvolvimento, incluindo o estudo aqui descrito.

### 4.4. SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO

Foram pré-selecionados quatro fagos para compor o coquetel fágico utilizado nos ensaios realizados na UFV em sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (comumente denominados de *Loopings*).

Esses ensaios foram denominados neste trabalho de: “**segundo estudo com bacteriófagos em *Looping* (novos sistemas da UFV)**” e serão apresentados com detalhes mais adiante, a partir do **item 4.5.2**.

Isso se deve ao fato de que previamente a estes ensaios na UFV, foi realizado um estudo em um sistema de *Looping* no CENPES, o qual serviu de base para a seleção do coquetel fágico supracitado e será apresentado com detalhes neste trabalho a partir do **item 4.5.1**. e que, portanto, recebeu a denominação de: “**primeiro estudo com bacteriófagos em *Looping* (sistema CENPES)**”.

A pré-seleção desses fagos levou em consideração os 3 critérios principais listados abaixo (os quais serão discutidos de modo mais aprofundado, no **item 6.2**):

- (i) concepção conceitual de um produto comercial com maior potencial de performance em condições operacionais reais;
- (ii) premissas de escalonamento para a viabilidade comercial;

(iii) maturidade dos resultados de atividades de P&D aplicadas, obtidos em diversos estudos prévios e em andamento no LIVM, sobretudo quanto à triagem e avaliação do desempenho dos fagos em culturas mistas de BRS representativas da indústria do petróleo, bem como no “primeiro estudo com bacteriófagos em *Looping* (sistema CENPES), já citado.

Quanto à produção dos fagos, encontram-se em andamento no LIVM estudos específicos para avaliar a otimização e o escalonamento da produção, dentre os quais, um estudo preliminar que determinou as melhores condições de produção para um dos fagos do coquetel utilizado neste estudo (SILVA, 2019).

Portanto, todos os demais fagos do coquetel foram produzidos nas condições ótimas pré-estabelecidas no estudo supracitado, podendo no futuro a produção de cada fago ser adequada em função da evolução dos resultados de otimização e escalonamento.

Sendo assim, a produção dos quatro fagos, foi realizada em biorreatores de 5 L, sob agitação, em bateladas de 5 h, a 30 °C, em meio de cultura LB - Luria Bertani (NaCl 10 g/L, peptona 10 g/L, extrato de levedura 5g/L). Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado (8.000 xg por 10 min), o sobrenadante filtrado (0,22 µm) e a suspensão contendo os fagos foi diluída e titulada para determinação da concentração viral em UFP/ml conforme equação abaixo.

$$\text{UFP/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de placas de lise} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume da alíquota plaqueada}}$$

Por fim, os fagos foram armazenados sob refrigeração a 4°C, considerando 3 meses como limite máximo de tempo para sua utilização, um parâmetro conservativo, definido em função de estudos de viabilidade e tempo de prateleira em andamento.

#### **4.5. SISTEMAS PILOTO LABORATORIAIS DE FLUXO DINÂMICO (LOOPINGS)**

Um sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico (*Looping*) consiste em um circuito de tubulações contendo múltiplas entradas para corpos de prova (cupons metálicos), os quais têm por objetivo servir de superfície representativa para o crescimento e estabelecimento de biofilmes de interesse e que podem ser coletados ao final, ou ao longo do tempo dos ensaios, para a realização de diversas análises.

Em estudos de biocorrosão e geração biogênica de H<sub>2</sub>S, a experimentação em um *Looping* representa a **etapa mais importante e representativa** da dinâmica de formação de biofilmes em superfícies metálicas e avaliação do desempenho de produtos e/ou processos de controle de contaminações microbianas, que se pode obter em escala laboratorial para qualquer cenário operacional, uma vez que:

- (i) permite a formação de um biofilme maduro fortemente aderido ao cupom, devido à força de cisalhamento aplicada pelo fluido em fluxo baixo e contínuo;
- (ii) permite o acompanhamento contínuo de parâmetros físico-químicos mais representativos em função de sensores normalmente instalados diretamente no sistema;
- (iii) permite avaliar o desempenho de produtos antimicrobianos em diferentes níveis de contaminação e níveis equivalentes aos operacionais;
- (iv) permite a coleta e análise dos cupons ao longo do tempo, sem interromper ou causar grandes perturbações no sistema;
- (v) possibilita a realização de experimentos de longa duração.

Condições estas que dificilmente são viáveis em ensaios estáticos, de pequena escala, amplamente empregados por laboratórios de microbiologia. Contudo, poucas instituições possuem sistemas desse tipo, disponíveis e adequados à avaliação microbiológica associada à biocorrosão e à geração de H<sub>2</sub>S na indústria do petróleo.

Neste trabalho foi realizado um primeiro estudo para avaliar o efeito de um coquetel fágico sobre um biofilme pré-formado em um sistema de *Looping* já existente no CENPES.

A partir dos resultados obtidos, um novo sistema de *Looping* foi projetado, com o objetivo de ampliar e otimizar as funcionalidades do sistema previamente existente e implantar dois sistemas de *Loopings* na UFV dedicados ao desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos, de modo que pudessem ser operados em paralelo (ex.: um como controle e outro como tratamento), os quais foram utilizados no segundo estudo em *Looping* realizado neste trabalho.

#### **4.5.1. Primeiro estudo com bacteriófagos em Looping (sistema CENPES)**

O primeiro estudo com fagos em um sistema de *Looping* realizado no equipamento do CENPES (**Figura 36**) foi feito com o objetivo de avaliar o efeito de

um coquetel fágico sobre um biofilme pré-formado a partir de uma cultura mista de BRS obtida das amostras coletadas do tanque *slop* da plataforma do tipo FPSO.



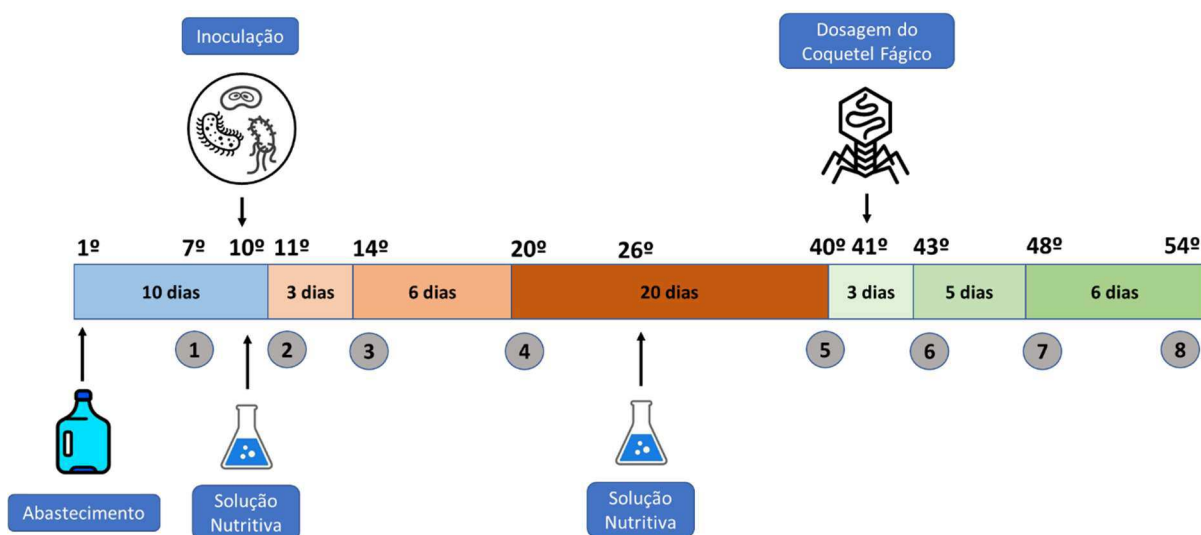
**Figura 36.** Sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico (*Looping*) do CENPES utilizado no primeiro estudo de avaliação do efeito de um coquetel fágico em biofilmes mistos de BRS de tanque *slop* de plataforma do tipo FPSO.

O sistema de *Looping* do CENPES apresenta as seguintes características:

- (i) velocidade de fluxo baixa, abaixo de 1,0 m/s, ideal para favorecer a adesão microbiana e formação do biofilme;
- (ii) volume útil de aproximadamente 8 L;
- (iii) controle de temperatura do fluido em circulação por manta de aquecimento;
- (iv) sistema de purga com gás nitrogênio para condicionamento do circuito e manutenção do fluido circulante em condições anóxicas ( $O_2$  abaixo de 1 ppm);
- (v) monitoramento dos seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e potencial redox (ORP), através de sensores instalados diretamente em contato com o fluido circulante;
- (vi) suportes individuais para até 77 cupons metálicos instalados na geratriz inferior das tubulações;
- (vii) um pequeno trecho da tubulação em acrílico, onde é possível acompanhar visualmente a adesão ou remoção do biofilme ao longo do experimento.













Este primeiro estudo foi conduzido ao longo de aproximadamente 2 meses, com retirada de cupons em 8 tempos diferentes, sendo 5 tempos (pré-fagos) antes da dosagem do coquetel fágico, com o objetivo de avaliar a formação do biofilme e garantir o estabelecimento de um biofilme maduro, estável e fortemente aderido aos cupons; e, 3 tempos (pós-fagos) após uma única dosagem do coquetel fágico, com o objetivo de avaliar seu efeito na remoção do biofilme pré-formado.

A **Figura 37** e a **Tabela 9** apresentam as etapas do experimento, o intervalo de tempo entre as amostragens dos cupons e as atividades realizadas a cada dia relevante.



**Figura 37.** Etapas experimentais do primeiro estudo realizado no sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico (*Looping*) do CENPES, demonstrando os intervalos de tempo entre as amostragens dos cupons metálicos. Os números ordinais representam os dias do experimento e os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

**Tabela 9.** Principais atividades realizadas a cada dia relevante do primeiro estudo no sistema piloto laboratorial de fluxo dinâmico (*Looping*) do CENPES.

Dia		Atividades
1°		O <i>Looping</i> foi abastecido com a água mar natural, a qual foi desaerada no próprio sistema e permaneceu em recirculação por 10 dias, antes da inoculação das culturas, para comissionamento e verificação da estabilidade dos parâmetros físico-químicos;
7°		Os cupons de nº 1 foram amostrados;
10°		O <i>Looping</i> foi inoculado com as culturas microbianas na proporção de 10 % do volume útil do <i>Looping</i> , as quais foram previamente quantificadas por NMP e foi dosada solução nutritiva na proporção de 1 % do volume útil do <i>Looping</i> ;
11°		Os cupons de nº 2 foram amostrados;
14°		Os cupons de nº 3 foram amostrados;
20°		Os cupons de nº 4 foram amostrados;
26°		A solução nutritiva foi dosada na proporção de 1 % do volume útil do <i>Looping</i> ;
40°		Os cupons de nº 5 foram amostrados;
41°		O coquetel fágico foi dosado na concentração de $10^9$ UFP/ml;
43°		Os cupons de nº 6 foram amostrados;
48°		Os cupons de nº 7 foram amostrados;
54°		Os cupons de nº 8 foram amostrados;

O coquetel fágico foi constituído por 4 fagos da Coleção de Vírus Bacterianos do LIVM isolados na linhagem bacteriana *Escherichia coli* 30, pertencente à Coleção de Microrganismos do LIVM. Todos estes fagos foram isolados a partir de amostras

ambientais, de água de rio, coletadas no Ribeirão São Bartolomeu, na própria cidade de Viçosa e pertencem à classe Caudoviricetes, Família Straboviridae (antiga ordem Caudovirales, Família Myoviridae).

Como dosagem do coquetel fágico, foram utilizados 50 ml do coquetel produzido na concentração de  $1,0 \times 10^{12}$  UFP/ml. Portanto, a concentração de fagos efetivamente dosada, que permaneceu em circulação inicialmente no *Looping*, foi de, aproximadamente,  **$6,25 \times 10^9$  UFP/ml**.

Utilizaram-se cupons de aço carbono C 1020 com 1,0 cm de diâmetro e 0,3 cm de espessura, previamente jateados e esterilizados, conforme padrão de execução descrito no **APÊNDICE A**.

Os cupons foram encaixados em seus respectivos suportes, de modo que apenas uma de suas faces ficou em contato com o fluido, faceando a superfície da tubulação. Portanto, a área superficial do cupom para cálculo do NMP do biofilme foi de  $0,785 \text{ cm}^2$  (Área =  $\pi \times \text{raio}^2 = 3,14 \times 0,5^2$ ).

Para a formação do biofilme foram utilizadas como inóculo as culturas de BRS-m e BANHT obtidas da amostragem do tanque *slop* da plataforma do tipo FPSO. No 10º dia do experimento, inoculou-se um volume de aproximadamente 800 ml (10 % do volume útil do *Looping*), contendo 50 % da cultura de BRS-m e 50 % da cultura de BANHT, previamente crescidas após um repique de 10 % e 72 h, para manter a cultura com boa atividade e em fase de crescimento exponencial.

Juntamente com o inóculo, o sistema foi alimentado com um volume de 10 ml (aproximadamente 1 % do volume útil do *Looping*) de solução nutritiva redutora (**APÊNDICE A**), para estimular o crescimento do inóculo e acelerar a formação do biofilme.

Como fluido de teste foi utilizada água do mar natural coletada em ambiente de baixa influência antrópica (Praia de Grumari, Rio de Janeiro - RJ), portanto com baixo residual de matéria orgânica e ausência de contaminantes químicos e patogênicos.

Essa água foi previamente filtrada (em membranas de  $0,45 \mu\text{m}$  de diâmetro de poro), para remoção de areia e demais particulados e mantida sob refrigeração em câmara fria ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ) até sua utilização, quando foi então desaerada com purga de  $\text{N}_2$ . A reposição de água no *Looping* foi realizada a cada amostragem de cupons para manutenção do volume útil.

Ressalta-se que, no caso deste estudo, a água do mar não foi previamente esterilizada, de modo que ela contribuiu com o aporte inicial de microrganismos ao sistema para acelerar o crescimento e reduzir o tempo de formação do biofilme.

Ao longo do experimento, além do acompanhamento das análises físico-químicas (temperatura, pH, OD e ORP) pelos sensores do próprio sistema, foram coletadas amostras do fluido para realização das análises de quantificação do teor de H<sub>2</sub>S dissolvido, através do método de titulação potenciométrica (**APÊNDICE A**) e quantificações de BRS-m e BANHT, pela técnica do NMP.

Os cupons coletados ao longo do tempo também foram quantificados em duplicata e realizadas as análises de quantificação de BRS-m e BANHT pela técnica do NMP e foram preservados para realização de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria óptica com determinação da rugosidade média quadrática – Rq (µm), conforme **APÊNDICE A**, totalizando 32 cupons.

Após a retirada do último conjunto de cupons no tempo 8, o sistema ainda permaneceu em circulação por um período de aproximadamente 5 meses e foi acompanhado mensalmente quanto à detecção qualitativa de BRS-m, pelo método de determinação da atividade de BRS (**APÊNDICE A**) e teores de H<sub>2</sub>S dissolvido no fluido, tendo sido feita a reposição de água do mar desaerada e a dosagem com solução nutritiva na proporção de 1 % do volume útil do *Looping* após cada retirada de amostra.

#### **4.5.2. Segundo estudo com bacteriófagos em Looping (novos sistemas UFV)**

A partir dos resultados obtidos no primeiro estudo do efeito dos fagos sobre biofilmes no *Looping* do CENPES, um novo sistema de *Looping* foi projetado em parceria com a UFV, com o objetivo de ampliar e otimizar as funcionalidades do sistema existente e implantar *Loopings* de modo a permitir a realização de ensaios dedicados a estudos com bacteriófagos.

Os novos *Looping* projetados contaram com a parceria da empresa DFELX - Desenvolvimento e Fabricação de Equipamentos para Laboratório LTDA (DFELX, 2012), que elaborou, construiu e montou o equipamento. Dois equipamentos idênticos foram fabricados e instalados em um novo espaço do LIVM, com o objetivo de realizar ensaios em paralelo, sendo um como controle e o outro como tratamento (**Figura 38**).



**Figura 38.** Sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Looping*) instalados no novo espaço do LIVM da UFV, projetados e construídos para a realização de ensaios de desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos para controle de biofilmes e BRS na indústria do petróleo em parceria do CENPES com a UFV.

Além das características básicas de um *Looping* conforme citadas anteriormente, outras características foram acrescentadas aos novos *Loopings* projetados visando ampliar e otimizar suas funcionalidades. As principais foram:

- (i) maior quantidade de cupons (cada *Looping* possui capacidade de instalação de até 400 cupons), para permitir a realização de diferentes análises além das convencionais análises de quantificação por NMP, tais como MEV, perfilometria óptica, perda de massa e caracterização da diversidade microbiana utilizando técnicas de biologia molecular, as quais demandam uma quantidade grande de cupons para extração de quantidade suficiente de DNA do biofilme;
- (ii) facilidade de coleta dos cupons, de modo a permitir uma amostragem rápida após a retirada do suporte dos cupons de dentro da tubulação, reduzindo os riscos de interferência no biofilme pela exposição ao ambiente e perda ou contaminação da biomassa devido à manipulação no momento da coleta;
- (iii) possibilidade de coleta independente dos cupons, ou seja, um determinado trecho contendo cupons pode ser fechado por válvulas e coletado de modo que o restante do sistema permaneça em circulação reduzindo significativamente as interferências no sistema devido à coleta;

- (iv) otimização do sistema de purga com gás nitrogênio, para garantir a manutenção das condições anóxicas durante todo o período do experimento, incluindo no momento da coleta dos cupons e posterior condicionamento dos trechos onde os cupons foram coletados. Para isso, foram instalados engates rápidos para a purga em todos os trechos;
- (v) permitir futuros ensaios de longa duração (6, 12, 18, 24 meses ou até mais) devido ao maior número de cupons, além das demais características já citadas.

Estes novos *Loopings* são compostos por tubulações de 3/4 de polegada (19,5 mm de diâmetro interno) e foram projetados para manter uma velocidade de fluxo constante ao longo de todos os segmentos da tubulação, não permitindo retorno ou estagnação em nenhum ponto, mesmo operando com uma velocidade baixa (menor que 1,0 m/s), para favorecer a formação e estabelecimento de um biofilme fortemente aderido e o mais equitativo possível em todos os trechos com cupons.

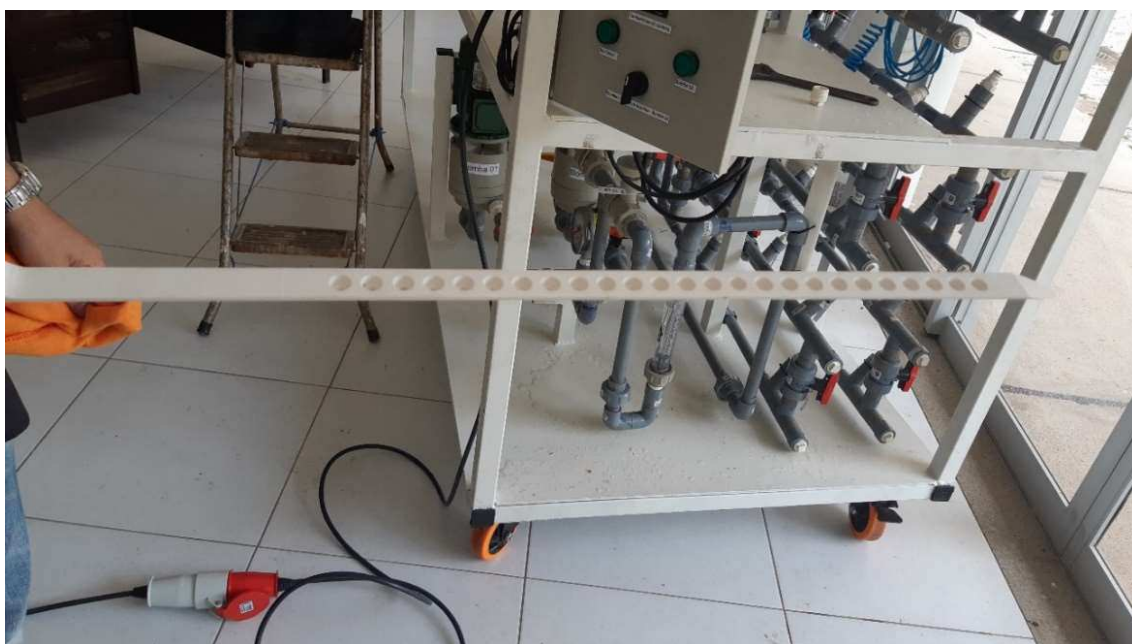
Os sistemas possuem sensores em linha para o monitoramento dos seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, pH e OD. Eles também contam com um sistema de purga de gás nitrogênio para desaeração e comissionamento dos sistemas e do fluido de teste, tanto no momento da partida, quanto ao longo da execução do ensaio, bem como, durante os procedimentos de coleta dos cupons e realimentação dos sistemas.

Cada trecho da tubulação onde se encontram os cupons possui engates rápidos para a purga do nitrogênio (**Figura 39**) de modo que a purga pode ser rapidamente desconectada de um engate e conectada em qualquer outro sem que a tubulação precise ser aberta em nenhum momento, minimizando assim grandes contaminações do sistema pela entrada de oxigênio.

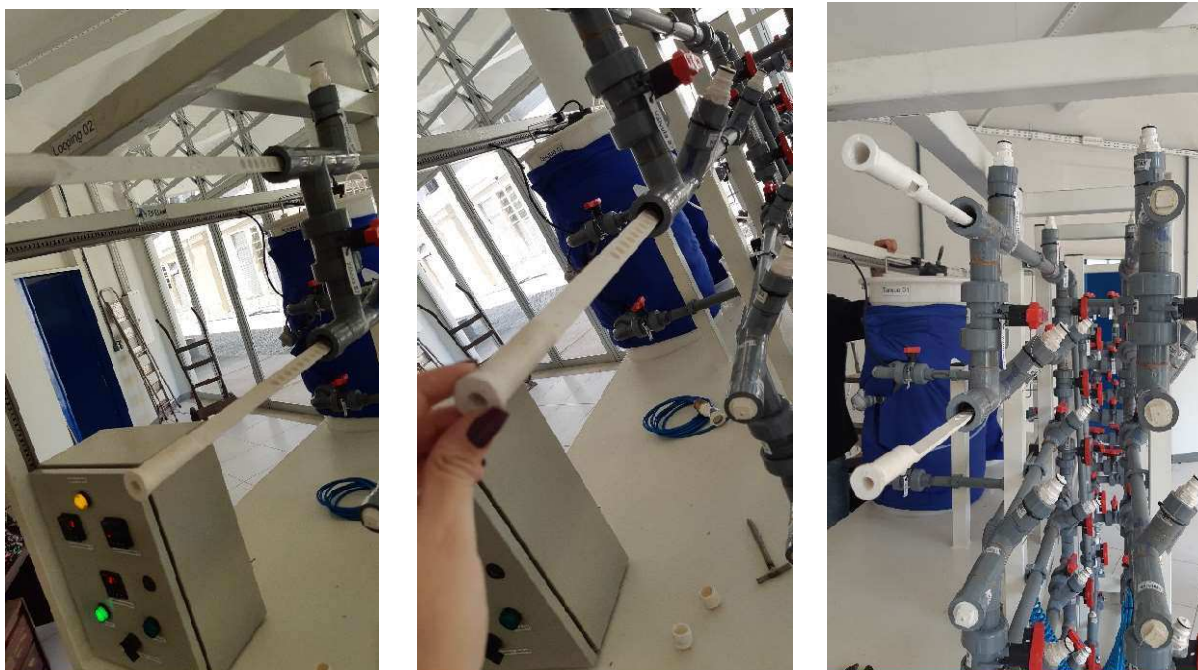


**Figura 39.** Sistema de purga de gás nitrogênio por engate rápido nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV. **(A)** Engate em cada um dos trechos da tubulação que contêm os cupons. **(B)** Detalhe do engate rápido.

Cada *Looping* possui entrada para um total de 400 cupons no formato redondo com 0,9 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura. Esses cupons são encaixados em um suporte denominado “régua” (**Figura 40**). Cada régua é acondicionada em um segmento independente da tubulação do *Looping* (**Figura 41**), sendo que cada um desses segmentos pode ser fechado durante o ensaio para permitir a coleta dos respectivos cupons ali instalados sem interromper o fluxo no restante do sistema. Cada régua possui encaixe para 25 cupons, totalizando, portanto, 16 régua.

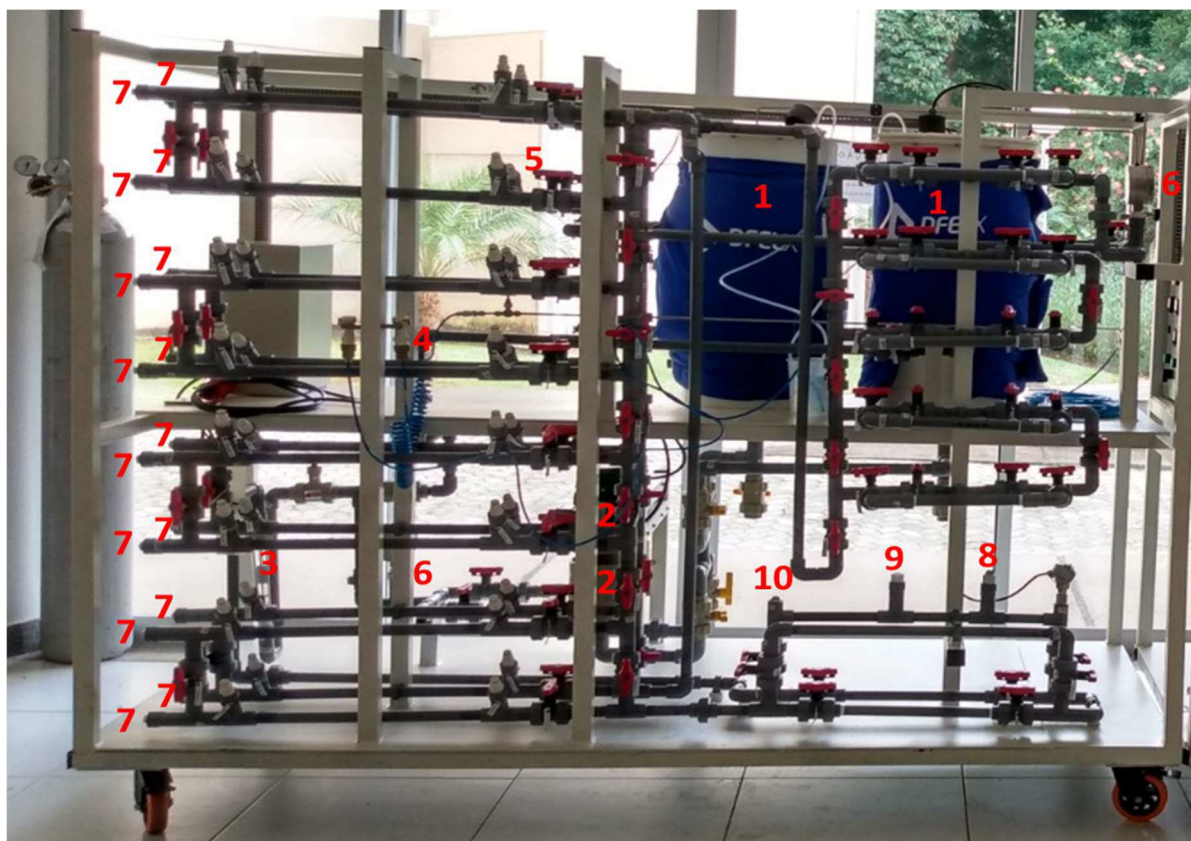


**Figura 40.** Suporte (“régua”) para o encaixe dos cupons de 0,9 cm de diâmetro nas tubulações dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) instalados na UFV.



**Figura 41.** Entradas dos suportes (“réguas”) dos cupons nas tubulações dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV.

O volume útil total de cada *Looping* é de aproximadamente 150 L, sendo 140 L referente a dois tanques de alimentação de 70 L cada, os quais podem ser utilizados individualmente ou em conjunto para facilitar eventuais intervenções operacionais do ensaio, e os 10 L restantes referem-se ao volume útil do circuito de tubulações. A **Figura 42** apresenta a configuração e posição dos principais componentes do *Looping*.



**Figura 42.** Configuração e posição dos principais componentes dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) instalados na UFV: (1) tanques, (2) bombas, (3) fluxômetro, (4) sistema de purga de N<sub>2</sub>, (5) válvulas de controle do fluxo, (6) manômetros, (7) entradas dos suportes ("régua") dos cupons, (8, 9 e 10) conexões para inserção dos sensores de pH, oxigênio dissolvido ou condutividade.

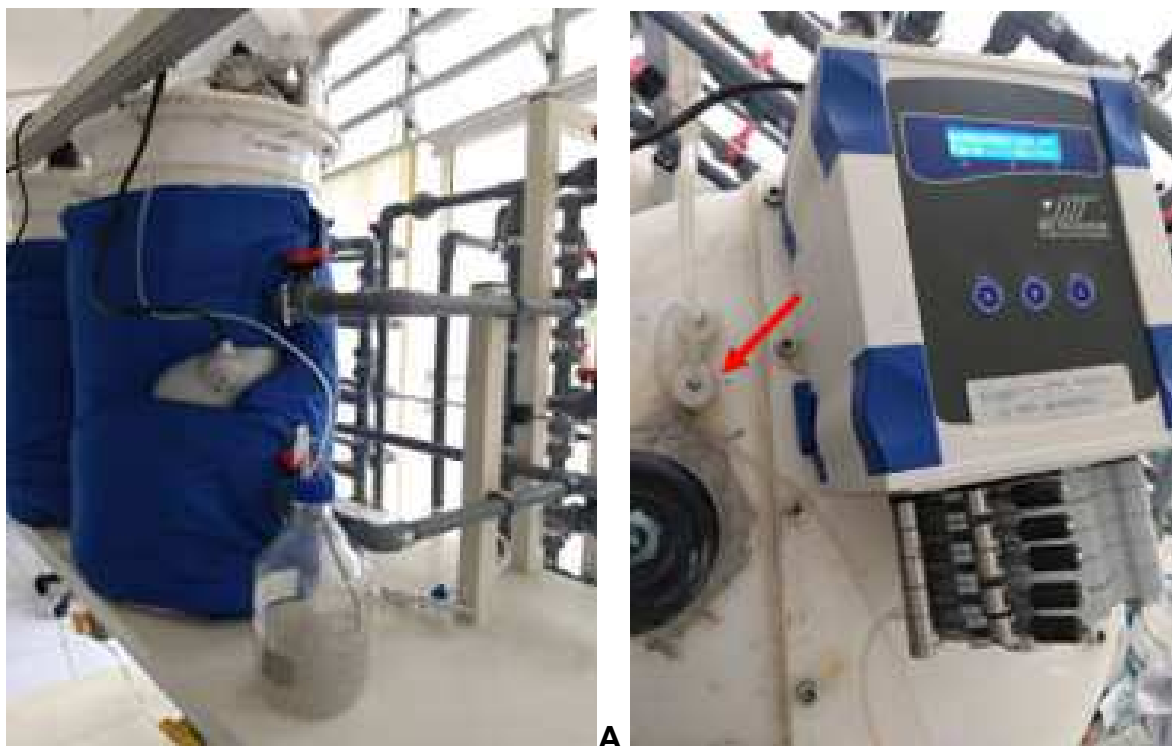
Com o objetivo de avaliar as condições operacionais e a dinâmica do crescimento da cultura microbiana no sistema, bem como testar os procedimentos experimentais, analíticos e de monitoramento, foi executado um ensaio biótico nos *Loopings* da UFV, já com a dosagem do coquetel fágico pré-selecionado.

Sendo assim, foram utilizados os dois sistemas de *Looping*, um operando como Controle, no qual não foi feita a dosagem do coquetel fágico e outro operando como Tratamento, no qual o coquetel fágico foi dosado após o estabelecimento do biofilme.

O estudo foi conduzido ao longo de aproximadamente 2 meses (57 dias), com retirada de cupons em 2 tempos diferentes (42º e 57º dias), compreendendo uma fase pré-inoculação (até o 6º dia) para comissionamento e estabilização dos parâmetros físico-químicos e uma fase pós-inoculação, do 6º ao 57º dia.

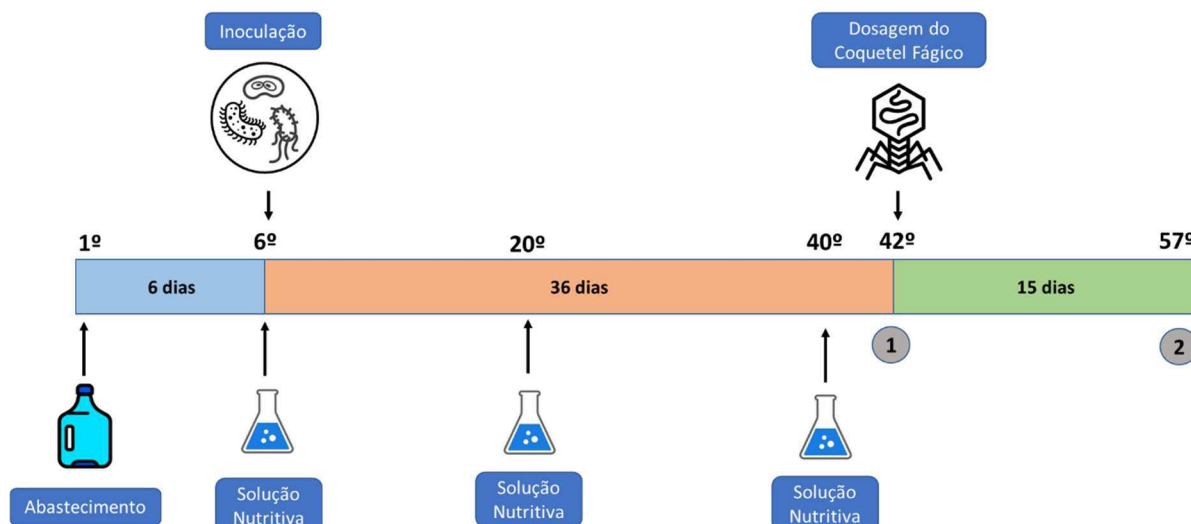
A fase pós-inoculação se iniciou com a inoculação (**Figura 43**) da cultura microbiana para crescimento e formação do biofilme (6º dia), posteriormente foi feita a 1ª coleta de cupons (pré-fagos) seguida da dosagem do coquetel fágico (42º dia); e,

por fim foi feita a 2ª coleta de cupons (pós-fagos) ao final desse período (57º dia). O coquetel fágico pré-selecionado foi dosado na concentração de  $1,0 \times 10^7$  UFP/ml.



**Figura 43.** (A) Inoculação da cultura de BRS no tanque do *Looping* por meio de uma bomba peristáltica. (B) Local de entrada (seta vermelha) da mangueira de inoculação da cultura de BRS na tampa do tanque do *Looping*.

A **Figura 44** e a **Tabela 10** apresentam as etapas deste experimento e o intervalo de tempo entre as atividades realizadas a cada dia relevante.



**Figura 44.** Etapas experimentais do estudo preliminar realizado nos novos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (*Loopings*) da UFV, demonstrando os intervalos de tempo entre as principais atividades realizadas. Os números ordinais representam os dias do experimento e os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

**Tabela 10.** Principais atividades realizadas no estudo preliminar realizado nos novos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmico (*Loopings*) da UFV.

Dia		Atividades
1º		Os <i>Loopings</i> foram abastecidos com a água mar natural, a qual foi desaerada no próprio sistema e permaneceu em recirculação por 6 dias, antes da inoculação da cultura, para comissionamento e verificação da estabilidade dos parâmetros físico-químicos;
6º		Os <i>Loopings</i> foram inoculados com a cultura microbiana na proporção de 5 % do volume útil do <i>Looping</i> e foi dosada solução nutritiva também na proporção de 5 % do volume útil;
20º		A solução nutritiva foi dosada na proporção de 5 % do volume útil do <i>Looping</i> ;
40º		A solução nutritiva foi dosada na proporção de 5 % do volume útil do <i>Looping</i> ;
42º		Os cupons de nº 1 (pré-fagos) foram amostrados e em seguida o coquetel fágico foi dosado na concentração de $10^7$ UFP/ml;
57º		Os cupons de nº 2 (pós-fagos) foram amostrados.

O comissionamento dos *Loopings* da UFV também foi realizado com água do mar natural (Praia de Grumari, Rio de Janeiro - RJ), a qual foi filtrada (membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro) para remoção de areia e demais particulados e mantida sob refrigeração em câmara fria ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) até sua utilização.

Devido ao uso da água do mar natural como fluido de teste, apenas um tanque de cada *Looping* foi utilizado neste estudo, de modo a minimizar a obtenção, manutenção e manipulação de grandes volumes para ensaios, totalizando assim, cerca de 70 L de água do mar para cada *Looping*.

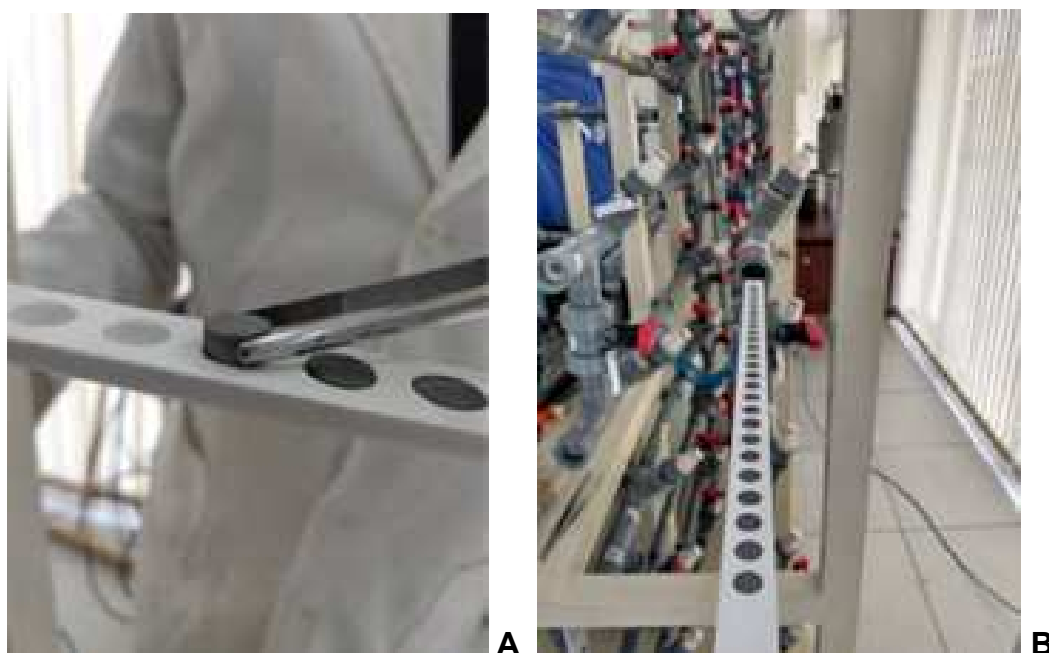
Neste estudo, os sistemas de *Looping* operaram com uma vazão em torno de 50 L/h ( $1,4 \text{ m}^3/\text{s}$ ), o que corresponde a uma velocidade de fluxo de aproximadamente  $0,05 \text{ m/s}^{(1)}$ , (**Figura 45A**). A temperatura de operação foi ajustada para  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  em ambos os *Loopings* (**Figura 45B**).



**Figura 45.** Controle de vazão e de temperatura dos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV. **(A)** Fluxômetro indicando (seta vermelha) a vazão de 50 L/h. **(B)** Painel de controle indicando (seta vermelha) o controle de  $30^{\circ}\text{C}$  no tanque em operação.

(1) Vazão ( $Q$ ) = velocidade ( $v$ ) x Área ( $A$ )  $\rightarrow v = Q/A \rightarrow v = 0,000014/0,0003 = 0,046 \text{ m/s}$   
 Área ( $A$ ) =  $\pi \times \text{raio} (r)^2 \rightarrow A = 3,1416 \times (9,75 \times 9,75) \rightarrow A = 0,0003 \text{ m}^2$   
 Diâmetro ( $D$ ) =  $2 \times \text{raio} (r) \rightarrow r = D/2 \rightarrow r = 19,5/2 \rightarrow 9,75 \text{ mm}$

Foram utilizados cupons de aço carbono X65 jateados e previamente esterilizados, antes de serem introduzidos nos sistemas, conforme procedimento detalhado no **APÊNDICE A**. A seguir, os cupons foram encaixados nas “réguas” com auxílio de uma pinça (**Figura 46A**) e, por fim, as régua foram introduzidas na tubulação dos *Loppings* (**Figura 46B**). Foram utilizadas 2 “régua” neste experimento, uma coletada no 42º dia (antes da dosagem do coquetel fágico) e a outra no 57º dia (último tempo de ensaio).



**Figura 46.** Preparo dos suportes (“régua”) de cupons para início dos ensaios nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV. **(A)** Inserção dos cupons de aço carbono X65 nos orifícios da “régua”. **(B)** “Régua” preenchida com os cupons sendo inserida na tubulação do *Looping*.

Inicialmente, os sistemas foram sanitizados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5%, em seguida permaneceram em circulação por 48h com água de abastecimento público para remoção do residual de NaClO. Então foram esvaziados e purgados com gás N<sub>2</sub>, para finalmente serem abastecidos com a água do mar natural, mantendo-se a purga de N<sub>2</sub>.

Previamente ao início efetivo dos ensaios, os sistemas permaneceram em comissionamento apenas com recirculação e desaeração da água, para verificação de vazamento e regulação da vazão, por cerca de uma semana.

A partir do 1º dia de ensaio, ao longo dos 6 primeiros dias (fase pré-inoculação), os *Loppings* permaneceram em operação apenas para monitoramento dos

parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e OD) a fim de se estabilizar os sistemas. A purga de nitrogênio foi mantida por cerca de 8 h/dia para redução dos níveis de OD de modo a ser mantido abaixo de 1 ppm (mg/L).

No 6º dia, os *Loopings* foram inoculados com uma cultura de BRS correspondente a 5% do volume útil do sistema e alimentados com solução nutritiva 20X (**APÊNDICE A**) desaerada em purga de N<sub>2</sub>, também a 5% do volume útil, para dar início à formação do biofilme (fase pós-inoculação).

Nesses ensaios, foi utilizado como inóculo apenas a cultura mista enriquecida para BRS-m da amostra de tanque de armazenamento de petróleo da plataforma do tipo FSO, uma vez que o cenário de tanques de plataforma é considerado mais representativo da criticidade de geração biogênica de H<sub>2</sub>S e biocorrosão, bem como do cenário de aplicação proposto para o primeiro teste piloto em campo com um coquetel fágico.

A cultura foi previamente repicada em meio de cultura Postgate E modificado (**APÊNDICE A**), em base água do mar natural, sem ágar-ágar e sem sulfato de ferro, 7 dias antes da inoculação nos *Loopings*. Um repique de 10% da cultura foi transferido (e mantido até a inoculação) em câmara de anaerobiose (**Figura 47A**) sob atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> e 80% de N<sub>2</sub>, para 2 frascos do tipo *Schott* contendo o mesmo meio de cultura (**Figura 47B**), de modo a obter o equivalente aos 5% do volume útil (3,5 L para cada *Looping*), visando uma concentração mínima de BRS em torno de 10<sup>4</sup> NMP/ml no fluido circulante.



**Figura 47.** (A) Câmara de anaerobiose (Whitley A95) e (B) repique da cultura de BRS utilizadas para preparo do inóculo e inoculação nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV.

Após a inoculação, ao longo de pouco mais de 1 mês (36 dias), ambos os sistemas operaram exatamente sob as mesmas condições para proporcionar o crescimento dos microrganismos e a formação do biofilme. Nesse período a solução nutritiva foi dosada novamente a 5% (v/v) ao 20º e 40º dias.

No 42º dia o coquetel fágico foi dosado no *Looping* do ensaio Tratamento e os sistemas permaneceram em operação até o 57º dia. Previamente à dosagem dos fagos, a primeira “régua” de cada *Looping* foi coletada para a retirada dos cupons e ao final dos ensaios, no 57º dia, a segunda “régua” foi retirada de cada *Looping*.

O coquetel fágico utilizado nos ensaios nos *Loopings* da UFV, também foi constituído por 4 fagos da Coleção de Vírus Bacterianos do LIVM, pertencentes à classe Caudoviricetes, Família Straboviridae (antiga ordem Caudovirales, Família Myoviridae). Entretanto, nesse segundo estudo, o coquetel foi composto por 3 fagos isolados na *E. coli* 30 e um fago isolado em *Enterobacter cloacae* ATCC 1347, conforme será apresentado com mais detalhes no item 5.2.

Os parâmetros físico-químicos de temperatura e OD foram monitorados diariamente em triplicata, em ambos os sistemas, sendo a temperatura acompanhada tanto no fluido circulante quanto no tanque de abastecimento. Já o pH foi monitorado cerca de 2 a 3x por semana também em triplicata.

O fluido circulante foi também amostrado com o auxílio de uma seringa, de modo a minimizar a entrada de O<sub>2</sub> no sistema (**Figura 48**), para realização das seguintes análises (todas em triplicata): **(i)** densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>), por espectrofotometria em 600 nm; **(ii)** H<sub>2</sub>S dissolvido, pela técnica de titulação potenciométrica; **(iii)** sulfato, por cromatografia de íons; **(iv)** BRS-m pela técnica do NMP; **(v)** ATP (adenosina trifosfato), conforme kit *LuminUltra® ATP Testing*; e, **(vi)** título viral em UFP/ml.



**Figura 48.** Procedimento de amostragem do fluido para realização das análises realizadas no estudo preliminar nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV.

Os cupons, foram amostrados para realização das seguintes análises em triplicata: **(i)** BRS-m ( $\text{NMP}/\text{cm}^2$ ); **(ii)** ATP ( $\text{pg}/\text{cm}^2$ ); **(iii)** MEV; **(iv)** perfilometria óptica; e, **(vi)** perda de massa, para determinação das taxas de corrosão.

A **Tabela 11** sintetiza o tipo de amostra coletada, as análises realizadas e os respectivos tempos de amostragem ao longo do estudo preliminar em ambos os sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV.

**Tabela 11.** Tipo de amostra, análises e respectivos tempos de amostragem realizados no estudo preliminar nos sistemas piloto laboratoriais de fluxo dinâmicos (*Loopings*) da UFV.

Amostra	Análise	Tempo
Fluido	Temperatura (°C)	Diário
	OD (mg/L)	
	pH	2 ou 3x/semana
	DO (600nm)	
	H <sub>2</sub> S (mg/L)	
	Sulfato (mM)	1°, 42° e 57° dia
	BRS-m (NMP/ml)	
	ATP (pg/ml)	
	Título viral (UFP/ml)	42°, 49° e 57° dia
Cupom	BRS-m (NMP/cm <sup>2</sup> )	42° e 57° dia
	ATP (pg/cm <sup>2</sup> )	
	MEV	
	Perfilometria e Rugosidade Média Quadrática - Rq (µm)	
	Perda de Massa (g) e Taxa de corrosão (mm/ano)	

Para a determinação das taxas de corrosão os cupons foram coletados, raspados, decapados, secos e novamente pesados em balança analítica conforme procedimentos da Norma ASTM G1-03: *Standard Practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test Specimens* (ASTM INTERNATIONAL, 2017).

A decapagem dos cupons foi realizada utilizando-se a solução ácida identificada como C.3.5, do Anexo 1 da referida norma, apresentada na **Tabela 12** (ASTM INTERNATIONAL, 2017). Foram realizados ciclos de imersão de 20 segundos, seguidos de limpeza mecânica por escovação (cerdas não metálicas) e imersão em água destilada, até completa remoção dos depósitos de corrosão.

**Tabela 12.** Composição da solução ácida (ASTM INTERNATIONAL, 2017) utilizada na decapagem dos cupons de aço carbono coletados nos ensaios nos *Loopings* da UFV.

Componente	Quantidade
Ácido clorídrico (HCl)	500 ml
Hexametilenotetramina (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	3,5 g (3,5 % m/v)
Água destilada	500 ml

As taxas de corrosão (TxCor) foram então determinadas conforme a equação abaixo (ASTM INTERNATIONAL, 2017):

$$\text{taxa de corrosão (TxCor)} = \frac{k \cdot \Delta m}{t \cdot A \cdot \rho}$$

Onde:

k = constante com valor de 87.600 para cálculo de taxa de corrosão em mm/ano;

$\Delta m$  = variação da massa em gramas (g);

t = tempo do ensaio em horas (h);

A = área da superfície exposta ao meio corrosivo em cm<sup>2</sup>;

$\rho$  = densidade do material em g/cm<sup>3</sup>.

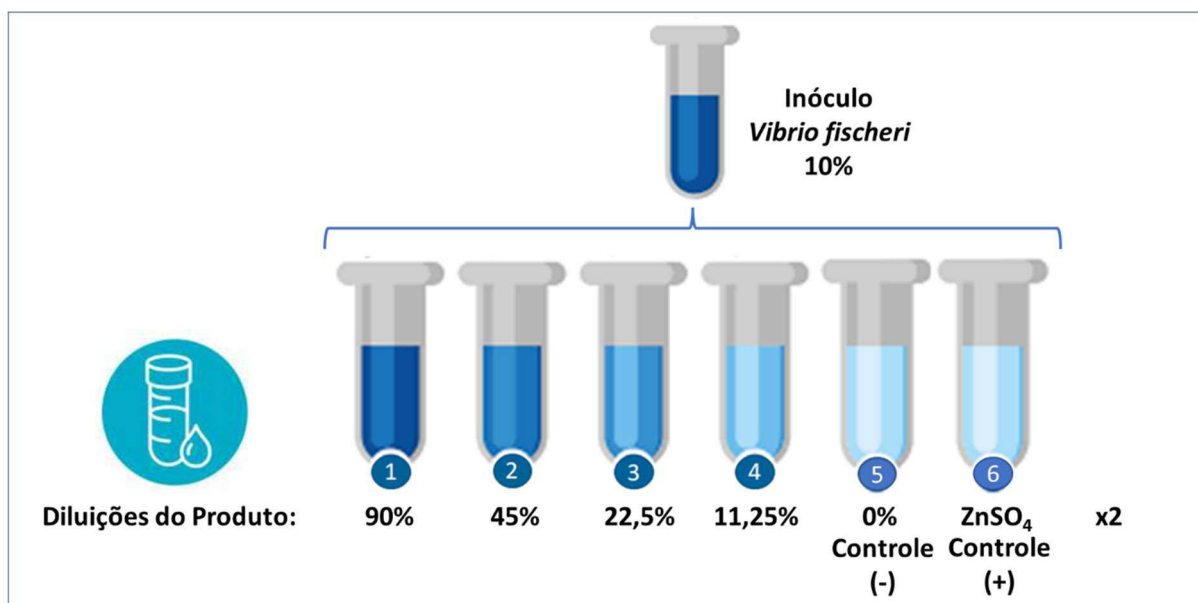
## 4.6. AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERIÓFAGOS

### 4.6.1. Ecotoxicidade

Ensaio para a avaliação da potencial ecotoxicidade dos fagos foram realizados com o coquetel fágico comparativamente a produtos biocidas comerciais, através de testes no sistema Microtox® (MICROBICS CORPORATION, 1992), conforme a norma ABNT-NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri*. Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas (ABNT, 2021c).

As leituras da bioluminescência foram realizadas em diluições sucessivas dos produtos em água do mar sintética, contendo inóculo da bactéria *V. fischeri* na proporção de 10% do volume total do frasco. Todas as condições de ensaio foram realizadas em duplicata e foram adicionados **(i) controles negativos**, onde não foi adicionado o inóculo e **(ii) controles positivos**, onde foi adicionado sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) como substância de referência com efeito ecotóxico (**Figura 49**).

O ZnSO<sub>4</sub> foi utilizado nas concentrações de 9,0; 4,5; 2,25 e 1,12 mg/L (m/v), sendo que o resultado da CE50 deve ficar entre 3 e 10 mg/L, confirmando que a cultura de *V. fischeri* utilizada está respondendo adequadamente, caso contrário, o teste deve ser repetido.



**Figura 49.** Representação esquemática das diluições seriadas do produto em avaliação e controles negativo e positivo para realização de teste de ecotoxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri* pelo sistema Microtox®.

As análises para cada condição de teste foram realizadas em intervalos de 5, 15 e 30 minutos e o cálculo da CE50 foi feito automaticamente pelo equipamento, sendo a referência normativa os valores obtidos em 15 minutos (CE50<sub>15min</sub>).

Foram avaliados dois lotes diferentes do coquetel fágico produzido em laboratório, um no qual foi obtida a concentração final de 10<sup>7</sup> UFP/ml e outro com 10<sup>9</sup> UFP/ml.

O ensaio também foi realizado apenas com o meio de cultura residual (LB residual) utilizado na produção dos fagos (ou seja, o meio inoculado com a bactéria hospedeira, porém sem inoculação do fago, sob as mesmas condições e após o mesmo tempo de batelada da produção), com o objetivo de se avaliar se os fagos por si só possuem algum efeito sobre a bactéria *V. fischeri*, impactando sua emissão de luminescência, ou se o resultado da CE50 tem influência principalmente dos componentes do meio de cultura utilizado.

Comparativamente foram avaliados dois biocidas comerciais: o biocida padrão THPS 75% e o biocida para tanques à base de THPS 40%.

#### 4.6.2. Biodegradabilidade

Ensaio para avaliação da biodegradabilidade em ambientes marinhos foram realizados com o coquetel fágico comparativamente a produtos biocidas comerciais, conforme o teste padrão nº 306: *Biodegradability in Seawater* (Biodegradabilidade em água do mar) da OECD (OECD, 1992b).

O método de ensaio de biodegradabilidade em água do mar da OECD 306 utilizado neste estudo foi o método de frascos fechados (*closed bottle*). O princípio desse método se baseia na quantificação do oxigênio consumido pelos microrganismos heterotróficos aeróbios autóctones da água do mar natural, na presença de 2 a 10 mg/L do produto em avaliação.

A água do mar foi suplementada de nutrientes minerais e foram preparados frascos contendo 300 ml de volume útil, em duplicata para cada condição, os quais foram incubados ao longo de um período de 28 dias, no escuro (frascos envoltos em papel alumínio), a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , conforme pode ser observado na **Figura 50**.



**Figura 50.** Frascos fechados incubados no escuro do ensaio de biodegradabilidade em água do mar (LABP, 2022).

A água do mar utilizada foi filtrada para remoção de particulados, mantida em aeração suave até sua utilização e suplementada no início do teste com 1 ml (aproximadamente 0,3% do volume de teste) de cada uma das 4 soluções (A, B, C e D) de nutrientes minerais apresentadas na **Tabela 13**, pois de outro modo, as baixas

concentrações sobretudo de nitrogênio e fósforo na água do mar limitariam a remoção do carbono orgânico dissolvido (COD).

**Tabela 13.** Soluções de nutrientes inorgânicos utilizadas no teste padrão de biodegradabilidade em água do mar (OECD, 1992b)

Solução	Reagente	Quantidade (g/L)
<b>A</b>	Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	8,50
	Fosfato de potássio Dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	21,75
	Fosfato de sódio dibásico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	33,30
	Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	0,50
<b>B</b>	Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ )	27,50
<b>C</b>	Sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	22,50
<b>D</b>	Cloreto de ferro III hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,25

Considera-se um resultado positivo, ou seja, um produto de alta biodegradabilidade em ambiente marinho, se o valor médio de remoção de **COD for  $\geq 70\%$**  ou da Demanda Bioquímica de Oxigênio teórica (**DBO<sub>t</sub> for  $\geq 60\%$** ) no período máximo de 28 dias.

A DBO<sub>t</sub> é utilizada para se avaliar substâncias individuais e/ou produtos para os quais a estrutura molecular de todos os componentes é conhecida, caso contrário, utiliza-se a Demanda Química de Oxigênio (DQO) como referência para o cálculo da **biodegradabilidade (%D)**, a qual deve ser determinada previamente para cada produto.

No caso deste ensaio, a água do mar foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e a DQO dos produtos foi determinada previamente pelo método colorimétrico (600 nm) conforme *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2017).

Além dos frascos de teste contendo os produtos em avaliação, também foram preparados os seguintes frascos: **(i) controle branco**, contendo somente água do mar, cuja diferença de consumo de oxigênio é descontada no cálculo da %D; **(ii) substância de referência biodegradável**, a qual deve apresentar biodegradabilidade  $\geq 60\%$  da DBO<sub>t</sub>, caso contrário o teste deve ser repetido; **(iii) controle da toxicidade**, contendo a substância de referência e o produto em avaliação, a fim de se avaliar se o próprio produto possui efeito inibitório significativo; e, **(iv) controle físico-químico**, contendo o produto em avaliação e cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), o qual cessa toda a

atividade microbiana, a fim de se avaliar se o produto é degradado por mecanismos abióticos, como por exemplo hidrólise ou adsorção.

Para estes ensaios, foi utilizada a concentração de 2 mg/L de cada produto e as quantificações de oxigênio foram realizadas nos tempos de 7, 14 e 28 dias em duplicata através do método de titulação Winkler (CARVALHO et al., 2021) conforme norma ISO 5813 (ISO, 1983). A substância de referência utilizada foi o benzoato de sódio ( $C_6H_5CO_2Na$ ).

A partir das medições de oxigênio, o cálculo da %D é feito conforme a equação:

$$\%D = \frac{(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})}{C_{st} \times (DQO \text{ ou } DBO_t)} \times 100$$

Onde,

$m_{t0}$  = média dos teores de  $O_2$  do tratamento no tempo 0 (zero);

$m_{tx}$  = média dos teores de  $O_2$  do tratamento a cada tempo avaliado;

$m_{b0}$  = média dos teores de  $O_2$  do branco no tempo 0 (zero);

$m_{bx}$  = média dos teores de  $O_2$  do branco a cada tempo avaliado;

$C_{st}$  = concentração da substância teste.

DQO ou  $DBO_t$  = em mg de  $O_2$ /mg de substância teste.

Além do coquetel fágico (na concentração de  $10^9$  UFP/ml), o teste também foi realizado apenas com o meio de cultura residual (LB residual) utilizado na produção dos fagos (ou seja, o meio inoculado com a bactéria hospedeira, porém sem inoculação do fago, sob as mesmas condições e após o mesmo tempo de batelada da produção), com o objetivo de se avaliar se os fagos por si só atuam sobre os microrganismos do teste impactando na %D, ou se o resultado da %D tem influência principalmente dos componentes do meio de cultura utilizado.

Comparativamente foram avaliados dois biocidas comerciais: o biocida padrão THPS 75% e o biocida para tanques à base de THPS 40%.

#### 4.6.3. Corrosividade

Ensaio para a avaliação da potencial corrosividade do coquetel fágico foram realizados com o coquetel comparativamente a produtos biocidas comerciais através de ensaios abióticos de imersão e determinação da perda de massa de cupons metálicos e respectivas taxas de corrosão conforme a Norma ASTM G31-21: *Standard*

*Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals* (ASTM INTERNATIONAL, 2021).

Os ensaios foram conduzidos em células de vidro, abastecidas com água do mar natural esterilizada, sob pressão atmosférica, com borbulhamento contínuo de N<sub>2</sub> e em temperatura ambiente (~ 25°C), ao longo de 30 dias (**Figura 51**).



**Figura 51.** Células de vidro utilizadas nos ensaios de avaliação da corrosividade.

Como corpos de prova, foram utilizados 3 cupons de aço carbono API 5L Gr X65 por célula de vidro, os quais foram previamente jateados com esferas de vidro na faixa de 90 a 125  $\mu\text{m}$ , limpos com solução de acetona 60% (v/v), numerados e pesados individualmente, tendo sua massa inicial aferida, anotada e correlacionada com a numeração.

Ambos os produtos biocidas, o biocida padrão (THPS 75%) e o biocida para tanques (THPS 40%), foram utilizados na concentração de 200 ppm (mg/L) e o coquetel fágico ( $10^9$  UFP/ml) foi utilizado na concentração de  $10^7$  UFP/ml. Todos os produtos foram avaliados tendo como fluido de teste água do mar natural filtrada (0,45 $\mu\text{m}$ ) e esterilizada e um ensaio controle foi realizado sem a adição de qualquer produto, apenas com os cupons expostos ao fluido de teste.

O pH de todos os produtos puros foi medido e também acompanhado no fluido de teste ao longo dos ensaios de corrosividade.

Após o período de 30 dias, os cupons foram coletados, raspados, decapados e novamente pesados em balança analítica conforme procedimentos da Norma ASTM G1-03: *Standard Practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test Specimens* (ASTM INTERNATIONAL, 2017).

A decapagem dos cupons foi realizada utilizando-se uma solução ácida conhecida como solução de *Clarke*, identificada como C.3.1 no Anexo 1 da referida norma e apresentada na **Tabela 14** (ASTM INTERNATIONAL, 2017; SINGH; KUMAR, 2003). Foram realizados ciclos de imersão de 20 segundos na solução ácida, seguidos de limpeza mecânica por escovação (cerdas não metálicas) até completa remoção dos depósitos de corrosão.

Por fim, os cupons foram lavados em água destilada e álcool isopropílico (isopropanol) PA ( $\geq 99,5\%$ ) e secos com soprador térmico. Depois de resfriados a temperatura ambiente em dessecador, os cupons foram pesados para determinação das taxas de corrosão.

**Tabela 14.** Composição da solução ácida de Clarke (ASTM INTERNATIONAL, 2017; SINGH; KUMAR, 2003) utilizada na decapagem dos cupons de aço carbono dos ensaios de corrosividade.

Componente	Quantidade
Ácido clorídrico (HCl)	1000 ml
Trióxido de antimônio ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ )	20g (2% m/v)
Cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ )	50g (5% m/v)

As taxas de corrosão ( $TxCor$ ) foram então determinadas conforme a equação abaixo (ASTM INTERNATIONAL, 2017):

$$taxa\ de\ corros\tilde{a}\ (TxCor) = \frac{k \cdot \Delta m}{t \cdot A \cdot \rho}$$

Onde:

k = constante com valor de 87.600 para cálculo de taxa de corrosão em mm/ano;

$\Delta m$  = variação da massa em gramas (g);

t = tempo do ensaio em horas (h);

A = área da superfície exposta ao meio corrosivo em  $\text{cm}^2$ ;

$\rho$  = densidade do material em  $\text{g/cm}^3$ .

#### 4.6.4. Inibição do tratamento biológico de água de produção

Ensaio para avaliação da potencial inibição provocada pelo coquetel fágico, no processo de nitrificação do sistema biológico de tratamento de água de produção foram conduzidos em microcosmos estabelecidos a partir do lodo biológico proveniente de uma estação industrial de tratamento biológico de água de produção de terminal de petróleo.

O lodo biológico foi previamente adaptado com alimentação em bateladas sequenciais diárias com água de produção industrial e salinidades gradativamente crescentes (SOUZA et al., 2022). Foram selecionadas para este estudo as salinidades de 55 g/L (representativa de uma salinidade próxima à existente atualmente nesses sistemas) e 125 g/L de NaCl (representativa de uma condição hipersalina que esses sistemas poderão atingir no futuro em função de águas de produção do pré-sal).

Os microcosmos foram montados a partir de inóculos dos respectivos lodos biológicos adaptados às salinidades supracitadas, transferidos (na proporção de 10%) para frascos Erlenmeyer (com 250 ml de volume útil) e incubados sob agitação em *shaker* (150 rpm) a 30°C, conforme ilustrado na **Figura 52**.



**Figura 52.** Microcosmos incubados sob agitação para realização dos ensaios de avaliação da potencial inibição provocada pelo coquetel fágico no processo de nitrificação do sistema biológico de tratamento de água de produção em terminais de petróleo.

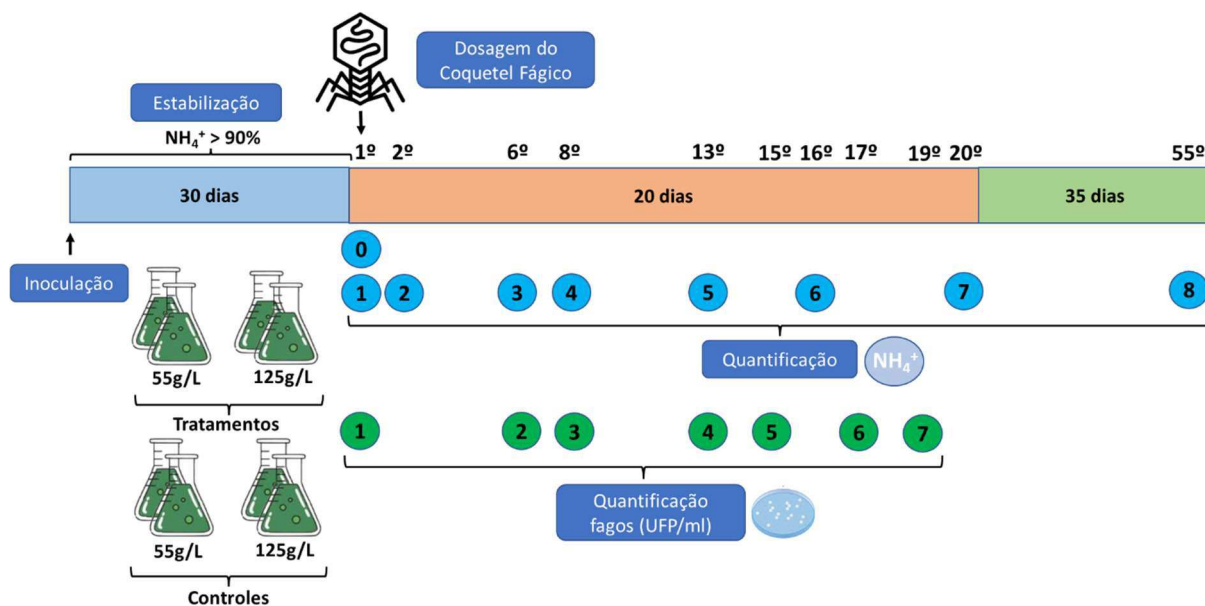
Os frascos foram montados e alimentados diariamente (de segunda a sábado), em bateladas de 18% (v/v) do volume útil, após decantação do lodo por 1 hora, com água de produção industrial contendo 80 mg/L de amônia, suplementada com 1,5 ml/L de etanol e 2,5 ml/L de tripolifosfato. Os frascos de 125 mg/L de salinidade também foram suplementados com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) de modo a manter a alcalinidade residual acima de 300 mg/L, adequada à nitrificação.

Foram utilizados frascos em quadruplicata para cada concentração salina, sendo destinada uma duplicata como controle e outra como tratamento, na qual o coquetel fágico foi dosado na contração de 10<sup>7</sup> UFP/ml.

As concentrações de amônia foram acompanhadas cerca de 2 vezes por semana, pelo método do Kit Hack TNT *Plus*, ao longo de, ao menos, 30 dias antes da dosagem do coquetel fágico, como fase de estabilização, de modo a garantir remoções de amônia estáveis e acima de 90%.

Após a dosagem do coquetel foram acompanhadas ao longo de 20 dias, **(i) a taxa de remoção de amônia**, cerca de 2 vezes por semana, em todos os frascos; e, **(ii) a concentração de fagos** nos frascos tratados, por meio da quantificação de UFP/ml para cada uma das bactérias hospedeiras (*E. coli* e *E. cloacae*) dos fagos que compõem o coquetel. Depois desse período, os sistemas foram mantidos em alimentação e analisados novamente quanto à remoção de amônia após 35 dias.

A **Figura 53** ilustra as principais etapas deste experimento indicando o intervalo de tempo entre as atividades e os dias em que foram realizadas as amostragens.



**Figura 53.** Etapas experimentais do estudo preliminar de avaliação do potencial impacto do coquetel fágico na inibição do processo de nitrificação no sistema biológico de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. Os números ordinais representam os dias do experimento, os números em círculos azuis representam os tempos em que foram realizadas as quantificações de amônia e os números em círculos verdes representam os tempos em que foram realizadas as quantificações dos fagos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E INÓCULOS MICROBIANOS

A **Tabela 15** apresenta os resultados das quantificações de campo realizadas para as respectivas plataformas amostradas no mês anterior às amostragens e a **Tabela 16** apresenta os resultados de quantificações realizados diretamente nas amostras coletadas.

**Tabela 15.** Quantificações microbiológicas de campo nos pontos de amostragem.

Quantificações microbiológicas Pontos de amostragem	NMP/ml	
	BRS-m	BANHT
Tanque <i>slop</i> (plataforma tipo FPSO)	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Tanque de armazenamento central (plataforma tipo FSO)	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
Tanque de armazenamento a bombordo (plataforma tipo FSO)	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$

**Tabela 16.** Quantificações microbiológicas realizadas nas amostras coletadas.

Quantificações microbiológicas Pontos de amostragem	NMP/ml			
	BRS-m	BRS-t	BANHT	BPA
Tanque <i>slop</i> (plataforma tipo FPSO)	$1,1 \times 10^5$	NR	$1,1 \times 10^6$	NR
Tanque de armazenamento central (plataforma tipo FSO)	$1,1 \times 10^4$	$9,0 \times 10^0$	NR	$1,1 \times 10^6$
Tanque de armazenamento a bombordo (plataforma tipo FSO)	$1,1 \times 10^5$	$9,0 \times 10^0$	NR	$1,1 \times 10^7$

NR = não realizado.

A partir dessas quantificações, foram recuperadas para crescimento nos reatores de propagação de inóculos microbianos anaeróbicos as culturas de BRS-m e BANHT do tanque *slop*; e BRS-m e BPA-a dos tanques de armazenamento de petróleo. Todas as culturas foram mantidas por realimentação mensal no Laboratório de Biotecnologia do CENPES e foram transferidas para o LIVM da UFV para utilização neste e nos demais estudos em andamento.

## 5.2. SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO

Com base nos critérios e considerações de seleção apresentados no item 4.4., foram escolhidos quatro fagos para compor o coquetel fágico utilizado nos ensaios nos *Loopings* da UFV.

Os quatro fagos selecionados pertencem à Coleção de Vírus Bacterianos do LIVM e encontram-se identificados com os seguintes códigos: **(i)** vB\_EcoM-UFV09; **(ii)** vB\_EcoM-UFV10; **(iii)** vB\_EcoM-UFV13; e, **(iv)** vB\_EcIM-UFV01 e serão denominados simplificada e aqui em diante de **UFV09**, **UFV10**, **UFV13** e **Ent01**.

Os fagos UFV09, 10 e 13 referem-se a fagos de *Escherichia coli*, isolados na linhagem bacteriana *E. coli* 30, cedida ao LIVM pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Leite. Já o fago Ent01, refere-se a um fago de *Enterobacter cloacae*, isolado na linhagem bacteriana *E. cloacae* ATCC 1347, cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (BIOTAN) da UFV. Atualmente, ambas as linhagens bacterianas pertencem à Coleção de Microrganismos do LIVM.

Todos os fagos foram sequenciados, identificados e suas sequências encontram-se depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob os códigos listados na **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Identificação dos fagos selecionados para formulação do coquetel fágico.

Identificação simplificada	Código de identificação no LIMV (UFV)	Código de identificação no NCBI
UFV09	<i>Escherichia</i> _phage_vB_EcoM-UFV09	<a href="#">MZ291552.2</a>
UFV10	<i>Escherichia</i> _phage_vB_EcoM-UFV10	<a href="#">OP555981.1</a>
UFV13	<i>Escherichia</i> _phage_vB_EcoM-UFV13	<a href="#">KU867876.1</a>
Ent01	<i>Enterobacter</i> _phage_vB_EcIM-UFV01	<a href="#">ON454249</a>

Os fagos de *E. coli* e *E clocae*, até 2021, eram classificados como pertencentes à ordem Caudovirales, família Myoviridae, sendo que os fagos de *E. coli* já haviam sido identificados como sendo da subfamília Tevenvirinae, gênero T4 virus. Contudo, atualmente, conforme a nova classificação do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), esses fagos passaram a ser classificados conforme a **Tabela 18** e se diferenciam taxonomicamente apenas pelo gênero.

**Tabela 18.** Classificação taxonômica dos fagos selecionados para formulação do coquetel fágico, segundo nova classificação do ICTV.

<b>Taxonomia</b>	<b>Fagos de <i>Escherichia coli</i></b>	<b>Fago de <i>Enterobacter coclae</i></b>
Super-Reino	Víruses	
Clado	Duplodnaviria	
Reino	Heunggongvirae	
Filo	Uroviricota	
Classe	Caudoviricetes	
Família	Straboviridae	
Subfamília	Tevenvirinae	
Gênero	Tequatrovirus.	Karamvirus

### 5.3. PRIMEIRO ESTUDO COM BACTERÍOFAGOS EM LOOPING (SISTEMA CENPES)

#### 5.3.1. Inóculo

A **Tabela 19** apresenta os resultados de quantificação microbiológicas por NMP do inóculo microbiano das culturas, de BANHT e BRS-m do tanque *slop* de plataforma do tipo FPSO, após o repique de 10 % (v/v) e 72 h de incubação; e, da água do mar natural filtrada utilizada para abastecimento do *Looping*.

Observa-se um resultado de concentração mediana de BANHT no inóculo, porém uma concentração alta na água do mar. Já para BRS-m ambas as concentrações foram baixas, principalmente na água do mar.

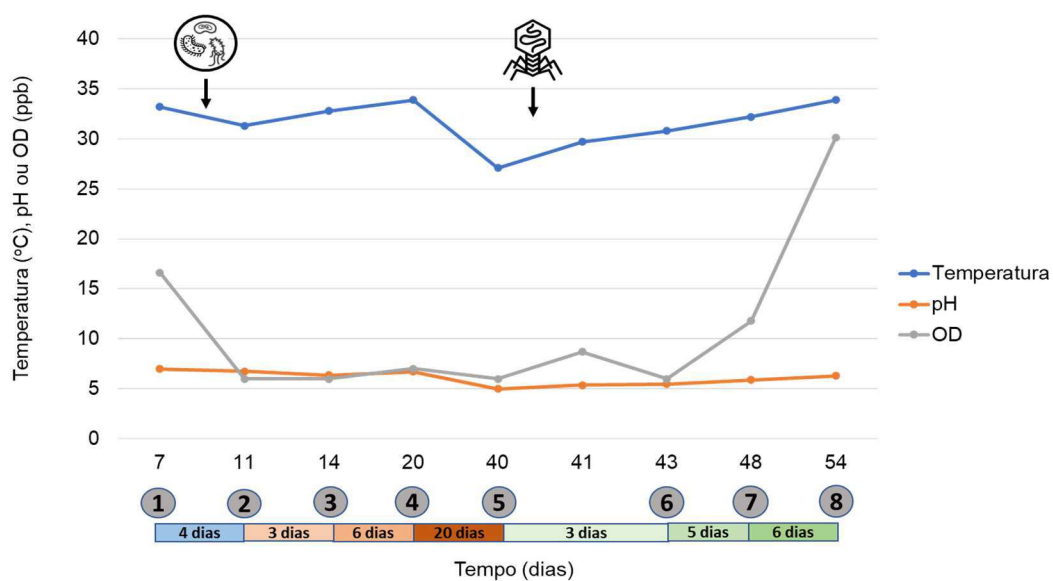
**Tabela 19.** Quantificações microbiológicas das culturas de BANHT e BRS-m inoculadas e na água do mar natural utilizada como alimentação nos ensaios no *Looping* do CENPES.

<b>Quantificações microbiológicas</b>	<b>BANHT (NMP/ml)</b>	<b>BRS-m (NMP/ml)</b>
Inóculos do tanque <i>slop</i> (plataforma tipo FPSO)	$2,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$
Água do mar natural (alimentação do <i>Looping</i> )	$4,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^{-1}$

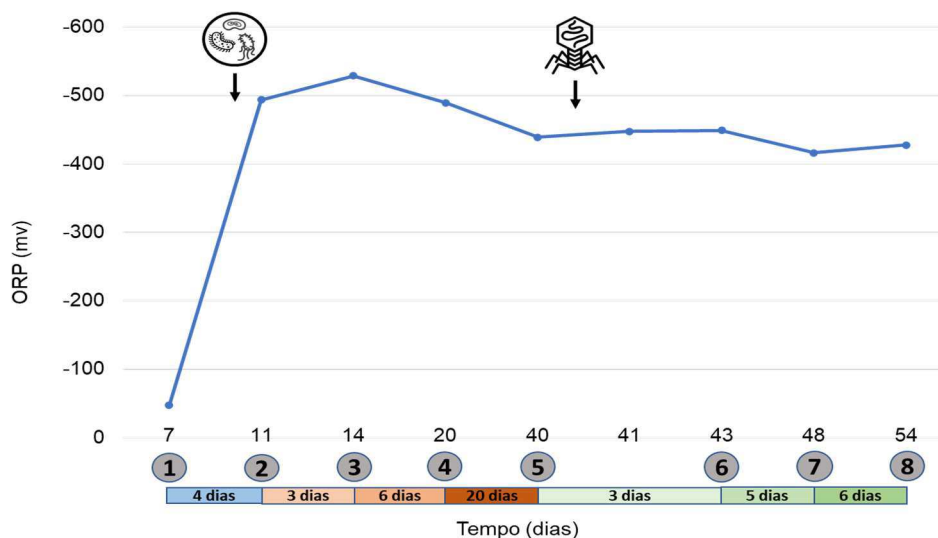
### 5.3.2. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos monitorados permaneceram adequados e relativamente estáveis ao longo de todo o experimento. A **Figura 54** apresenta os resultados do monitoramento dos parâmetros de temperatura, pH e OD, enquanto a **Figura 55**, apresenta os resultados do monitoramento do ORP.

A temperatura média permaneceu em torno de  $31,7 \pm 2,2$  °C. O pH médio permaneceu em torno de  $6,0 \pm 0,7$ . E, o OD encontrava-se em 16,6 ppb (partes por bilhão) antes da inoculação do sistema e manteve-se, ao longo de quase todo o período de operação, em  $7,3 \pm 2,2$  ppb (abaixo dos 10 ppb recomendados), tendo apenas aumentado para cerca de 30 ppb no último tempo analisado (54º dia). Já o ORP antes da inoculação do sistema encontrava-se em torno de -47 mv e após a inoculação permaneceu em média em  $-461 \pm 38$  mv.



**Figura 54.** Resultados do monitoramento dos parâmetros de temperatura, pH e oxigênio dissolvido (OD) ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

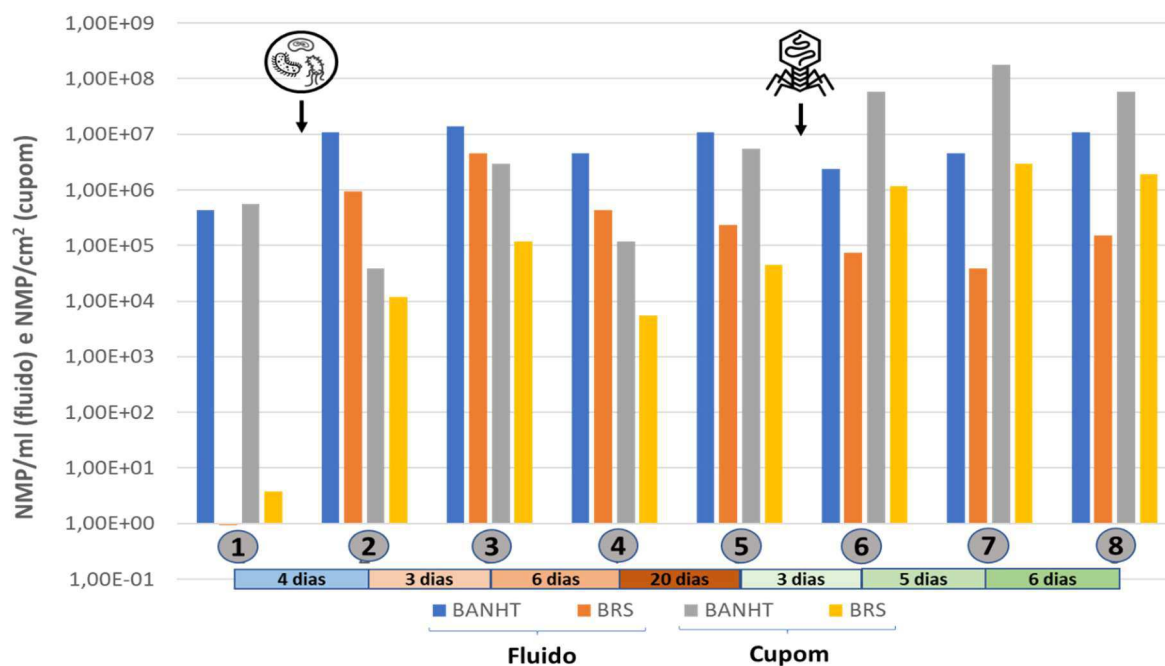


**Figura 55.** Resultados do monitoramento do potencial redox (ORP) ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

### 5.3.3. BRS (NMP/ml e NMP/cm<sup>2</sup>)

O gráfico da **Figura 56** apresenta os resultados das quantificações pela técnica do NMP no fluido (NMP/ml) e nos cupons (NMP/cm<sup>2</sup>) coletados em cada um dos 8 tempos de amostragem do teste no *Looping* do CENPES.

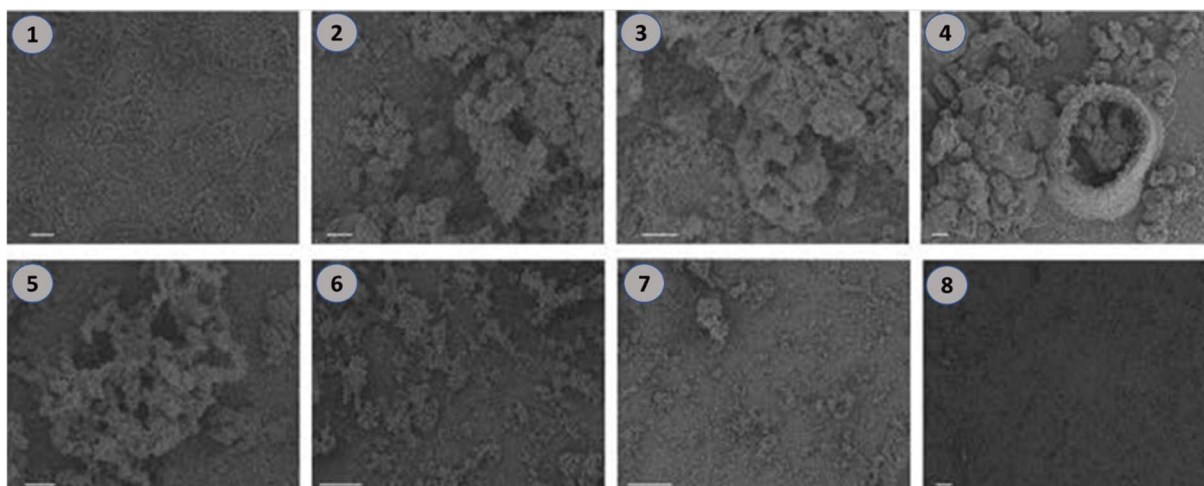
Observa-se que após a inoculação, rapidamente se estabeleceu um biofilme contendo BRS nos cupons, mantendo-se na ordem de  $10^4$  NMP/cm<sup>2</sup> no tempo 5. Contudo, não foi possível observar pela técnica do NMP uma redução nem do biofilme, nem das bactérias planctônicas, após a dosagem dos fagos. Observa-se inclusive um aumento nas concentrações de BRS e BANHT nos cupons nos tempos 6, 7 e 8.



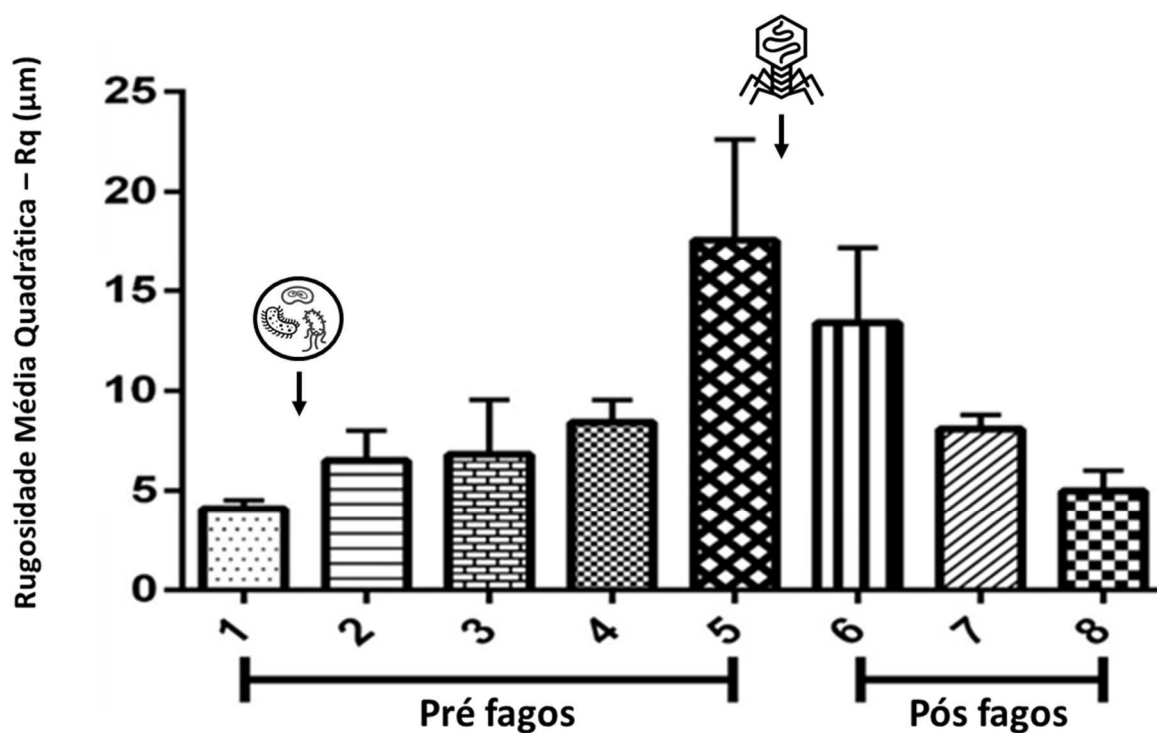
**Figura 56.** Quantificações microbiológicas do fluido (NMP/ml) e dos cupons (NMP/cm<sup>2</sup>) coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons. NMP (Número Mais Provável); BANHT (Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais); BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato).

#### 5.3.4. MEV e perfilometria óptica

Em relação às análises de MEV e perfilometria óptica, observam-se resultados opostos aos valores de NMP. As análises de MEV (**Figura 57**), a determinação da Rq (rugosidade média quadrática) (**Figura 58**) e o aspecto visual dos cupons (**Figura 59**), demonstraram uma redução significativa do biofilme após a dosagem do coquetel fágico.



**Figura 57.** Resultados das análises de MEV dos cupons coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES. As barras de escala representadas referem-se a 100  $\mu\text{m}$ .



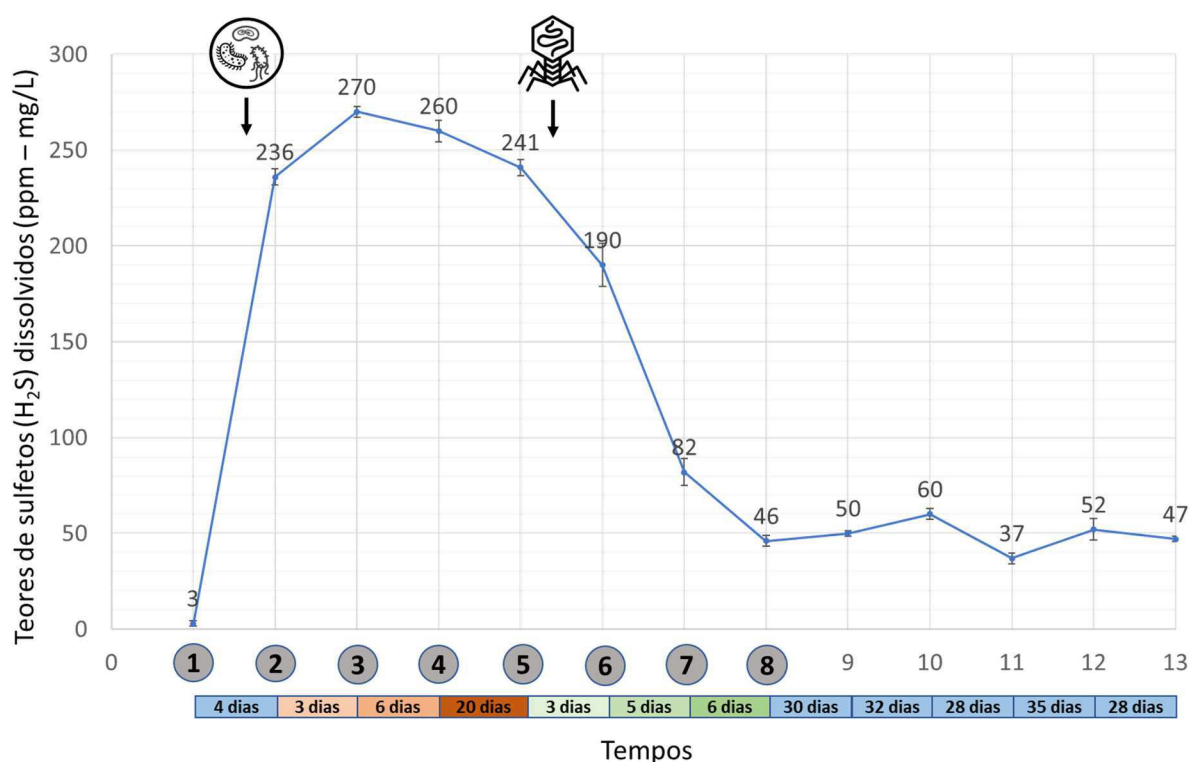
**Figura 58.** Resultados das análises de perfilometria óptica dos cupons coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES.



**Figura 59.** Aspecto visual dos cupons coletados ao longo do primeiro estudo no *Looping* do CENPES.

### 5.3.5. H<sub>2</sub>S dissolvido (mg/L)

Em relação aos teores de H<sub>2</sub>S dissolvido avaliados no fluido circulante do *Looping*, observa-se que, comparando-se o tempo 5 (um dia antes da dosagem dos fagos) com o tempo 8 (último cupom coletado, 15 dias após a dosagem dos fagos), houve uma redução de aproximadamente 80% nos teores de H<sub>2</sub>S e nos 5 meses que se seguiram, não houve aumento desses teores, os quais permaneceram estáveis e em média, abaixo de 50 ppm (mg/L), conforme apresentado na **Figura 60**.



**Figura 60.** Teores de sulfetos (H<sub>2</sub>S) dissolvidos no fluido circulante no *Looping*, ao longo de aproximadamente 2 meses de execução do experimento com retirada dos cupons (tempos 1 a 8) e durante 5 meses após a retirada do último cupom (tempos 9 a 13). Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

## 5.4. SEGUNDO ESTUDO COM BACTERIÓFAGOS EM LOOPING (NOVOS SISTEMAS UFV)

### 5.4.1. Inóculo

A **Tabela 20** apresenta os resultados de quantificação por NMP **(i)** da cultura microbiana de BRS-m, após o repique de 10 % (v/v) e 72 h, utilizada como inóculo para os ensaios; e, **(ii)** da água do mar natural filtrada, utilizada para abastecimento dos *Loopings*, na qual além das BRS também foram quantificadas as BANHT.

Observa-se um resultado alto de BRS-m no inóculo ( $10^7$  NMP/ml) e uma concentração bastante baixa na água do mar ( $10^{-1}$  NMP/ml), onde as BANHT ao contrário, apresentaram concentração alta ( $10^5$  NMP/ml).

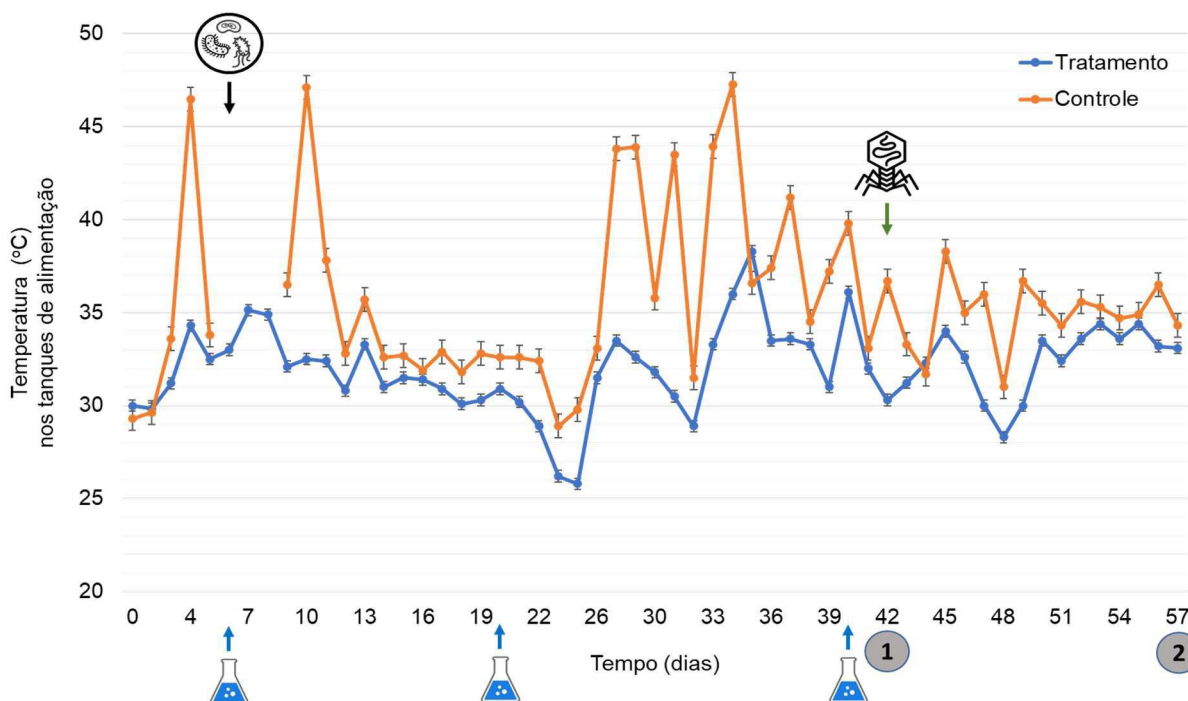
**Tabela 20.** Quantificações microbiológicas da cultura de BRS-m inoculada e da água do mar natural utilizada como alimentação nos sistemas de *Looping* da UFV.

Quantificações microbiológicas	BANHT (NMP/ml)	BRS-m (NMP/ml)
Inóculo dos tanques de armazenamento (plataforma tipo FSO)	*	$1,4 \times 10^7$
Água do mar natural (alimentação do <i>Looping</i> )	$2,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^{-1}$

\*não realizado

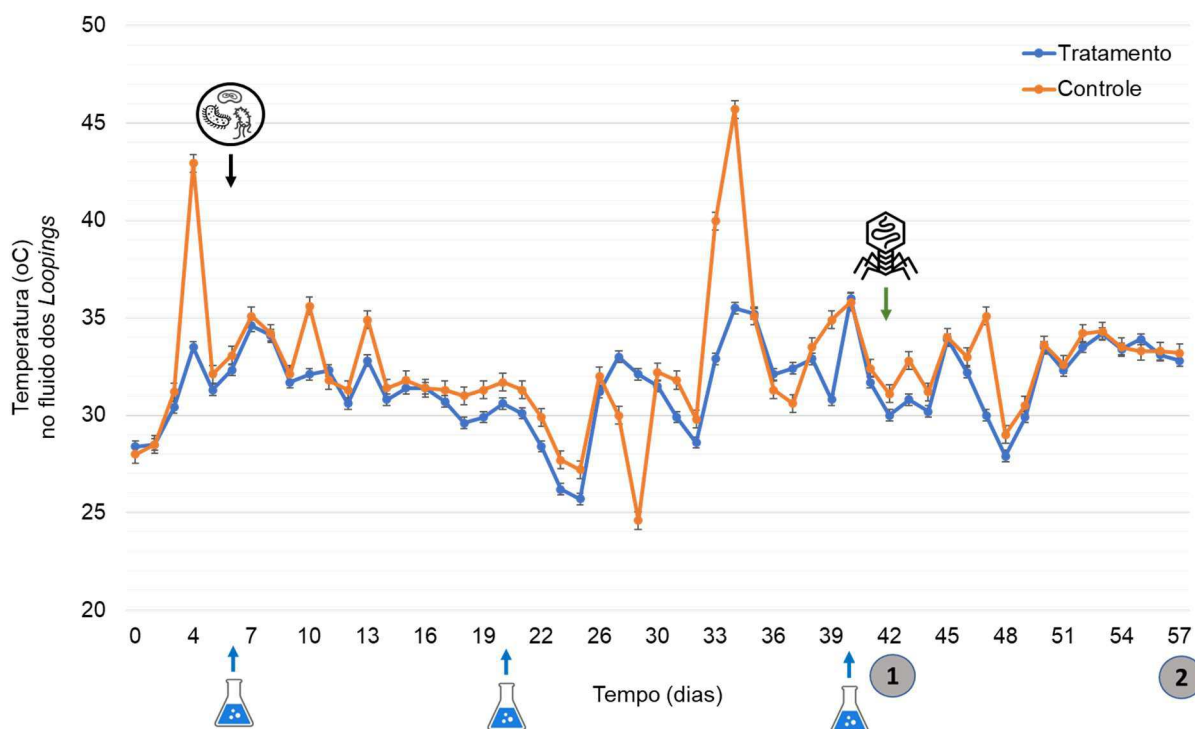
### 5.4.2. Temperatura (oC)

Observa-se pela **Figura 61**, que a temperatura nos tanques do *Looping* Tratamento permaneceu estável ao longo de todo o ensaio, com média em torno de 32°C, enquanto no *Looping* Controle, apesar da média de temperatura não ter se distanciado tanto em relação ao Tratamento, ficando em torno de 35,6°C, ocorreram vários picos de aumento de temperatura ultrapassando 40°C, chegando a 47°C em dois momentos, no 10º e 34º dias.



**Figura 61.** Resultados do monitoramento da temperatura (°C) nos tanques de alimentação ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

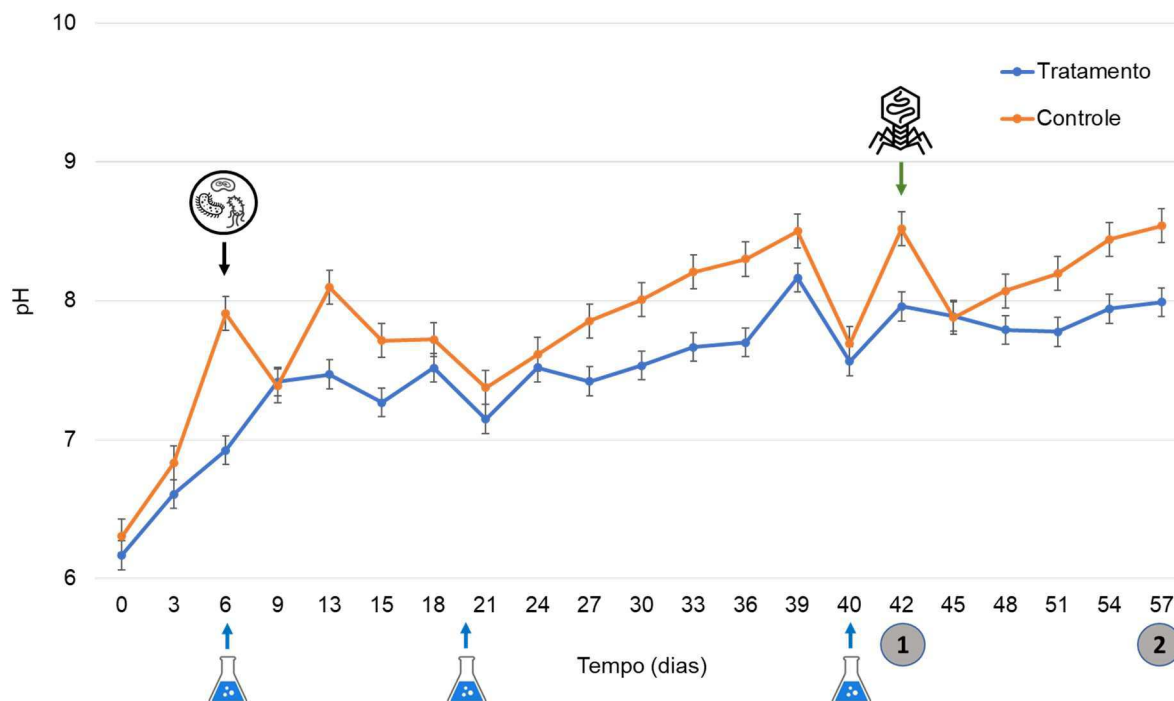
Quanto à temperatura no fluido circulante em cada *Looping* (**Figura 62**), observa-se que no Tratamento, a temperatura também permaneceu mais estável que no Controle, com uma média em torno de 31,5°C, no primeiro, e 32,5°C, no segundo. Contudo, também foram observados picos acima de 40°C no *Looping* Controle (42,9°C no 4º dia e 45,7°C no 34º dia).



**Figura 62.** Resultados do monitoramento da temperatura (°C) no fluido circulante nos sistemas ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

### 5.4.3. pH

O gráfico da **Figura 63** apresenta os resultados do monitoramento do pH ao longo dos ensaios. Observa-se um pequeno aumento do pH no 6º dia, logo após a inoculação e dosagem da solução nutritiva, contudo, a partir de então, os valores de pH em ambos os *Loopings* permaneceram razoavelmente estáveis, com uma média de pH em 7,5 para o Tratamento e 7,9 para o Controle.



**Figura 63.** Resultados do monitoramento do pH, nos sistemas Tratamento e Controle, ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

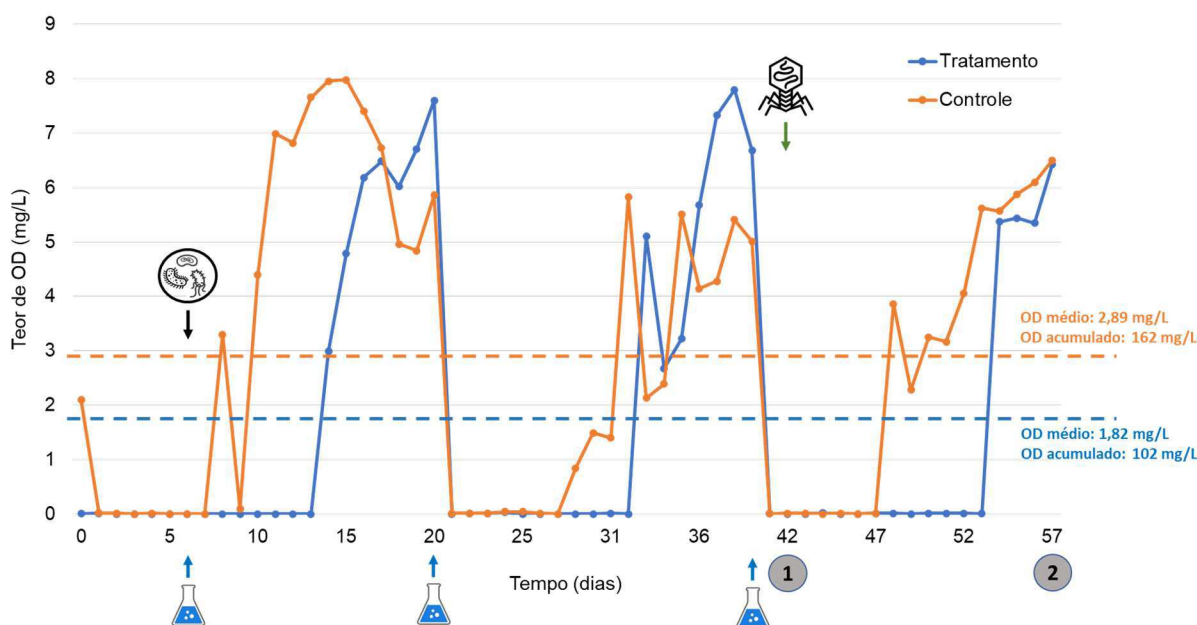
#### 5.4.4. Oxigênio dissolvido (mg/L)

A **Figura 64** apresenta os resultados de acompanhamento dos teores de oxigênio dissolvido (OD) ao longo dos ensaios nos *Loopings*. Observa-se que apesar dos sistemas terem se estabelecido em anaerobiose durante a fase pré-inoculação, logo após a inoculação e dosagem da solução nutritiva, os teores de OD subiram progressivamente e atingindo valores próximos de 8 mg/L no 14º dia no Controle e no 20º dia no Tratamento.

Em seguida, os teores de oxigênio caíram novamente e a anaerobiose foi reestabelecida por 12 dias no Tratamento e 7 dias no Controle, quando um novo ciclo se repetiu e assim sucessivamente. Ou seja, durante o período total dos ensaios, foram observados 3 ciclos de aumento do OD, seguido por sua queda e por um período de anaerobiose em ambos os sistemas.

Contudo, aparentemente, tais ciclos aconteceram com uma diferença de quase uma semana quando se comparam os *Loopings*, ou seja, a anaerobiose foi mantida por mais tempo no Tratamento, o que gerou uma diferença significativa nos níveis de

exposição dos cupons ao OD. Enquanto o OD médio e acumulado do Tratamento, ficou em 1,82 e 102 mg/L, respectivamente, no Controle, esses valores atingiram 2,89 e 162 mg/L (conforme indicado pelas linhas tracejadas na **Figura 64**).

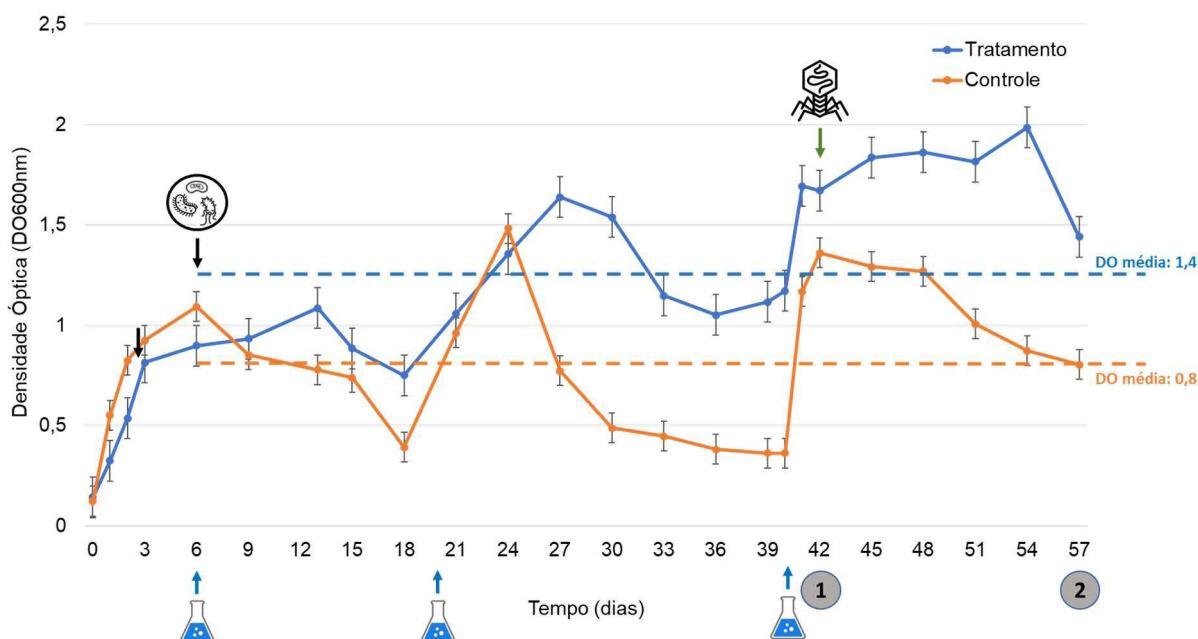


**Figura 64.** Resultados do monitoramento do oxigênio dissolvido (OD), nos sistemas Tratamento e Controle, ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

#### 5.4.5. Densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>)

A **Figura 65** apresenta os resultados das análises de DO<sub>600nm</sub> no fluido circulante nos *Loopings* ao longo dos ensaios. Observa-se que logo após a inoculação, os valores de DO<sub>600nm</sub> aumentaram para próximo de 1 em ambos os sistemas e permaneceram nessa faixa por cerca de uma semana quando tiveram ligeira queda. Em seguida, logo após a dosagem da solução nutritiva, houve um aumento considerável seguido novamente de uma queda até a próxima dosagem de solução nutritiva.

Contudo, o *Lopping* Tratamento atingiu níveis mais elevados de DO<sub>600nm</sub> e se manteve mais estável ao longo do tempo, com uma DO<sub>600nm</sub> média de 1,4, do dia da inoculação em diante, enquanto o Controle, apresentou uma DO<sub>600nm</sub> média de 0,8 nesse mesmo período, conforme indicado pelas linhas tracejadas na **Figura 65**.



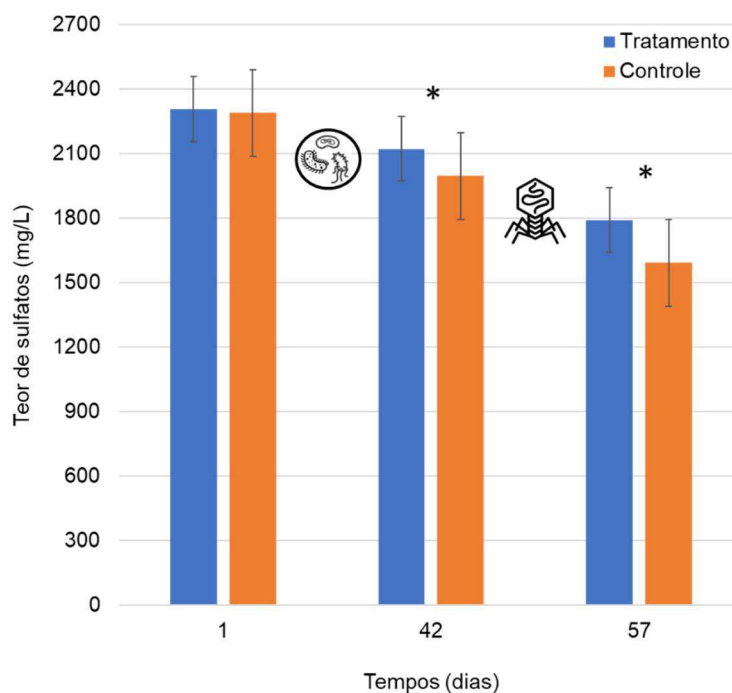
**Figura 65.** Resultados do monitoramento da densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ), nos sistemas Tratamento e Controle, ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. A seta preta indica a inoculação, as setas azuis indicam as dosagens da solução nutritiva e a seta verde indica a dosagem do coquetel fágico. Os números em círculos representam os tempos de coleta dos cupons.

#### 5.4.6. $H_2S$ dissolvido (mg/L)

Quanto às análises dos teores de  $H_2S$  dissolvidos no fluido circulante dos *Loopings*, todos os resultados obtidos ao longo dos ensaios, tanto no sistema Tratamento quanto no Controle, ficaram abaixo dos limites detectáveis e de interferência, ou seja, abaixo dos valores obtidos com o “branco” (água do mar natural sem adição de inóculo) e, portanto, não foram representados graficamente.

#### 5.4.7. Sulfatos (mg/L)

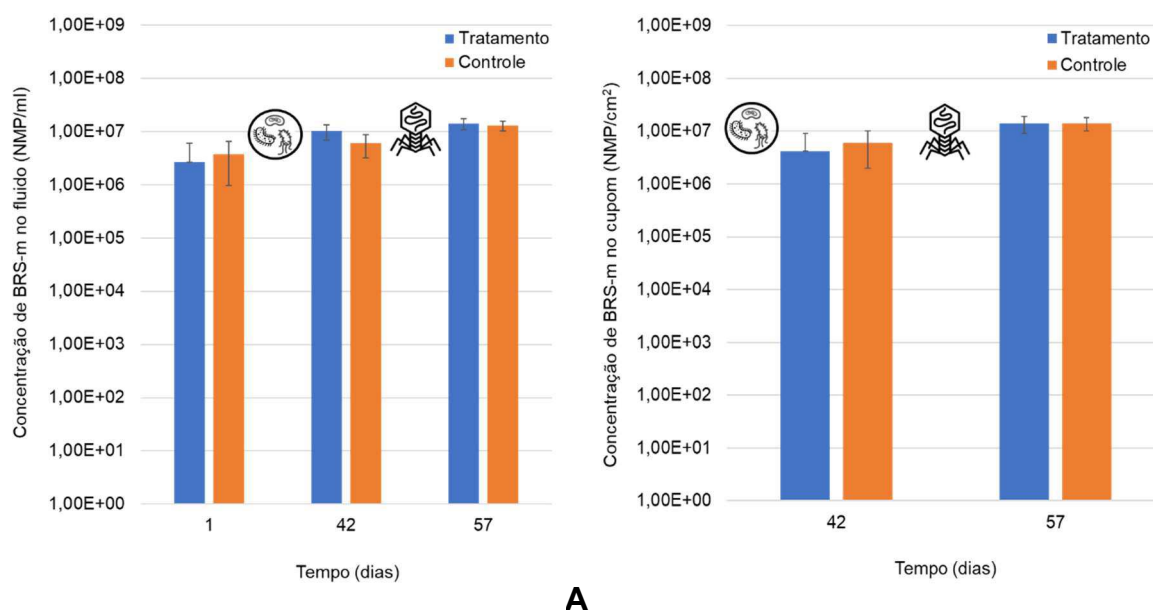
Já os teores de sulfato encontrados nos 3 tempos avaliados (1º, 42º e 57º dia), são apresentados na **Figura 66**, onde observa-se uma redução nos teores ao longo do tempo de modo que ao final, os teores de sulfato no Controle foram inferiores ao Tratamento.



**Figura 66.** Resultados do monitoramento dos teores de sulfato nos sistemas Tratamento e Controle amostrados ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

#### 5.4.8. BRS (NMP/ml e NMP/cm<sup>2</sup>)

Em relação às concentrações de BRS quantificadas pela técnica do NMP (**Figura 67**), não foram observadas grandes diferenças. No fluido, já no início dos ensaios (1º dia) as quantificações encontravam-se elevadas (na ordem de  $10^6$  NMP/ml), atingindo valores de  $10^7$  NMP/ml no 42º dia e assim permaneceram até o final, tal como nos cupons, onde também permaneceram próximas de  $10^7$  NMP/ml tanto no 42º dia (pré-fagos) quanto no 57º dia (pós-fagos).

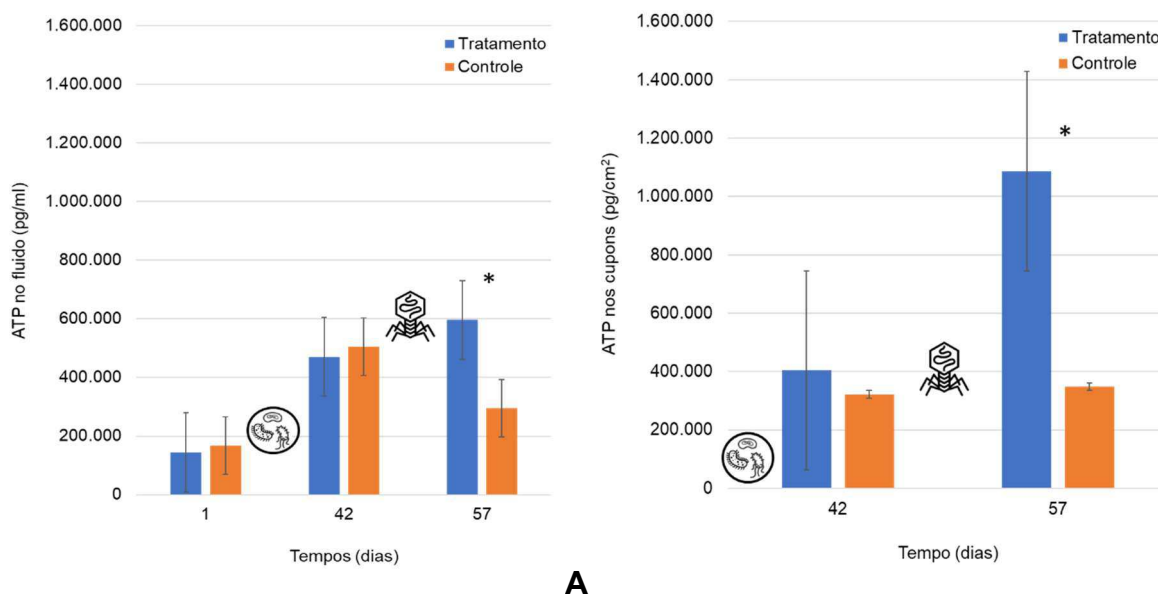


**Figura 67.** Resultados das análises de quantificação de BRS, pela técnica do NMP, no fluido (NMP/ml) **(A)** e nos cupons (NMP/cm<sup>2</sup>) **(B)** nos sistemas Tratamento e Controle amostrados ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV.

#### 5.4.9. ATP (pg/ml e pg/cm<sup>2</sup>)

Quanto ao ATP medido no fluido no 1<sup>o</sup>, 42<sup>o</sup> e 57<sup>o</sup> dia (**Figura 68A**) observa-se que ele se encontrava baixo no início dos ensaios e aumentou equitativamente em torno de 70% em ambos os sistemas após a inoculação. Contudo, após a dosagem do coquetel fágico, observa-se que enquanto no Tratamento ele aumentou cerca de 20% em relação ao 42<sup>o</sup> dia (pré-fagos), no Controle diminuiu aproximadamente 40%.

Já o ATP medido nos cupons coletados (**Figura 68B**) aumentou em torno de 60% do 42<sup>o</sup> para 57<sup>o</sup> dia no Tratamento, enquanto permaneceu praticamente o mesmo no Controle.

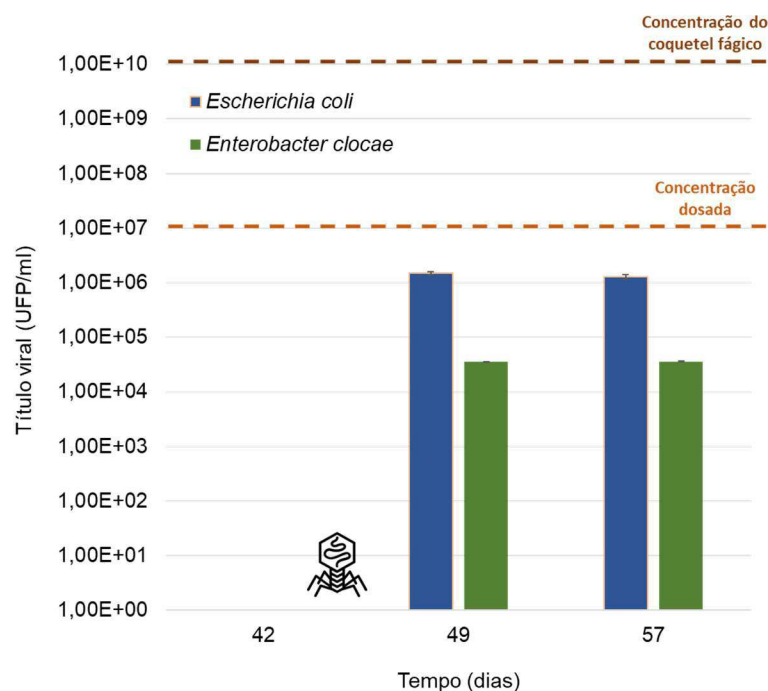


**Figura 68.** Resultados das análises de quantificação de ATP no fluido (pg/ml) **(A)** e nos cupons (pg/cm<sup>2</sup>) **(B)** nos sistemas Tratamento e Controle amostrados ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey (P≤0,05).

#### 5.4.10. Título viral (UFP/ml)

A **Figura 69** apresenta os resultados de determinação do título viral em UFP/ml (estimativa do número de partículas virais) no fluido circulante no *Looping* Tratamento, no 42º dia (antes da dosagem do coquetel fágico) e no 49º e 57º dia, para cada uma das bactérias hospedeiras dos fagos que compõem o coquetel, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*.

Observa-se que antes da dosagem do coquetel (42º dia) nenhum fago capaz de utilizar alguma das bactérias hospedeiras se fazia presente no sistema e após uma semana (49º dia) as concentrações dos fagos de *E.coli* encontravam-se na ordem de 10<sup>6</sup> UFP/ml, enquanto do fago de *E. cloacae*, encontrava-se na ordem de 10<sup>4</sup> UFP/ml, permanecendo assim até o último tempo avaliado (57º dia).



**Figura 69.** Resultados das determinações do título viral (estimativa do número de partículas virais) em UPF/ml, para cada uma das bactérias hospedeiras, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, no fluido circulante no *Looping* Tratamento no 42º dia (pré-fagos) e no 49º e 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV.

#### 5.4.11. MEV

Quanto aos cupons destinados ao MEV para visualização e análise qualitativa do biofilme, ocorreram problemas de preservação das amostras que não permitiram a obtenção de imagens adequadas, sendo assim, infelizmente, tais análises comparativas dos cupons não puderam ser realizadas.

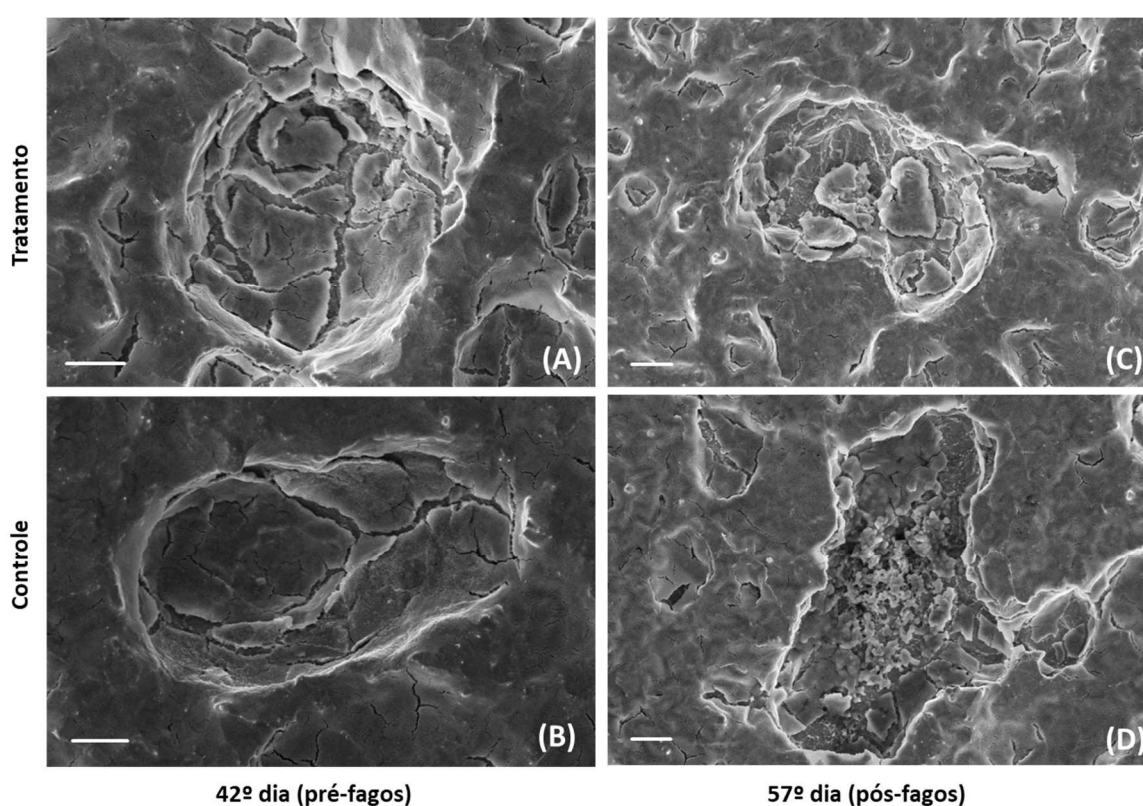
Entretanto, adicionalmente, foram aproveitados os cupons processados para as análises de perda de massa, para realizar uma análise preliminar por MEV, com o objetivo de se verificar uma possível formação de pits e se obter um referencial nos tempos dos ensaios realizados, visando a aplicação dessa técnica também nesses cupons em novos ensaios no futuro.

Portanto, a **Figura 70** apresenta as imagens de MEV obtidas nos cupons destinados à perda de massa (ou seja, os cupons já estavam decapados e limpos, para remoção do biofilme e dos resíduos de corrosão).

As imagens A e B da **Figura 70** ilustram o aspecto morfológico dos cupons coletados respectivamente nos *Loopings* Tratamento e Controle no 42º dia (pré-

fagos), enquanto as imagens C e D ilustram os cupons dos *Loopings* Tratamento e Controle no 57º dia (pós-fagos).

Antes da dosagem do coquetel fágico (42º dia), foram observados pits de corrosão semelhantes em tamanho e profundidade em ambos os sistemas, como ilustrado pelas **Figuras 70A e 70B**. Contudo, após a dosagem do coquetel (57º dia), observa-se que aparentemente os cupons do *Looping* Controle apresentaram pits de maior tamanho e sobretudo maior profundidade (**Figura 70D**), em comparação aos cupons do *Looping* Tratamento (**Figura 70C**).

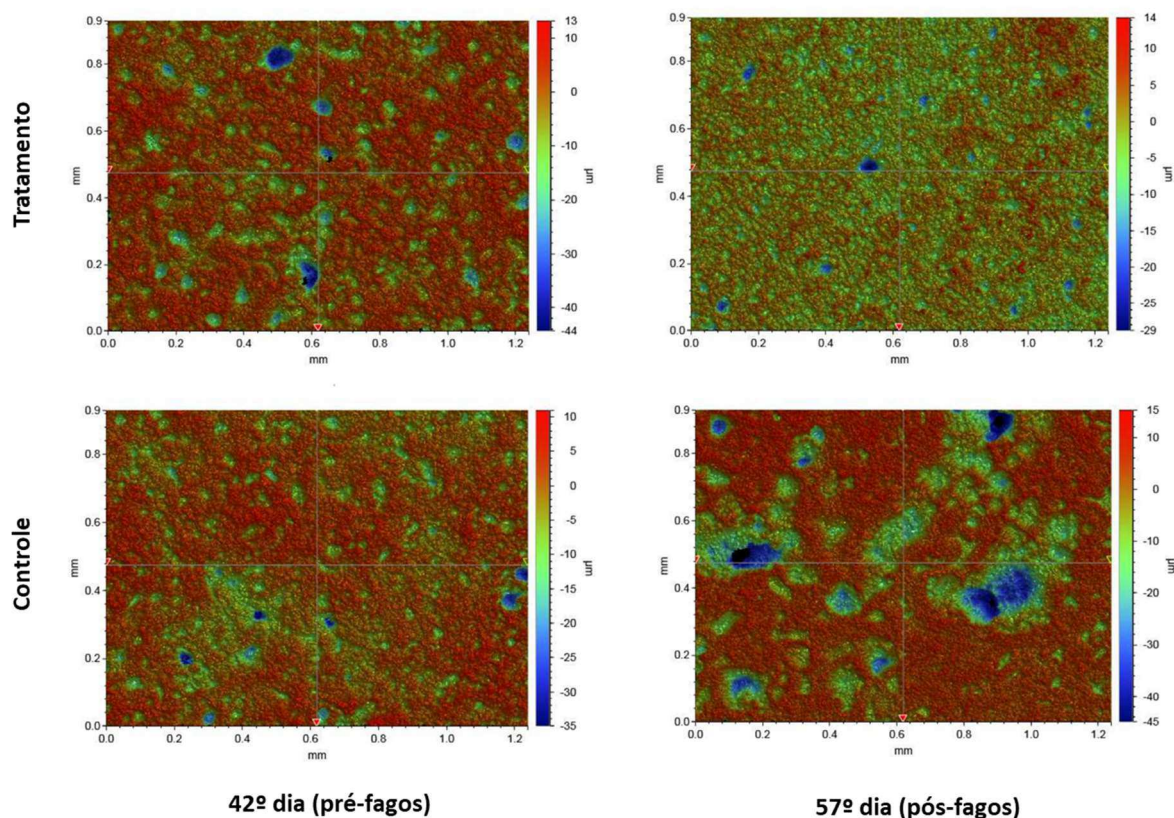


**Figura 70.** Imagens da MEV obtidas a partir dos cupons destinados às análises de perda de massa, amostrados nos sistemas Tratamento e Controle no 42º dia (pré-fagos) e no 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV. **(A)** Tratamento pré-fagos; **(B)** Controle pré-fagos; **(C)** Tratamento pós-fagos; e, **(D)** Controle pós-fagos. As barras de escala representadas referem-se a 10  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.12. Perfilometria óptica e rugosidade média quadrática – $R_q$ ( $\mu\text{m}$ )

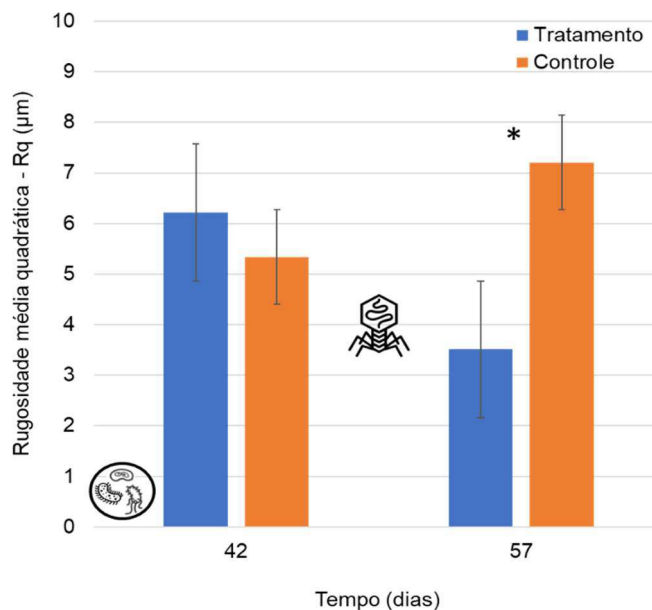
A mesma tendência observada nas imagens de MEV foi vista também nas imagens de perfilometria óptica (**Figura 71**), onde aparentemente, os pits observados nos cupons do Controle no 57º dia (pós-fagos) aumentaram consideravelmente em tamanho e profundidade (áreas em azul) em relação ao 42º dia (pré-fagos), enquanto

os cupons do Tratamento ao 57º dia (pós-fagos) permaneceram muito semelhantes aos cupons do 42º dia (pré-fagos), não apresentando diferença visual em relação ao tamanho e profundidade dos pits.



**Figura 71.** Imagens da Perfilometria Óptica obtidas a partir dos cupons destinados às análises de perda de massa, amostrados nos sistemas Tratamento e Controle no 42º dia (pré-fagos) e no 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV.

Da mesma forma, na determinação da  $R_q$  ( $\mu\text{m}$ ) (**Figura 72**), observa-se que até o momento da dosagem do coquetel fágico (42º dia) não havia diferença significativa entre os cupons de ambos os sistemas, contudo, ao final dos ensaios (57º dia), a diferença entre o Tratamento e o Controle foi significativa, com o Controle apresentando uma rugosidade 51% maior que o Tratamento.

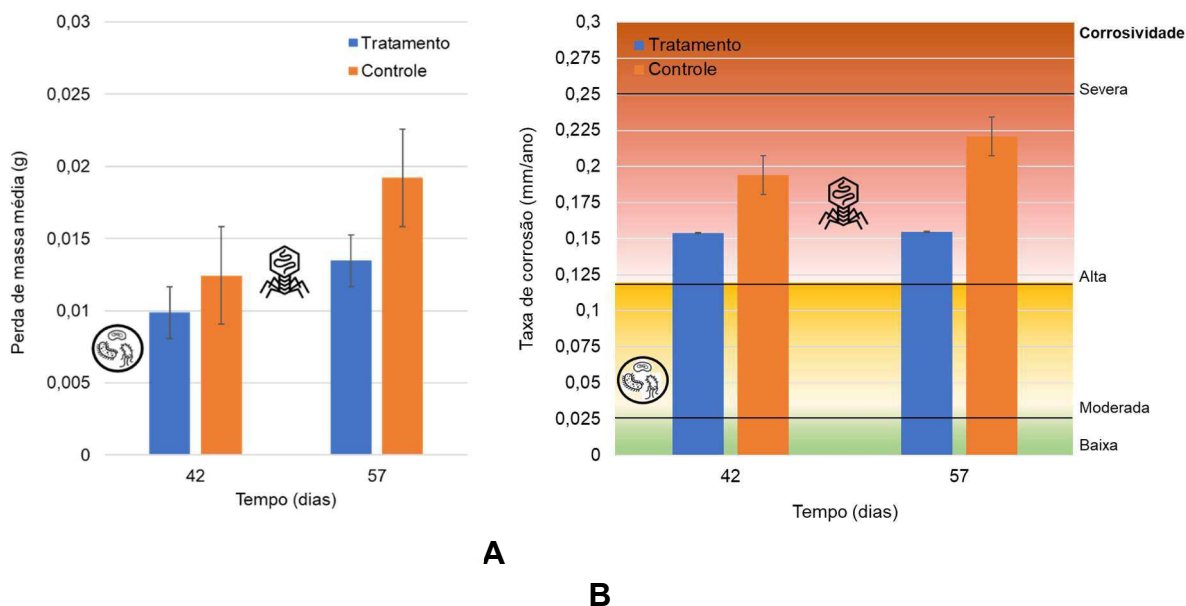


**Figura 72.** Resultados das determinações de Rugosidade Média Quadrática – Rq ( $\mu\text{m}$ ) obtidas a partir dos cupons amostrados nos sistemas Tratamento e Controle no 42º dia (pré-fagos) e no 57º dia (pós-fagos) de ensaios nos *Loopings* da UFV. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

#### 5.4.13. Taxa de corrosão

Por fim, a **Figura 73A** apresenta as medidas de perda de massa (g) e a **Figura 73B** apresenta os resultados da determinação das taxas de corrosão (mm/ano). Os dados obtidos demonstram que no 42º dia, as taxas de corrosão já eram classificadas como altas em ambos os sistemas, apesar de serem cerca de 20% menores no Tratamento.

Contudo, no 57º dia, enquanto a taxa de corrosão do Tratamento permaneceu inalterada (em torno de 0,154 mm/ano), no Controle ela aumentou (para 0,221 mm/ano), atingindo uma diferença em relação ao Tratamento de cerca de 30%, chegando assim, mais próxima ao limite de classificação severa (0,25 mm/ano) conforme demarcações representadas na **Figura 73B**.



**Figura 73.** Resultados das análises de perda de massa **(A)** e determinação das taxas de corrosão **(B)** dos cupons amostrados nos sistemas Tratamento e Controle ao longo dos ensaios nos *Loopings* da UFV.

## 5.5. AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERIÓFAGOS

### 5.5.1. Ecotoxicidade

A **Tabela 21** apresenta os resultados de  $CE_{50_{15min}}$  dos produtos avaliados quanto à ecotoxicidade aguda para ambientes marinhos através do sistema Microtox®, utilizando a bactéria *V. fischeri* como organismo teste.

Observa-se que ambos os produtos biocidas apresentaram ecotoxicidade bastante elevada ( $CE_{50} > 10^{-5} \%$ ), sendo de 0,0000134% para o biocida padrão e 0,0000084% para o biocida específico para tanques. Já o coquetel fágico nas duas concentrações ( $10^9$  e  $10^7$  UFP/ml) e o meio LB residual apresentaram ecotoxicidade bem mais baixa em relação aos biocidas, porém, ainda com valores razoáveis ( $CE_{50}$  variando em torno de 10 a 40%).

Por sua vez, o meio LB residual apresentou ecotoxicidade maior que a do coquetel, com  $CE_{50}$  em torno de 13%. Entre as duas concentrações do coquetel, a  $CE_{50}$  foi de 24 % para a maior concentração ( $10^9$  UFP/ml) e de 41% para a menor concentração ( $10^7$  UFP/ml).

**Tabela 21.** Resultados de ecotoxicidade aguda para ambientes marinhos pelo sistema Microtox®, utilizando a bactéria *Vibrio fischeri* como organismo teste.

Produtos	CE50 <sub>15min</sub> (%)
Coquetel fágico (10 <sup>7</sup> UFP/ml)	41,03
Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml)	24,04
Meio LB residual	13,47
Biocida padrão (THPS 75%)	0,0000134
Biocida para tanques (THPS 40%)	0,0000084

### 5.5.2. Biodegradabilidade

A **Tabela 22** apresenta os resultados de determinação da DQO dos produtos avaliados e a DBOt máxima estimada (em mg de O<sub>2</sub>/mg de substância teste), considerando a biodegradabilidade total dos componentes do produto.

Observa-se que a DQO do meio LB residual e do coquetel fágico são próximas, em torno de 16 a 17.000 mg/L, respectivamente, enquanto a DQO dos produtos biocidas é bem maior, em torno de 1.100.000 mg/L para o biocida padrão e 600.000 mg/L para o biocida de tanques.

**Tabela 22.** Resultados das análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) para cada produto avaliado no teste de biodegradabilidade (%D) e respectivos valores estimados de Demanda Bioquímica de Oxigênio teórica (DBOt).

Produtos	DQO (mg/L)	DBOt (mg O <sub>2</sub> /mg de substância teste)
Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml)	17.246,44	17,24644
Meio LB residual	16.012,38	16,01238
Biocida padrão (THPS 75%)	1.125.465,69	1.125,46569
Biocida para tanques (THPS 40%)	633.458,20	633,45820

A **Tabela 23** apresenta os valores de O<sub>2</sub> (mg/L) determinados no tempo 0 (zero) e a cada dia de ensaio avaliado (7, 14 e 28 dias). Os dados dos controles da toxicidade e controles físico-químicos de cada uma das substâncias avaliadas foram suprimidos na **Tabela 23** a fim de facilitar a visualização e interpretação dos resultados, uma vez que a comparação de maior interesse, neste caso, diz respeito aos resultados do consumo de O<sub>2</sub> corrigidos pelo valor controle branco, apresentados na **Tabela 24**.

Observa-se um alto consumo do O<sub>2</sub> na substância de referência, contudo, em todos os demais produtos avaliados, os valores de O<sub>2</sub> são bem próximos dos valores do controle branco (**Tabela 23**), ou seja, praticamente não há consumo do O<sub>2</sub>. Este resultado fica evidenciado quando se faz a correção desse consumo pelos valores obtidos no controle branco (**Tabela 24**).

Já quanto aos controles da toxicidade, em todos os produtos observam-se valores próximos aos da substância de referência e em todos os controles físico-químicos observam-se valores baixos, próximos de 0 (zero), tal como nos produtos avaliados (**Tabela 24**).

**Tabela 23.** Teores de O<sub>2</sub> (mg/L) determinados nas duplicatas de cada produto avaliado, nos tempos de 0 (zero), 7, 14 e 28 dias de ensaio.

	Produto	Frasco	Teores de O <sub>2</sub> (mg/L) a cada x dias			
			0	7	14	28
1	Controle branco	1	7,0	6,6	6,4	6,6
		2	7,0	6,6	6,4	6,6
		<b>Média</b>	<b>7,0</b>	<b>6,6</b>	<b>6,4</b>	<b>6,6</b>
2	Substância de referência (benzoato de sódio)	1	7,2	4,4	4,0	3,4
		2	7,0	4,2	4,0	3,4
		<b>Média</b>	<b>7,1</b>	<b>4,3</b>	<b>4,0</b>	<b>3,4</b>
3	Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml)	1	7,2	6,2	6,2	6,0
		2	7,2	6,2	6,2	6,0
		<b>Média</b>	<b>7,2</b>	<b>6,2</b>	<b>6,2</b>	<b>6,0</b>
4	Meio LB residual	1	7,2	6,4	6,4	6,4
		2	7,2	6,4	6,4	6,4
		<b>Média</b>	<b>7,2</b>	<b>6,4</b>	<b>6,4</b>	<b>6,4</b>
5	Biocida padrão (THPS 75%)	1	7,0	6,4	6,4	6,2
		2	7,0	6,4	6,4	6,2
		<b>Média</b>	<b>7,0</b>	<b>6,4</b>	<b>6,4</b>	<b>6,2</b>
6	Biocida para tanques (THPS 40%)	1	7,2	6,6	6,6	6,4
		2	7,2	6,6	6,6	6,4
		<b>Média</b>	<b>7,2</b>	<b>6,6</b>	<b>6,6</b>	<b>6,4</b>

**Tabela 24.** Resultados de consumo de O<sub>2</sub> de cada produto avaliado, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de ensaio.

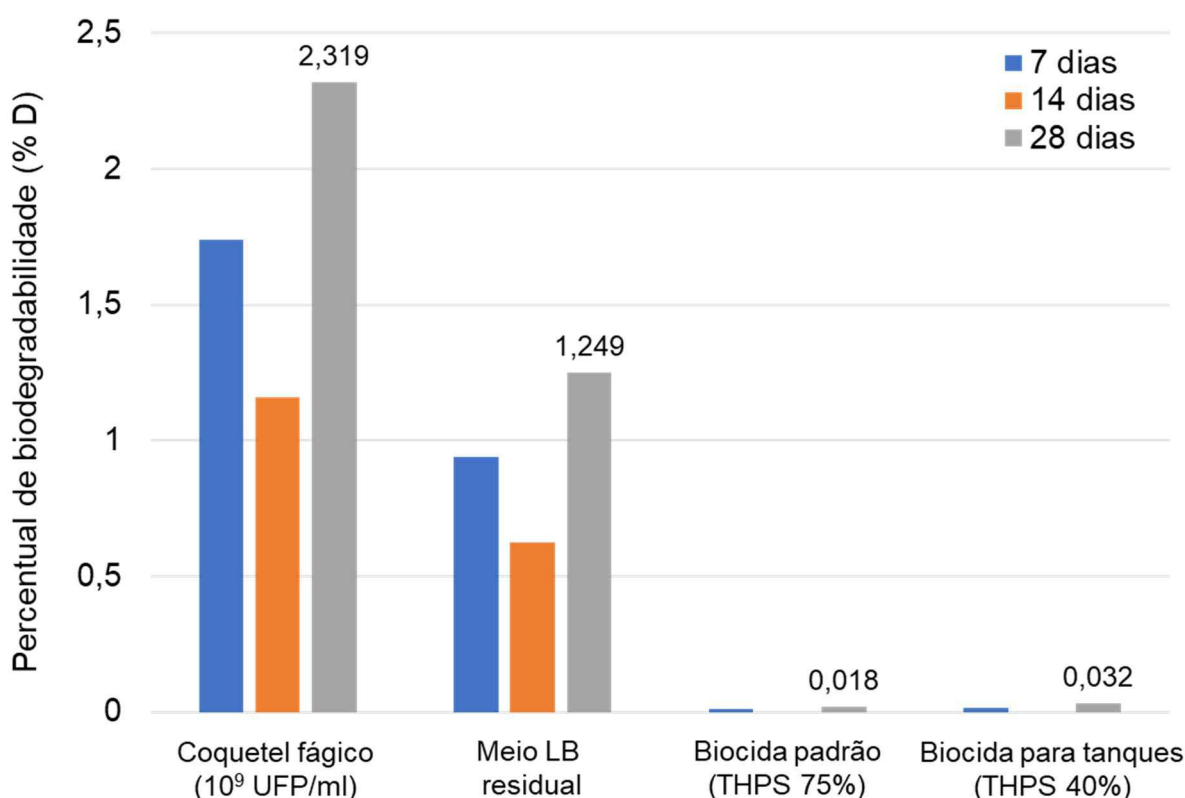
	Produto	Consumo de O <sub>2</sub> (mg/L)* a cada x dias		
		7	14	28
1	Substância de referência (benzoato de sódio)	2,4	2,5	3,3
2	Controle da toxicidade (coquetel fágico)	2,6	3,0	3,0
3	Controle da toxicidade (meio LB residual)	2,4	2,7	3,2
4	Controle da toxicidade (biocida THPS 75%)	2,3	2,4	3,6
5	Controle da toxicidade (biocida THPS 40%)	2,8	2,6	3,8
6	Controle físico-químico (coquetel fágico)	0,2	0,0	-0,2
7	Controle físico-químico (meio LB residual)	0,2	0,0	0,0
8	Controle físico-químico (biocida THPS 75%)	0,0	0,2	0,3
9	Controle físico-químico (biocida THPS 40%)	0,0	-0,2	0,2
10	Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml)	0,6	0,4	0,8
11	Meio LB residual	0,3	0,2	0,4
12	Biocida padrão (THPS 75%)	0,2	0,0	0,4
13	Biocida para tanques (THPS 40%)	0,2	0,0	0,4

\* Consumo de O<sub>2</sub> (mg/L) = (m<sub>t0</sub> - m<sub>tx</sub>) - (m<sub>b0</sub> - m<sub>btx</sub>)

A **Tabela 25** e a **Figura 74**, apresentam os percentuais de biodegradabilidade (%D) dos produtos avaliados nos tempos de 7, 14 e 28 dias, calculados conforme a fórmula apresentada anteriormente (item 4.6.2.). Considerando o tempo de 28 dias, observa-se que a substância de referência apresentou biodegradabilidade alta e adequada, em torno de 87%, já os produtos avaliados apresentaram biodegradabilidade muito baixa, os biocidas tiveram resultados próximos de 0 (zero), enquanto a biodegradabilidade do coquetel fágico e do meio LB residual ficaram em torno de 2 e 1%, respectivamente.

**Tabela 25.** Resultados de biodegradabilidade (%D) de cada produto avaliado, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de ensaio.

	Produto	Percentual de biodegradabilidade (%D) a cada x dias		
		7	14	28
1	Substância de referência (benzoato de sódio)	63,281	65,918	87,012
2	Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml)	1,739	1,160	2,319
3	Meio LB residual	0,937	0,625	1,249
4	Biocida padrão (THPS 75%)	0,009	0,000	0,018
5	Biocida para tanques (THPS 40%)	0,016	0,000	0,032



**Figura 74.** Resultados de biodegradabilidade (%D) de cada produto avaliado, nos tempos de 7, 14 e 28 dias de ensaio.

### 5.5.3. Corrosividade

A **Tabela 26** apresenta os resultados individuais de cada uma das triplicatas dos corpos de prova quanto aos valores medidos para a área (A) dos cupons (excluindo-se a área dos furos); da massa dos cupons ao início ( $m_{inicial}$ ) e ao final ( $m_{final}$ ) dos ensaios; da massa dos cupons após a decapagem ( $m_{decapagem}$ ); da variação

de massa ( $\Delta m$ ) dos cupons e das respectivas taxas de corrosão (TxCor) calculadas conforme a fórmula apresentada anteriormente no item 4.6.3. (ASTM INTERNATIONAL, 2017).

Observa-se que as taxas de corrosão para o controle, o coquetel fágico e o biocida para tanques foram baixas, enquanto a taxa de corrosão do biocida padrão atingiu valores moderados.

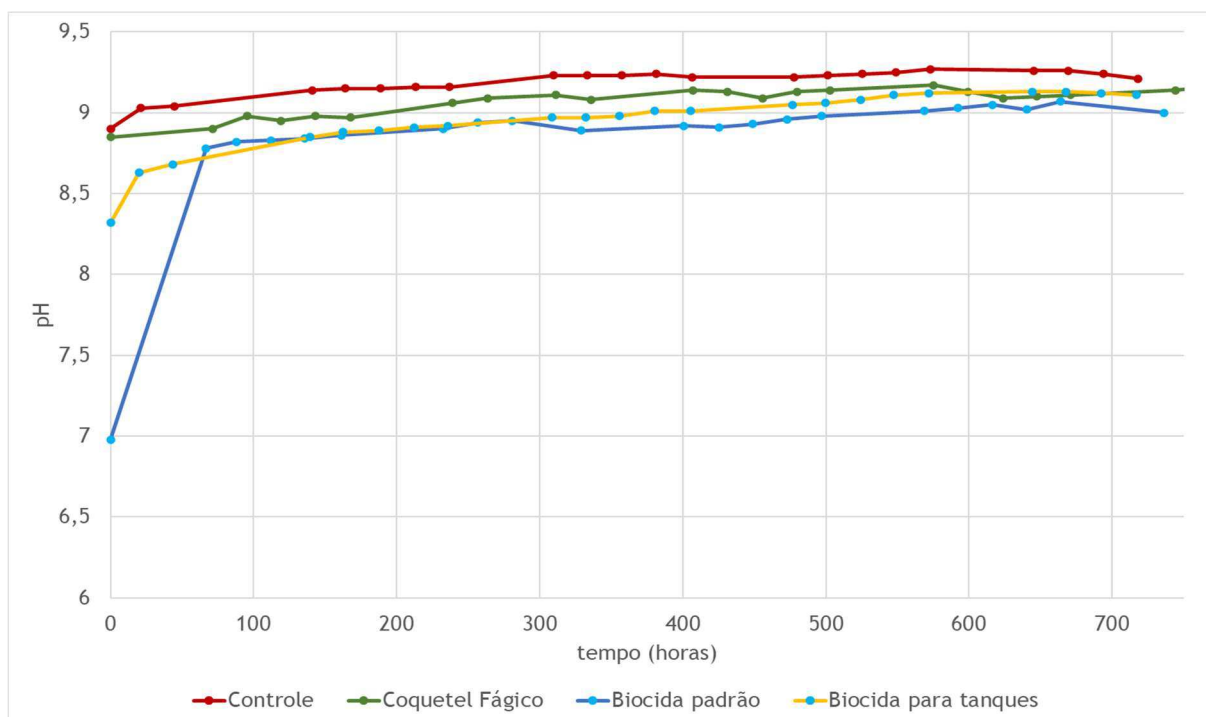
**Tabela 26.** Resultados das medidas de área (A); massa dos corpos de prova ao início ( $m_{inicial}$ ) e ao final ( $m_{final}$ ) dos ensaios; após a decapagem ( $m_{decapagem}$ ); variação de massa ( $\Delta m$ ) dos cupons e respectivas taxas de corrosão (TxCor) calculadas.

Ensaio	Cupom	A (cm <sup>2</sup> )	$m_{inicial}$ (g)	$m_{final}$ (g)	$m_{decapado}$ (g)	Dm (g)	TxCor (mm/ano)
Controle (água do mar natural filtrada e estéril)	1	13,974	9,2963	9,2901	9,2786	0,0177	0,020
	2	13,978	9,3211	9,3141	9,3004	0,0207	0,023
	3	13,999	9,2987	9,2911	9,2780	0,0207	0,023
Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml) Dosado em 10 <sup>7</sup> UFP/ml	1	13,964	9,3202	9,3204	9,3060	0,0142	0,015
	2	13,958	9,2971	9,2969	9,2829	0,0142	0,015
	3	13,909	9,2406	9,2410	9,2271	0,0135	0,014
Biocida padrão (THPS 75%) Dosado em 200 ppm	1	14,053	9,2704	9,2657	9,2377	0,0327	0,035
	2	13,997	9,2346	9,2305	9,2056	0,0290	0,031
	3	13,976	9,2656	9,2594	9,2391	0,0265	0,028
Biocida para tanques (THPS 40%) Dosado em 200 ppm	1	13,953	9,2927	9,2890	9,2776	0,0151	0,017
	2	13,969	9,2860	9,2827	9,2743	0,0117	0,013
	3	13,943	9,2975	9,2948	9,2878	0,0097	0,011

A **Tabela 27** apresenta os valores de pH medidos em cada produto puro e a **Figura 75** apresenta os valores de pH medidos no fluido de teste ao longo de todos os ensaios de corrosividade.

**Tabela 27.** Valores de pH medidos nos produtos puros.

Produto	pH
Coquetel fágico (10 <sup>9</sup> UFP/ml)	7,90
Biocida padrão (THPS 75%)	3,60
Biocida para tanques (THPS 40%)	3,16

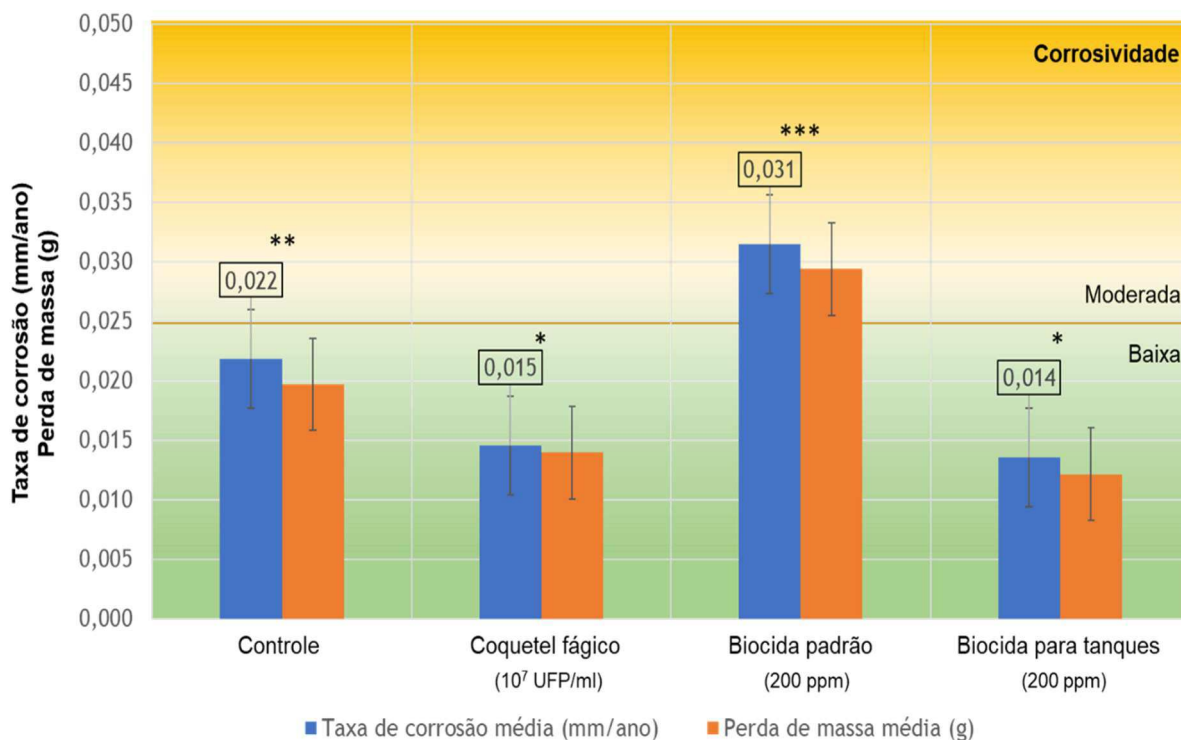


**Figura 75.** Valores de pH medidos ao longo dos ensaios de corrosividade.

Observa-se que o pH de ambos os produtos biocida puros é bastante baixo, em torno de 3,0, enquanto o pH do coquetel fágico é praticamente neutro, na faixa de 7,0 (próximo de 8,0).

Ao longo dos ensaios de corrosividade, observa-se que o pH do fluido após a dosagem dos biocidas na concentração avaliada (200 ppm) se inicia em torno de 7,0 e 8,3 respectivamente para os biocidas padrão e de tanques, porém rapidamente aumenta nas primeiras horas dos ensaios e depois aumenta gradualmente, na faixa de 8,6 a 9,1, ao longo do tempo. Já o pH do fluido imediatamente após a dosagem do coquetel fágico na concentração avaliada ( $10^7$  UFP/ml) é equivalente ao pH do controle e permanece semelhante, na faixa de 8,9 a 9,1 ao longo de todo o tempo.

A **Figura 76** apresenta graficamente os valores médios das taxas de corrosão (mm/ano) e das perdas de massa (g) obtidos em cada um dos ensaios de corrosividade. Novamente é possível visualizar que as taxas de corrosão do controle, do coquetel fágico e do biocida para tanques foram baixas, enquanto o biocida padrão atingiu uma corrosividade moderada, cujo limite (0,025 mm/ano) foi demarcado no gráfico pela linha laranja.

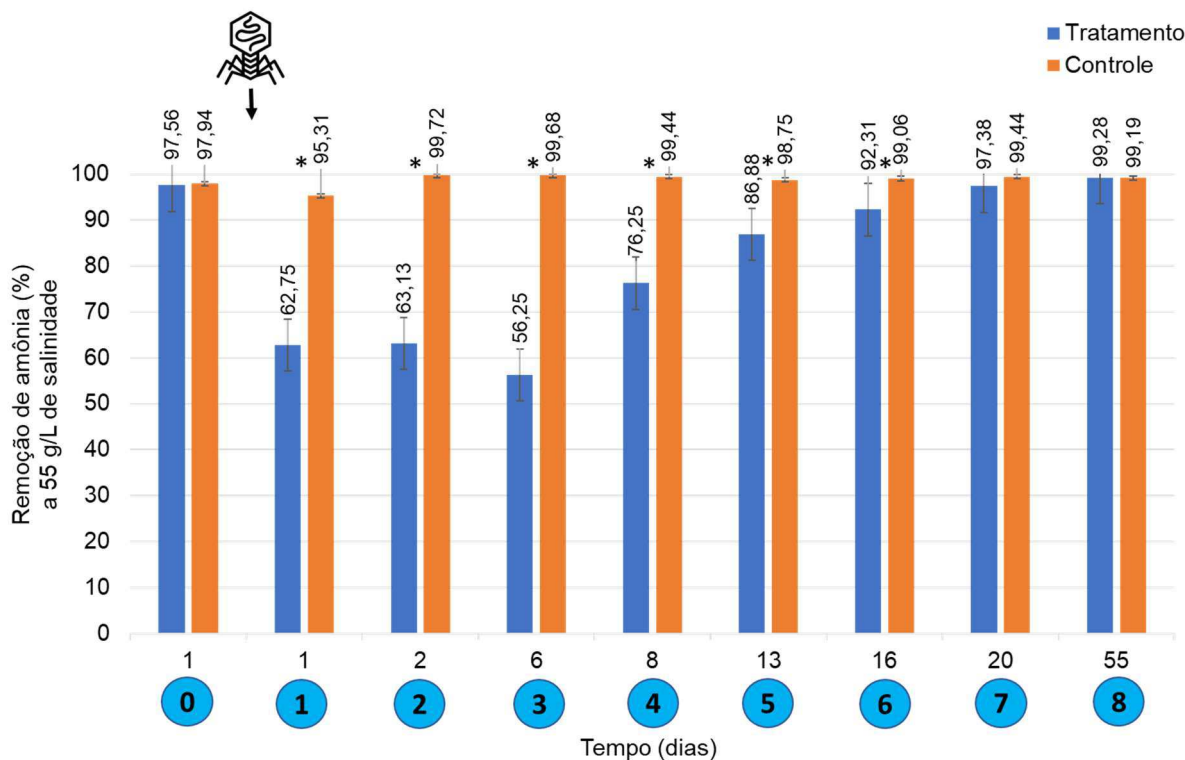


**Figura 76.** Taxas de corrosão (mm/ano) e perdas de massa (g) médias obtidas em cada um dos ensaios de corrosividade.

#### 5.5.4. Inibição do tratamento biológico de água de produção

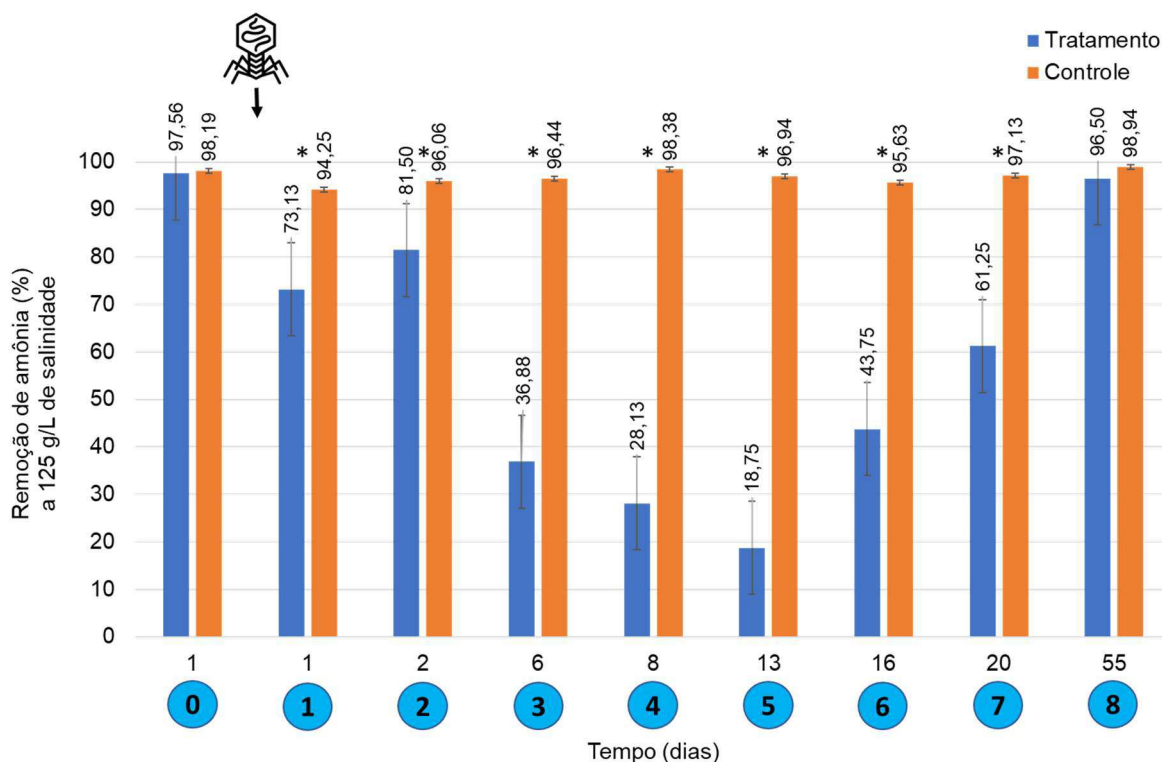
As **Figuras 77 e 78**, apresentam os resultados médios de remoção de amônia nos frascos Tratamento e Controle para as salinidades de 55 e 125 g/L de NaCl respectivamente. Observa-se que em ambas as salinidades, os controles permaneceram estáveis e com taxas de remoção de amônia bastante altas, próximas de 99% na maior parte do tempo.

No Tratamento a 55 g/L de salinidade observa-se que, imediatamente após a dosagem do coquetel fágico, houve uma queda na taxa de remoção de amônia nos primeiros dias, porém a taxa aumenta após cerca de 1 semana (8º dia) e se recupera totalmente a níveis acima de 90% de nitrificação após cerca de 2 semanas (16º dia) (**Figura 77**).



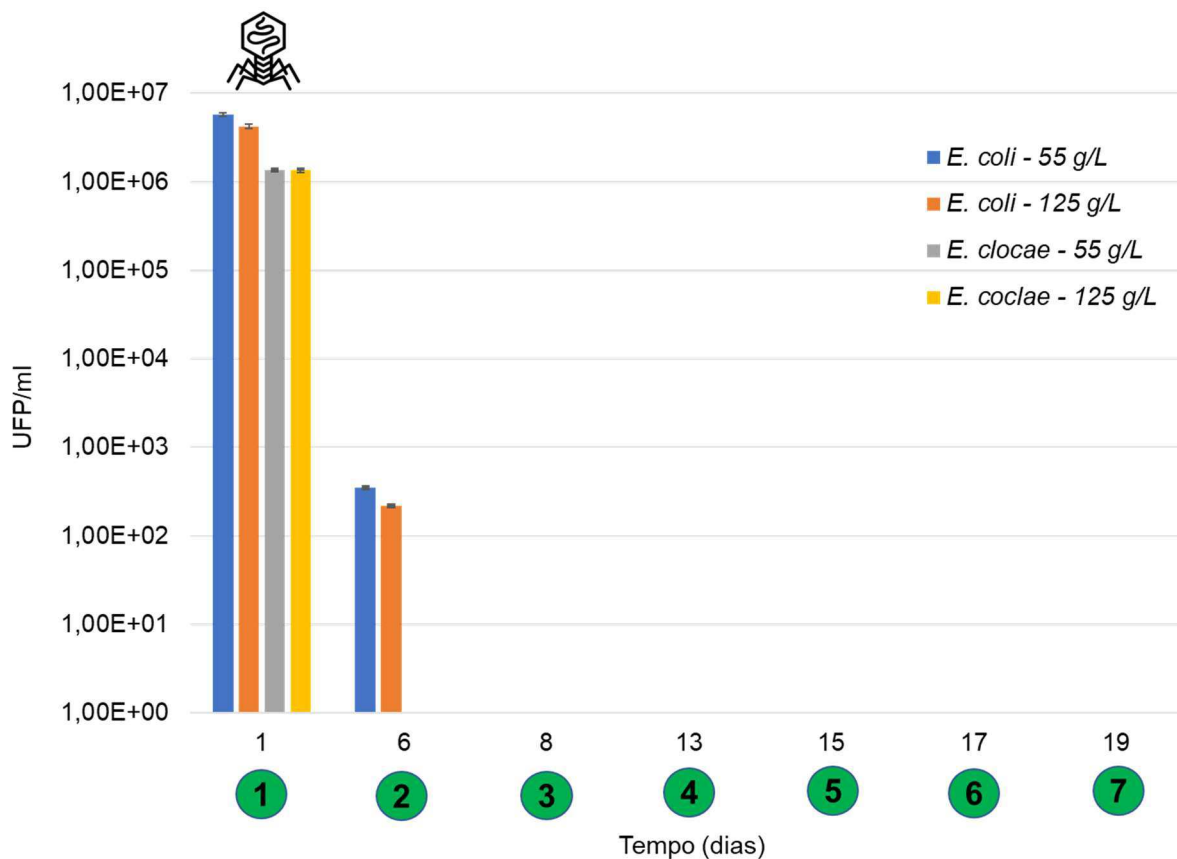
**Figura 77.** Taxas médias de remoção de amônia nos frascos Tratamento e Controle a 55 g/L de salinidade, dos ensaios de avaliação da potencial inibição do processo de nitrificação pelo coquetel fágico em sistemas de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. Os números em círculos azuis representam os tempos em que foram realizadas as quantificações de amônia. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Já nos tratamentos a 125 g/L de salinidade, observa-se que logo após a dosagem do coquetel fágico, ocorre uma queda na taxa de remoção de amônia, menor que aquela observada a 55 g/L de salinidade, acentuando-se nos dias subsequentes, iniciando sua recuperação a partir do 16º dia, porém não se recupera completamente até o final dos 20 dias avaliados. A recuperação da taxa de nitrificação em patamares superiores a 90% foi observada no último tempo analisado, ou seja, 35 dias depois de suspensas as análises semanais (**Figura 78**).



**Figura 78.** Taxas médias de remoção de amônia nos frascos Tratamento e Controle a 125 g/L de salinidade, dos ensaios de avaliação da potencial inibição do processo de nitrificação pelo coquetel fágico em sistemas de tratamento de água de produção em terminais de petróleo. Os números em círculos azuis representam os tempos em que foram realizadas as quantificações de amônia. (\*) diferença estatisticamente significativa entre Tratamento e Controle, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

E a **Figura 79** apresenta os resultados das quantificações de fagos na água de produção do interior dos frascos tratados ao longo do período de ensaio. Observa-se que, imediatamente após a dosagem do coquetel fágico, a concentração dos fagos em ambas as bactérias hospedeiras permanecem próximas à dosagem, ficando ligeiramente inferior para o fago de *Enterobacter*. A partir do 6º dia, as concentrações dos fagos de *E. coli* reduzem drasticamente, enquanto o fago de *Enterobacter* já não é mais detectado. E então, do 8º dia em diante, nenhum dos fagos é mais detectado nos sistemas.



**Figura 79.** Concentrações médias de fagos (UFP/ml) ao longo do tempo para cada uma das células hospedeiras (*Escherichia coli* e *Enterobacter clocae*) na água de produção dos frascos a 55 e 125 g/L de salinidade (NaCl), tratados com o coquetel fágico. Os números em círculos verdes representam os tempos em que foram realizadas as quantificações dos fagos.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. QUANTIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E INÓCULOS MICROBIANOS

Os resultados de quantificação de BRS-m e BANHT de campo realizados tanto no tanque *slop*, quanto nos tanques de armazenamento de petróleo, apresentaram níveis de contaminação considerados elevados, assim como as quantificações realizadas nas amostras coletadas.

As quantificações de BRS-m apresentaram níveis de contaminação equivalentes entre as plataformas e entre os tanques da mesma plataforma.

Nas amostras de tanques de armazenamento, foram realizadas adicionalmente as quantificações de BRS-t e BPA-a pertinentes à época da amostragem e ao cenário das amostras coletadas.

A quantificação de BRS-t foi realizada devido ao fato de o petróleo passar por uma etapa de aquecimento no separador de produção, para melhoria do escoamento durante o processamento. Na época, o método de quantificação de BRS-t já estava estabelecido como rotina operacional, portanto, considerou-se relevante investigar a presença desse grupo nesses tanques.

Sabe-se que em reservatórios de águas profundas, as BRS-t tendem a predominar em detrimento das BRS-m devido às temperaturas mais elevadas encontradas nesses ambientes. Por essa razão, um monitoramento baseado exclusivamente na quantificação das BRS-m não se correlaciona bem ao *souring* biogênico que ocorre nesses reservatórios e com os teores de H<sub>2</sub>S observados em seus poços produtores. Contudo, observou-se uma baixa concentração de BRS-t nos tanques de armazenamento, de modo que esse grupo não deve ser relevante para os problemas operacionais observados, e por isso não foi mantido para obtenção de inóculo microbiano.

Já a quantificação de BPA-a foi realizada, pois nessa época se observava que muitos biocidas comerciais apresentavam bom desempenho para BANHT e BRS-m em ensaios laboratoriais, mas eram muito pouco efetivos contra BPA-a. Assim, uma série de estudos se iniciaram em parceria com fabricantes e fornecedores de produtos biocidas para incluir a avaliação do desempenho dos produtos considerando também as BPA-a.

Além disso, o preparo do meio de cultivo para BPA-a foi adaptado para a técnica do NMP anaeróbico, permitindo sua execução também pelas unidades operacionais, uma vez que a quantificação em placas e em câmara de anaerobiose é inviável como rotina operacional na indústria do petróleo.

As concentrações observadas para BPA-a nas amostras de tanques de armazenamento foram elevadas, portanto esta cultura foi mantida para outros estudos. Porém, as BPA-a não foram utilizadas no contexto deste trabalho, uma vez que, em estudos anteriores, se observou que a mistura de uma cultura de BPA-a com uma de BRS-m, para formação de biofilmes em cupons metálicos, interfere negativamente no estabelecimento das BRS-m no biofilme (dados não publicados).

## 6.2. SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO

### 6.2.1. Concepção conceitual de um produto comercial aplicável

Com o objetivo de se obter um produto cujo desempenho tivesse maior abrangência e maiores chances de performance nas condições de sistemas reais, nos quais os microrganismos causadores dos problemas apresentam uma grande diversidade, se encontram prioritariamente em biofilmes e também são bastante diversos entre os vários cenários operacionais, e visando acelerar a obtenção de um produto mínimo viável (MVP – *minimal viable product*) a ser escalonado e testado em campo, o principal aspecto considerado para a concepção do coquetel fágico foi **priorizar a busca por fagos não-específicos** efetivos contra biofilmes, ao invés de focar na determinação de microrganismos-alvo e na busca pelos seus respectivos fagos específicos.

A grande maioria dos trabalhos científicos relacionados e patentes já depositadas (EYDAL et al., 2009; JOHNSON et al., 2017; SUMMER et al., 2011), qualquer que seja a área de aplicação, focam na identificação de um microrganismo-alvo e na busca incessante por um fago específico para este alvo, para só depois avaliar a performance em condições simuladas mais representativas. Contudo, diferentemente de aplicações de fagos nas áreas médicas, veterinária ou agrícola, onde na maioria das vezes, já existe um único ou poucos microrganismos-alvo que se pretende controlar, nos cenários operacionais da indústria do petróleo, a diversidade microbiana é enorme e ainda muito pouco conhecida.

Mesmo quando se direciona o olhar apenas para o universo das BRS, desconsiderando todos os demais tipos de microrganismos envolvidos na biocorrosão ou as relações sintróficas das BRS com outros grupos, a diversidade ainda é bastante ampla, e a determinação de uma ou algumas poucas espécies-alvo conduz a trabalhos de longa duração e pouco efetivos.

É verdade que se espera que no futuro, coquetéis fágicos comerciais contenham tanto fagos específicos como não-específicos, constituindo produtos abrangentes com a possibilidade de serem customizados aos cenários de aplicação. Por isso, a busca por fagos específicos não deve ser deixada de lado, mas a prioridade deste estudo foi dada à avaliação de fagos não-específicos ou promíscuos, com potencial ação não só sobre uma diversidade maior de hospedeiros, mas principalmente com ação potencial sobre a matriz dos biofilmes, devido à ação das enzimas normalmente presentes na cauda destes fagos.

Uma vez que os microrganismos responsáveis pelos problemas se encontram prioritariamente na forma de biofilmes, a matriz de EPS pode por si só representar uma barreira para o encontro de um fago específico com sua espécie-alvo. Em se tratando de BRS ou de microrganismos capazes de retirar elétrons diretamente do metal (considerados, portanto, mais corrosivos), provavelmente existe uma maior probabilidade dessas espécies-alvo estarem nas camadas mais profundas do biofilme, próximas à superfície metálica, do que nas camadas superficiais do biofilme. Ou seja, um fago específico precisaria ultrapassar mais barreiras e se difundir por um caminho mais longo para encontrar as células da sua espécie-alvo, resultando em menores chances de sucesso na prática.

Os fagos não-específicos com enzimas capazes de degradar as EPS da matriz dos biofilmes podem ser efetivos na desestruturação dos biofilmes, bem como para abrir caminho para os fagos específicos que vierem a fazer parte da formulação de um coquetel customizado.

Foi neste contexto que a prioridade por obter resultados com fagos não-específicos se consolidou como estratégia de pesquisa e permitiu o depósito da patente BR 10 2020 023886-8 (DIAS; DE PAULA; SOUSA, 2020).

### 6.2.2. Premissas de escalonamento para a viabilidade comercial

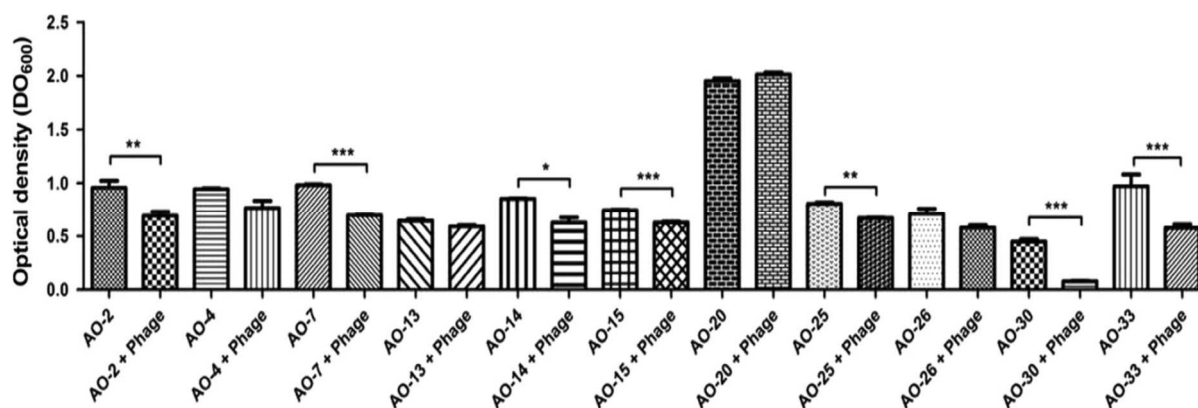
Ainda que exista amplo espaço para P&D e otimização, os processos de produção de fagos, considerando bactérias hospedeiras convencionais aeróbicas, estão razoavelmente consolidados, até mesmo em escala comercial (AGBOLUAJE; SAUVAGEAU, 2018), e a produção de preparações de fagos é considerada simples e econômica (SKURNIK; PAJUNEN; KILJUNEN, 2007).

Nesse sentido, a escolha pela priorização dos fagos não-específicos se complementa com as premissas de escalonamento e viabilidade comercial, uma vez que, considerando que as possíveis bactérias-alvo específicas que poderiam servir de hospedeiras para os cenários da indústria do petróleo provavelmente seriam bactérias anaeróbicas de crescimento lento, ou até mesmo sintróficas. Essas características já constituiriam empecilhos para uma produção comercial em grande escala e economicamente viável, em curto a médio prazo.

Além disso, um processo de produção de uma BRS altamente concentrada em biorreatores traria consigo todos os riscos ocupacionais relacionados à exposição ao H<sub>2</sub>S, bem como demandaria ligas metálicas bem mais resistentes que o próprio aço inoxidável, normalmente utilizado na construção destes biorreatores, como por exemplo as Ligas Resistentes à Corrosão (*Corrosion Resistant Alloys - CRAs*) (FERREIRA et al., 2018; SIRILATTHAPORN et al., 2023). Isso encareceria significativamente os custos de implantação, bem como tornaria inviável aproveitar fábricas já existentes, de empresas produtoras de células, como por exemplo, as produtoras de inoculantes para a agricultura.

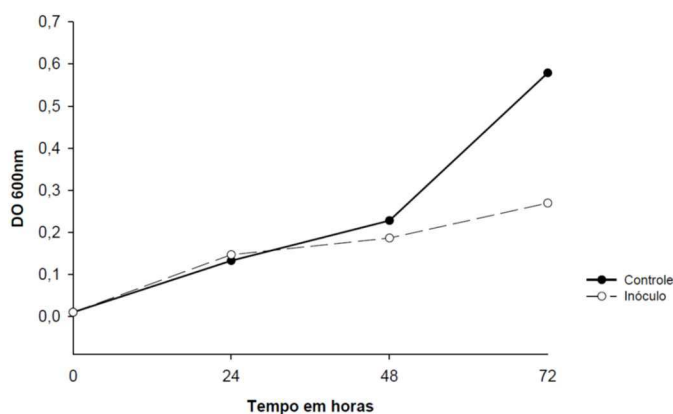
### 6.2.3. Maturidade e resultados das atividades de pesquisa aplicada

Conforme citado anteriormente, o desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos visando aplicações na indústria do petróleo vem sendo pesquisado pela UFV, em conjunto com o CENPES, desde 2010. Inicialmente, os estudos focaram na avaliação de fagos contra biofilmes formados em sistemas de osmose reversa para reúso de efluentes em refinarias de petróleo. Os resultados demonstraram a capacidade de um mesmo fago interferir na formação de biofilmes de diferentes bactérias isoladas do sistema, conforme a **Figura 80** (BELGINI et al., 2014).



**Figura 80.** Efeito de um bacteriófago sobre o biofilme formado por diferentes bactérias isoladas da água de alimentação de um sistema de osmose reversa de refinaria de petróleo (BELGINI et al., 2014; DIAS, 2014).

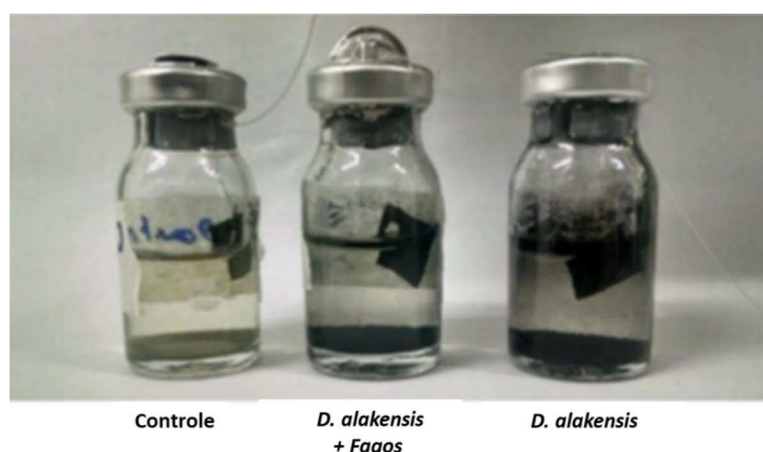
Posteriormente, os estudos passaram a focar nos problemas relacionados à biocorrosão e geração biogênica de  $H_2S$ , sobretudo pelas BRS. Várias amostras e culturas provenientes de sistemas operacionais foram utilizadas para o isolamento de BRS e foram avaliadas quanto à presença de fagos líticos, demonstrando o efeito dos fagos no crescimento microbiano, como no exemplo apresentado na **Figura 81**, que demonstra a redução no crescimento da cultura de BRS, quando na presença do fago.



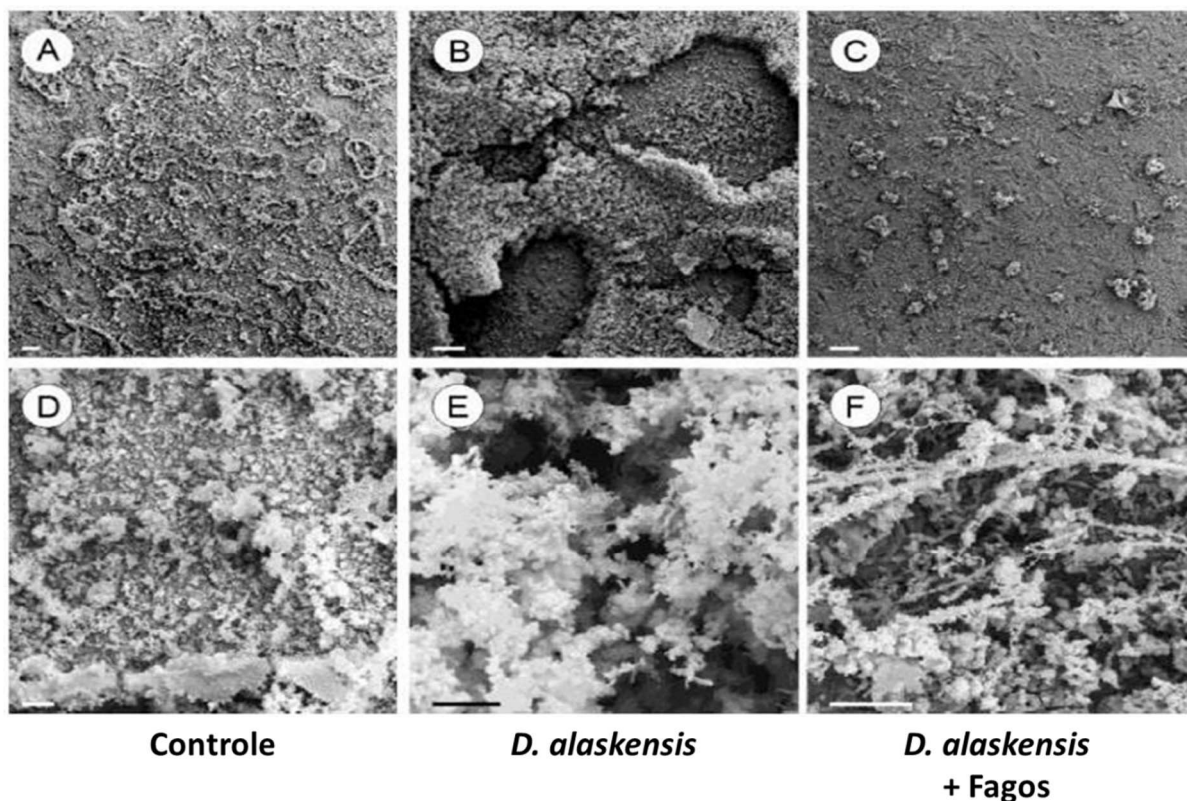
**Figura 81.** Curva de crescimento demonstrando a influência de um fago lítico sobre o crescimento de uma bactéria isolada de água de produção (LIVM e CENPES, dados não publicados).

Contudo, os melhores resultados de desempenho dos fagos foram obtidos quando foram utilizados fagos provenientes de ambientes distintos da indústria do petróleo, ou seja: fagos não-específicos, os quais provavelmente não eram comuns à comunidade microbiana das amostras utilizadas e, portanto, não adaptada, como os fagos de *E. coli*, isolados a partir de amostras ambientais.

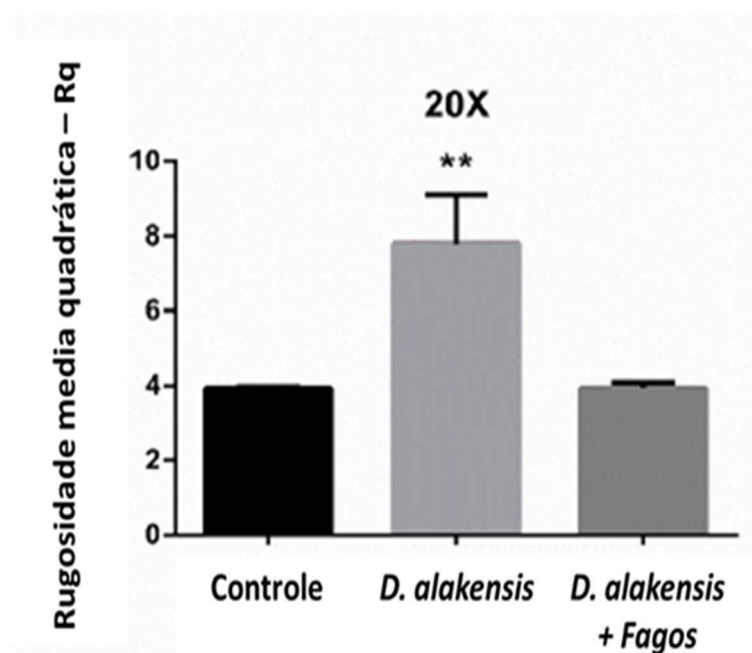
Estes fagos foram testados em culturas puras de BRS, como a *Desulfovibrio alaskensis*, que foi selecionada pelo fato de ser um gênero comumente encontrado em amostras de águas de produção. Os ensaios com *D. alaskensis* (**Figura 82**) demonstraram um efeito inibitório de um coquetel fágico não-específico na formação do biofilme em cupons metálicos, conforme observado por análises de MEV (**Figura 83**) e perfilometria óptica (**Figura 84**). Este efeito pode ser atribuído à presença de enzimas do tipo depolimerases (HUGHES; SUTHERLAND; JONES, 1998), capazes de atuar na degradação das EPS dos biofilmes, corroborando com outros estudos, como por exemplo, o de CHHIBBER; KAUR e KAUR (2013), que demonstrou que a ação de fagos que possuíam depolimerases preveniu a formação de biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*, efeito que não foi observado com fagos sem esse tipo de enzima.



**Figura 82.** Ensaios preliminares de avaliação do efeito de fagos não-específicos, isolados de amostras ambientais, sobre a formação de biofilmes de *Desulfovibrio alaskensis* em cupons metálicos (LIVM e CENPES, dados não publicados).



**Figura 83.** Análises por MEV demonstrando o efeito dos fagos na inibição da formação de biofilme por *D. alaskensis*. (A) e (D) controle negativo (cupom e meio de cultura); (B) e (E) controle positivo (cultura pura de *D. alaskensis*); (C) e (F) biofilmes de *D. alaskensis* tratados com o coquetel fágico. As barras de escala representadas referem-se a 100 μm (LIVM e CENPES, dados não publicados).



**Figura 84.** Análises por perfilometria óptica demonstrando o efeito dos fagos na inibição da formação de biofilme por *D. alaskensis* (LIVM e CENPES, dados não publicados).

Além disso, a estratégia de utilização de um coquetel fágico ao invés de um único fago também é corroborada por estudos, como por exemplo, aquele no qual FU et al. (2010) verificaram que o tratamento de superfícies de cateteres com um coquetel fágico foi mais eficaz em impedir a formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, reduzindo a adesão bacteriana em 99 %, do que o tratamento com apenas um fago específico.

Como os fagos podem ser utilizados através de duas estratégias diferentes de controle: **(i)** a inibição da formação dos biofilmes, e **(ii)** a remoção dos biofilmes pré-estabelecidos (AZEREDO; SUTHERLAND, 2008; DONLAN, 2009), é essencial, do ponto de vista industrial prático, que a remoção dos biofilmes seja efetiva, uma vez que os sistemas operacionais possuem contaminações microbianas pré-existentes.

Além disso, a utilização de culturas puras tem pouca representatividade quanto ao efeito global de qualquer produto ou metodologia de controle microbiano em relação à comunidade real nos sistemas industriais. Portanto, as culturas puras em geral são utilizadas em estudos acadêmicos padronizados, mas é imprescindível que ensaios utilizando culturas mistas e diversas sejam realizados.

Foi nesse contexto que o primeiro estudo no *Looping* do CENPES foi realizado, o qual comprovou a estratégia de desenvolvimento escolhida para este trabalho. Em paralelo, seguiram-se diversos estudos com foco em diferentes aspectos do desenvolvimento da tecnologia, e os fagos mais promissores foram sendo avaliados e caracterizados de modo mais aprofundado quanto aos seguintes aspectos (estudos em andamento e/ou dados ainda não publicados):

- (i)** avaliação do espectro de hospedeiros, considerando bactérias formadoras de biofilmes, uma vez que um dos critérios de seleção é a escolha de fagos com maior abrangência;
- (ii)** avaliação da inibição da formação de biofilmes em microplacas, como método de triagem para seleção dos fagos mais promissores;
- (iii)** avaliação quanto à formação de placas de lise em BRS isoladas e culturas mistas de BRS, a partir da instalação de uma câmara de anaerobiose no LIVM, visando continuar as buscas por fagos específicos;
- (iv)** sequenciamento do genoma dos fagos pré-selecionando, que além da identificação completa dos fagos, permitiu **(i)** predizer os genes para enzimas capazes de degradar os peptidoglicanos das paredes celulares bacterianas, **(ii)** predizer outros prováveis hospedeiros, e **(iii)** avaliar a ausência de genes

de resistência a antibióticos e de virulência, que são características adicionais promissoras para a utilização desses fagos no ambiente industrial;

- (v) avaliação das condições de cultivo e rendimento do número de partículas virais produzidas, visando o escalonamento e produção em escala comercial, bem como o planejamento de um teste piloto de campo em plataforma de petróleo;
- (vi) avaliação de dosagens decrescentes da concentração de fagos para a inibição e remoção dos biofilmes, visando estabelecer a dosagem mínima a ser avaliada em um teste piloto de campo;
- (vii) avaliação da estabilidade dos fagos quanto a variações de temperatura, pH e salinidade, visando estabelecer as faixas e cenários reais de aplicação.

Vários desses estudos encontram-se em andamento e ainda não possuem dados publicados, porém, é relevante destacar dois estudos referentes a duas dissertações de mestrado do LIVM, que trabalharam respectivamente com os fagos UFV09 (SILVA, 2019) e UFV13 (CARMO, 2019), ambos selecionados para compor o coquetel fágico dos ensaios nos *Loopings* instalados na UFV, sendo que estes fagos também fizeram parte da composição do coquetel fágico avaliado no primeiro estudo no *Looping* do CENPES.

O fago UFV09 foi utilizado em estudos de avaliação da produção do fago a partir de diferentes fontes de carbono e condições de cultivo, nos quais foram selecionadas as melhores condições de produção (SILVA, 2019). Sendo assim, o fago UFV09 tem sido utilizado como modelo para a otimização do processo e escalonamento da produção em biorreatores instalados na UFV (**Figura 85**).

Resultados de estudos em andamento já demonstraram tanto um incremento no rendimento do número de partículas virais produzidas em relação à escala de bancada, obtida no início do desenvolvimento, quanto a possibilidade de redução do tempo de batelada mantendo-se o rendimento (LIVM e CENPES, dados não publicados).

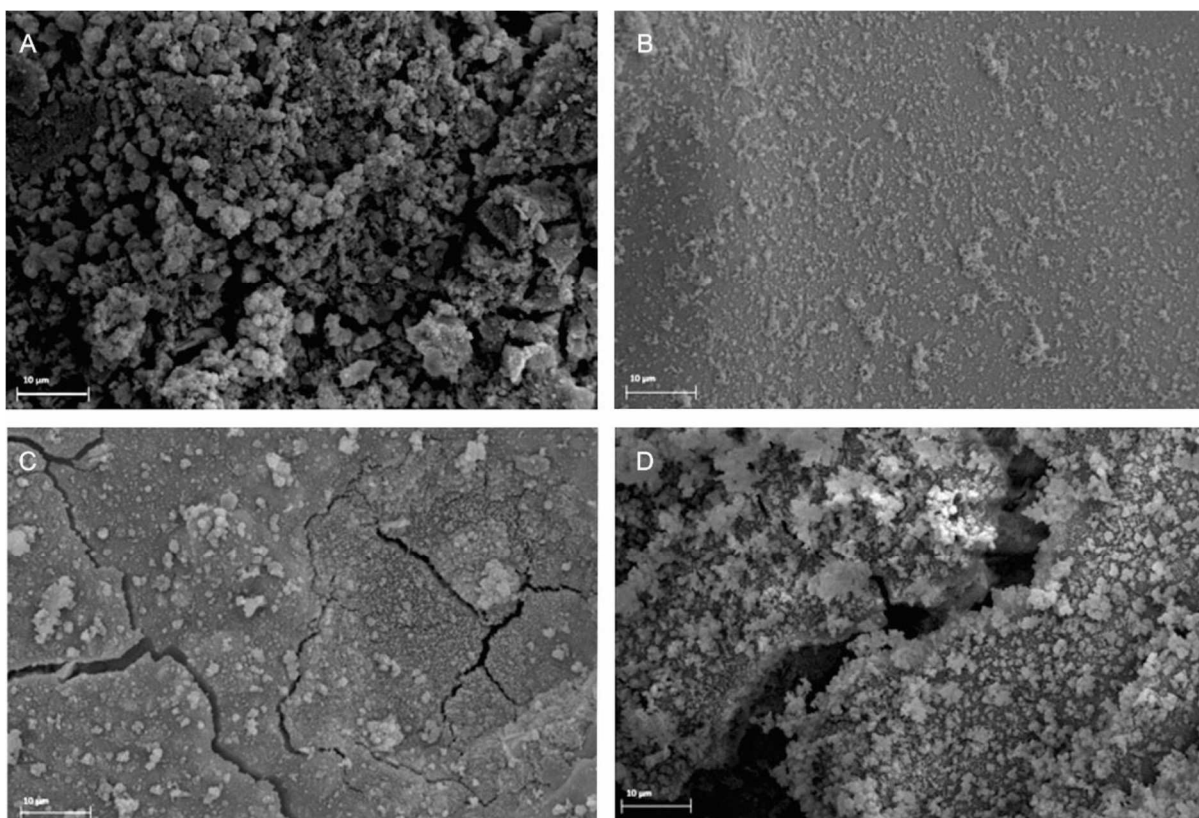


**Figura 85. (A)** Biorreator piloto de laboratório (200 L) e **(B)** fermentadores de bancada instalados na UFV para otimização e escalonamento da produção de fagos.

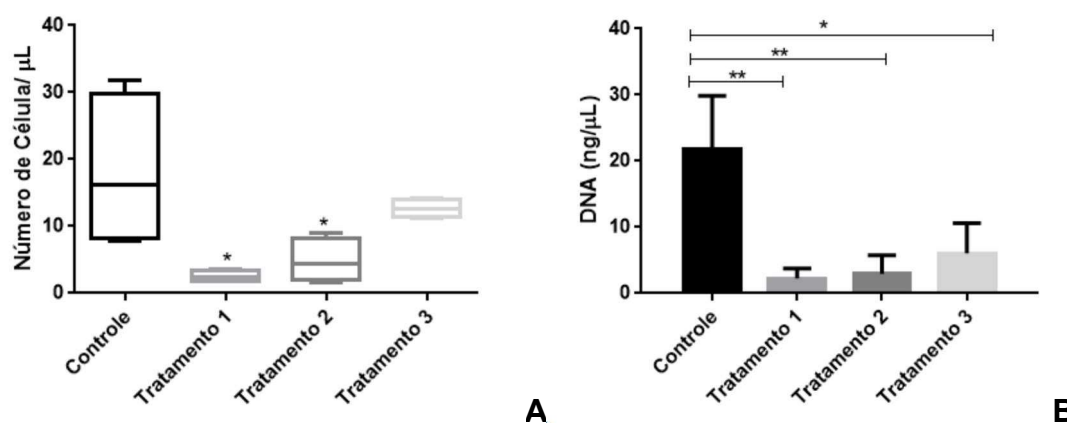
Já o fago UFV13 fez parte de um estudo que isolou um consórcio microbiano, formado por uma bactéria da espécie *Oceanotoga teriensis* e uma BRS da espécie *Desulfovibrio marinus*, obtido a partir de uma amostra de um poço de produção de petróleo com *souring* elevado e avaliou o efeito deste fago na inibição do biofilme formado por este consórcio na superfície de cupons metálicos (CARMO, 2019). Este estudo avaliou o efeito de concentrações alta ( $10^{12}$  UFP/m), média ( $10^8$  UFP/ml) e baixa ( $10^4$  UFP/ml) do fago sobre o biofilme do consórcio microbiano.

Nas concentrações alta e média, a redução do biofilme foi significativa, e mesmo na concentração baixa o fago ainda foi bastante efetivo (**Figura 86**),

demonstrando a flexibilidade e robustez da aplicação operacional de um produto à base de fagos. Estes resultados baseados nas análises por MEV foram confirmados tanto pela quantificação de células por citometria de fluxo, quanto pela quantificação de DNA total do biofilme presente nos cupons metálicos, conforme gráficos observados na **Figura 87**.



**Figura 86.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos biofilmes formado pelo consórcio bacteriano em superfície de aço carbono na presença e ausência (controle) do fago vB\_EcoM-UFV13 no aumento de 3.500×. **(A)** Controle. **(B)** Biofilme formado com alta concentração do fago ( $10^{12}$  UFP/ml). **(C)** Biofilme formado com média concentração do fago ( $10^8$  UFP/ml). **(D)** Biofilme formado com baixa concentração do fago ( $10^4$  UFP/ml) (CARMO, 2019).



**Figura 87. (A)** Quantificação do número de células viáveis por citometria de fluxo e **(B)** quantificação de DNA, nos biofilmes formados sobre cupons de aço carbono para cada um dos tratamentos (tratamento 1, 2 e 3) com as concentrações alta ( $10^{12}$  UFP/ml), média ( $10^8$  UFP/ml) e baixa ( $10^4$  UFP/ml) do fago vB\_EcoM-UFV13, em comparação ao controle (ausência do fago) (CARMO, 2019).

Recentemente, o coquetel fágico formado pelos quatro fagos selecionados para este estudo demonstrou ação na inibição da formação de biofilmes de culturas de BRS obtidas de amostras de diferentes cenários operacionais, incluindo as culturas de BRS da amostra de tanque *slop* utilizadas no ensaio no *Looping* do CENPES e dos tanques de armazenamento de petróleo utilizadas nos ensaios no *Looping* da UFV apresentados nesse estudo, além de culturas de outros cenários, como: água de captação e injeção em diversas plataformas; água de injeção dessulfatada; biofilme de membrana de dessulfatação; poço produtor de plataforma com elevado *souring*; e saída do flotor de um sistema de tratamento de água de produção em terminal aquaviário de petróleo.

Estes ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e câmara de anaerobiose, e eles ainda se encontram em andamento dentro de outros estudos do LIVM. Ensaios também serão realizados para avaliar a remoção do biofilme por este mesmo coquetel na concentração de dosagem de  $10^7$  UFP/ml, a mesma testada nos *Loopings* da UFV.

Diante deste histórico de resultados, a concepção escolhida neste estudo para a seleção dos fagos se demonstrou na prática como a melhor estratégia de desenvolvimento da tecnologia de bacteriófagos para a indústria do petróleo, uma vez que os resultados laboratoriais obtidos até agora comprovaram o desempenho dos fagos não-específicos (BELGINI et al., 2014; CARMO, 2019; DIAS, 2014) em biofilmes

de culturas mistas contendo BRS, o que se materializou no depósito de uma patente (DIAS; DE PAULA; SOUSA, 2020).

Contudo, são essenciais e prioritários ensaios aplicados mais representativos de condições reais de biofilmes e da aplicação dos fagos, de modo a permitir e subsidiar a continuidade destes estudos e a realização de um teste piloto de campo em uma plataforma de petróleo. Portanto, foi nesse contexto que este estudo foi proposto como etapa essencial e decisória para o desenvolvimento da tecnologia.

### **6.3. PRIMEIRO ESTUDO COM BACTERÍOFAGOS EM LOOPING (SISTEMA CENPES)**

Os parâmetros físico-químicos durante o primeiro estudo com fagos no *Looping* do CENPES permaneceram adequados e estáveis para o crescimento de BRS e estabelecimento do biofilme ao longo de todo o experimento. A temperatura média permaneceu em torno de 32°C, o pH em torno de 6,0, o OD se manteve ao longo de quase todo o período abaixo de 10 ppb e o ORP abaixo de -100 mV, ideal para o metabolismo das BRS (BHATTACHARYA; UBEROI; DRONAMRAJU, 1996; NEVIUS; BAGWELL; BRIGMON, 2004).

Esse primeiro estudo com fagos demonstrou a remoção efetiva do biofilme pré-estabelecido nos cupons de aço carbono pela ação do coquetel fágico utilizado, o que foi observado qualitativamente pelos resultados de MEV e foi comprovado quantitativamente pela determinação da Rq por perfilometria óptica. Além disso, o resultado de maior destaque e relevância foi o monitoramento dos teores de H<sub>2</sub>S, que demonstrou uma redução significativa, de cerca de 80% do H<sub>2</sub>S biogenicamente gerado, após a aplicação dos fagos.

Estes resultados foram significativos do ponto de vista prático e operacional uma vez que os níveis de contaminação obtidos no *Looping* são equivalentes a níveis reais, diferentemente da maior parte dos ensaios em escala de bancada, que normalmente quantificam as variações do crescimento microbiano apenas por densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>) e na maioria dos ensaios com biofilmes, as concentrações celulares utilizadas encontram-se abaixo de níveis reais de contaminação, não permitindo comparações do ponto de vista prático quanto ao uso desses antimicrobianos em sistemas industriais.

Quando comparados a resultados obtidos em ensaios no mesmo *Looping*, com diversos produtos biocidas comerciais, o reestabelecimento do biofilme aos níveis de contaminação iniciais costuma ocorrer em poucos dias, ou até mesmo horas após a dosagem do produto.

Já no caso do coquetel fágico, apesar do efeito sobre o biofilme não ser tão rápido, o efeito a longo prazo foi significativamente superior, uma vez que em pouco mais de 10 dias, os resultados de MEV e perfilometria demonstraram que praticamente não existia mais biofilme sobre o cupom, permanecendo assim por quase 5 meses.

Entretanto, essa constatação de que o biofilme não se reestabeleceu após 5 meses, foi baseada apenas na análise visual do trecho transparente da tubulação do *Looping*, onde é possível visualizar o biofilme formado durante a operação do sistema, uma vez que já não havia cupons que pudessem ser retirados para a realização das análises de MEV e perfilometria após os 5 meses. Portanto esse aspecto precisa necessariamente ser avaliado com maior rigor e critério, ainda que o resultado visual seja corroborado pelos teores de H<sub>2</sub>S, que não aumentaram ao longo desses 5 meses.

Estes resultados em especial, subsidiaram a continuidade dos estudos e implantação dos novos sistemas de *Looping* na UFV. Por outro lado, as análises convencionais de quantificação microbiológica pela técnica do NMP não refletiram tal efeito, uma vez que até aumentaram no fluido e no próprio cupom, o que representa um resultado oposto ao convencionalmente observado com produtos químicos antimicrobianos.

Entretanto, é necessário levar em consideração que as taxas de geração de H<sub>2</sub>S não possuem necessariamente uma correlação direta com a quantidade de microrganismos presentes, mas sim com os níveis de atividade metabólica deles. Além disso, em relação às quantificações por métodos de cultivo, como a técnica do NMP, é bem conhecido e amplamente discutido que elas possuem a capacidade de detectar um percentual muito pequeno dos microrganismos de fato existentes na amostra (LOMANS et al., 2016; PEDRÓS-ALIÓ, 2006, 2012), o que torna os resultados de MEV e perfilometria, nesse caso, mais representativos do real efeito sobre os biofilmes.

Nesse sentido, faz-se necessário associar outros métodos como por exemplo a determinação do ATP produzido pelos microrganismos. Esse método já é aplicado convencionalmente, inclusive em campo, e com boas correlações para se determinar

o efeito de produtos biocidas. Os métodos moleculares independentes de cultivo, como o qPCR, para a quantificação do número de cópias do DNA dos microrganismos totais ou de grupos específicos (tal como as BRS) também são indicados. Contudo, esses métodos ainda carecem de estabelecimento de correlações com o problema da biocorrosão e geração de H<sub>2</sub>S e no caso do qPCR especificamente, existe pouca disseminação de aplicações em campo.

Sendo assim, as análises por MEV, ainda que visual e qualitativa, quando associada à perfilometria óptica com determinação da Rq, que fornece uma medida quantitativa, se demonstraram análises mais objetivas para a avaliação dos efeitos dos fagos sobre os biofilmes.

#### **6.4. SEGUNDO ESTUDO COM BACTERIÓFAGOS EM LOOPING (NOVOS SISTEMAS UFV)**

Nos ensaios realizados nos sistemas de *Loopings* da UFV, de modo geral, foram enfrentadas algumas dificuldades operacionais, sobretudo em relação ao controle dos teores de OD nos sistemas, o que provavelmente interferiu na análise dos dados de corrosão, impactando a avaliação global dos resultados quanto à comparação dos sistemas Controle e Tratamento. Contudo, os dados de **DO<sub>600nm</sub>, sulfatos, ATP, perfilometria óptica e taxas de corrosão**, representam indicativos da ação do coquetel fágico sobre o biofilme e várias considerações podem ser feitas e discutidas a partir dos demais resultados obtidos, visando futuros ensaios em sistemas de *Looping*.

##### **6.4.1. Inóculo**

Em relação ao inóculo de BRS-m, foi obtido um resultado de quantificação bastante elevado, na ordem de 10<sup>7</sup> NMP/ml, bem mais alto que do inóculo utilizado no ensaio do *Looping* do CENPES (BRS-m = 10<sup>1</sup> NMP/ml), indicando um potencial de estabelecimento mais rápido do biofilme e possível redução dos tempos de ensaio.

Já na água do mar, a concentração de BRS-m foi bastante baixa (10<sup>-1</sup> NMP/ml), enquanto a concentração de BANHT foi alta (10<sup>5</sup> NMP/ml), indicando que, provavelmente, as BRS já existentes na água do mar poderiam ter pouca influência

na colonização e formação do biofilme inicial nos *Loopings*, ficando as BANHT com a maior contribuição nesse sentido.

Vale ressaltar que esses valores de concentração microbiana encontrados na água do mar natural são recorrentes e apresentam exatamente as mesmas ordens de grandeza de concentração encontradas na água do mar utilizada no ensaio do *Looping* do CENPES. Tais águas foram coletadas na mesma região, porém com vários anos de diferença, indicando que provavelmente ainda há pouca influência antrópica no local e que, portanto, as águas são ainda bem semelhantes quanto ao nível de contaminação microbiana e frente aos mesmos procedimentos de pré-tratamento e preservação para uso em ensaios laboratoriais.

Entretanto, as análises de NMP realizadas no início dos ensaios (1º dia), antes da adição do inóculo e da solução nutritiva, apresentaram valores elevados de BRS ( $10^6$  NMP/ml), indicando que o tempo de comissionamento prévio dos sistemas (cerca de uma semana antes do 1º dia de ensaio) foi suficiente para garantir condições favoráveis (como a anaerobiose e a grande disponibilidade de sulfato) para que as BRS da própria água do mar crescessem rapidamente.

Por esse motivo, é relevante levar em consideração essa questão em futuros ensaios nos *Loopings*, para se obter uma adequada reprodutibilidade e comparação de resultados, visto que, ao não se utilizar uma água do mar estéril, é importante manter os tempos de comissionamento do sistema e sempre quantificar os parâmetros microbiológicos e químicos no início, como “tempo zero” do ensaio, independente de terem sido realizadas análises individuais dos fluidos de alimentação e inóculos microbianos, assim como, é sempre relevante coletar e preservar amostras para uma futura caracterização da diversidade microbiana por métodos moleculares, a depender dos resultados obtidos.

#### **6.4.2. Temperatura**

Quando à temperatura, foram observados vários picos de aquecimento no tanque de abastecimento do *Looping* Controle, enquanto o *Looping* Tratamento permaneceu bastante estável. Os maiores picos ocorreram antes da inoculação do sistema e cerca de uma semana antes da dosagem do coquetel fágico no *Looping* Tratamento. Depois disso, o tanque Controle permaneceu com temperaturas mais estáveis, semelhante ao tanque Tratamento.

Apesar desses picos de aquecimento terem refletido na temperatura do fluido circulante no *Looping* Controle, esse efeito foi minimizado no fluido, uma vez que a diferença de temperatura média entre os tanques foi de 3,5°C, enquanto entre os fluidos foi de apenas 1°C.

De qualquer forma, ainda que as temperaturas do fluido em ambos os sistemas, tenham permanecido a maior parte do tempo na faixa de 30 a 35°C (temperatura ótima de crescimento para as BRS-m e uma variação totalmente aceitável para um sistema piloto de fluxo dinâmico), os picos de temperatura, quer sejam nos tanques ou no fluido circulante, não devem ser desprezados, pois podem influenciar o crescimento das BRS, favorecendo as BRS-t, cujo crescimento ótimo se dá próximo aos 55°C e que nem sempre são detectadas pelo método do NMP de BRS-m, pois requerem um meio de cultivo específico.

Isso posto, acredita-se que a variação de temperatura para os ensaios apresentados nesse trabalho, não tenha sido um parâmetro de grande impacto, que possa ter afetado significativamente o crescimento e a atividade microbiana ao ponto de interferir nos resultados. Entretanto, observa-se que a DO média no *Looping* Controle foi menor que no Tratamento, o que pode ter tido alguma influência da temperatura. Sendo assim, garantir o controle da temperatura no sentido de eliminar a ocorrência de picos nos sistemas deve ser considerado algo importante para os próximos ensaios.

Provavelmente, tais picos de aquecimento ocorreram devido à baixa vazão do sistema, cuja oscilação levou a interrupções pontuais do fluxo, sobrecarregando a bomba e conseqüentemente levando ao aquecimento do tanque de abastecimento. De qualquer forma é importante ressaltar que o fato dos picos de aquecimento terem ocorrido no sistema Controle e não no sistema Tratamento, assim como o fato do crescimento microbiano ter sido melhor no Tratamento do que no Controle, poderia minimizar uma possível interferência desses eventos na interpretação global dos resultados, uma vez que se utilizou o sistema Tratamento de modo conservativo, ou seja, o sistema mais crítico do ponto de vista do que se pretende avaliar (efeito sobre os microrganismos) foi de fato o *Looping* Tratamento.

### 6.4.3. pH

Normalmente, em sistemas anóxicos, espera-se uma pequena redução no pH logo após a inoculação de uma cultura mista e ao longo do tempo de ensaio. Isso geralmente ocorre devido à atividade metabólica das bactérias facultativas, que num primeiro momento tendem a consumir rapidamente o residual de O<sub>2</sub> disponível, gerando ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e ao longo do tempo, devido à atividade das BPA, que podem disponibilizar grandes quantidades de ácidos de cadeia curta (tais como acetato, propionato, butirato) para o meio, reduzindo assim o pH, o que por sua vez pode influenciar bastante as taxas de corrosão.

Por esse motivo, é sempre relevante monitorar também os ácidos carboxílicos em estudos relacionados à biocorrosão, pois sua presença em altas concentrações é um indicativo relevante, ainda que sua ausência ou baixas concentrações não signifiquem baixo potencial MIC, uma vez que são dinamicamente consumidos pela microbiota, inclusive pelas BRS.

Contudo, essa redução de pH não foi observada nesses ensaios, provavelmente devido à alta contaminação por O<sub>2</sub> ocorrida nos sistemas, o que influenciou o estabelecimento estável de uma microbiota anaeróbia. De qualquer forma, o pH se manteve em níveis adequados em ambos os sistemas ao longo do tempo (em média em 7,5 no Tratamento e 7,9 no Controle), não representando um problema para o estabelecimento do biofilme e crescimento das BRS.

### 6.4.4. Oxigênio dissolvido (OD)

O OD, infelizmente, foi o parâmetro que influenciou amplamente a obtenção de resultados mais objetivos para estes ensaios. Apesar dos sistemas terem se mantido estáveis em anaerobiose durante toda a fase pré-inoculação, os teores de OD aumentaram progressivamente depois disso e só voltaram a diminuir retomando a anaerobiose após cada dosagem de solução nutritiva, caracterizando assim os 3 ciclos de aumento e queda do OD observados ao longo dos ensaios.

Provavelmente está ocorrendo alguma entrada significativa de oxigênio, ainda não identificada em ambos os *Loopings*, o que, apesar de não ser o ideal, por si só, não impediria uma avaliação do coquetel fágico sob o ponto de vista do seu efeito na microbiota. Porém, aparentemente, o sistema utilizado como Controle foi muito mais susceptível à contaminação por OD, o que causou uma diferença considerável nos

níveis de exposição dos cupons ao OD ao longo do período de ensaio, impactando diretamente as principais análises, avaliação dos teores de H<sub>2</sub>S e das taxas de corrosão.

O *Looping* Controle apresentou uma exposição ao OD superior ao Tratamento em cerca de 1 ppm quando se considera o teor médio de OD e de cerca de 60 ppm considerando o OD acumulado no período, inviabilizando assim a comparação dos sistemas, visto que se trata de uma diferença muito grande do ponto de vista da corrosão direta pelo O<sub>2</sub>.

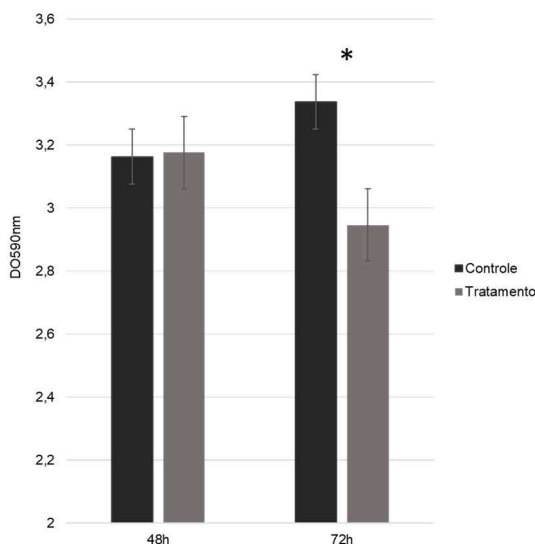
Como alternativas para contornar e sanar essa deficiência, além da tentativa de se identificar possíveis pontos de entrada de oxigênio, sugere-se a substituição dos tanques de alimentação por tanques de menor volume, para minimizar a influência do *headspace* e a necessidade de purga constante e, em último caso, adotar um procedimento frequente de purga com N<sub>2</sub> nos trechos contendo os cupons, durante todo o período de ensaio.

#### **6.4.5. Densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>)**

Quanto à DO<sub>600nm</sub> também se observa que os sistemas Tratamento e Controle tiveram uma diferença significativa quanto à DO<sub>600nm</sub> média ao longo do tempo. A DO<sub>600nm</sub> média do Tratamento (1,4) foi cerca de 40% superior à do Controle (0,8), ou seja, ainda que a DO<sub>600nm</sub> seja um parâmetro difícil de se correlacionar com as concentrações exatas de microrganismos quando se trata de culturas mistas e em especial no caso de culturas contendo BRS, onde a geração de H<sub>2</sub>S leva à formação de precipitados de FeS, pode-se considerar que o crescimento da microbiota global no *Looping* Tratamento foi maior que no Controle, provavelmente em função da maior estabilidade do OD e manutenção de maiores períodos de anaerobiose.

Dessa forma, não é possível estabelecer relação do efeito do coquetel fágico na redução da DO<sub>600nm</sub> comparando-se o Tratamento com o Controle. Contudo, se compararmos os resultados pontuais do Tratamento no 42º dia (antes da dosagem dos fagos) e no 57º dia (último tempo avaliado, 15 dias após a introdução dos fagos no sistema), observa-se uma redução em torno de 13% na DO<sub>600nm</sub> média. Esse valor é semelhante ao obtido em ensaios laboratoriais de bancada, que utilizando esse mesmo coquetel fágico, sobre biofilmes crescidos em microplacas, após 72hs de

exposição, com a mesma cultura de BRS, conforme ilustrado na **Figura 88** (LIVM e CENPES, dados não publicados).



**Figura 88.** Resultados de densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) após 48 e 72 horas de exposição ao coquetel fágico, em ensaios de formação de biofilmes em microplacas, com cultura de BRS de tanques de armazenamento de plataformas (LIVM e CENPES, dados não publicados). (\*) diferença estatisticamente significativa entre Controle e Tratamento, teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A redução da  $DO_{600nm}$  após a dosagem da solução nutritiva é uma tendência já observada nos *Loppings* da UFV, que se relaciona aos ciclos de queda do OD. Ou seja, após o aporte de nutrientes, a microbiota facultativa cresce e rapidamente consome o OD, então o sistema reestabelece a anaerobiose e a microbiota diminui até ser dosada novamente a solução nutritiva.

Contudo, se observarmos o *Looping* Tratamento no ciclo anterior à dosagem dos fagos, nota-se que a redução da  $DO_{600nm}$  foi algo em torno de 28%, ou seja, tal redução após a dosagem dos fagos foi menor, o que pode se relacionar ao efeito dos fagos no biofilme. Ou seja, a partir do momento em que os fagos começam a agir sobre o EPS da matriz dos biofilmes, parte da microbiota pode se desprender e passa a ser contabilizada no fluido.

Nesse caso, o que se espera de fato é um efeito inverso, ou seja, quanto maior a ação do coquetel fágico no biofilme, maior a concentração de microrganismos no fluido, sobretudo em um sistema fechado, ao menos em um primeiro momento.

Esse efeito é normalmente observado em campo com a dosagem de produtos biocidas, pois, quando se tem um sistema com alta contaminação, que ficou muito tempo sem tratamento, onde portanto, existe um biofilme espesso e bastante aderido à superfície, logo após uma dosagem efetiva de biocida, há um aporte de microrganismos no fluido devido ao desprendimento das células que compunham o biofilme. Normalmente, esse efeito é mais bem detectado por análises de ATP do que pela quantificação por NMP.

De qualquer forma, em relação à  $DO_{600nm}$ , trata-se de um dado pontual, que compara apenas um ciclo de crescimento da microbiota, antes e depois da dosagem dos fagos e, portanto, seriam necessárias várias repetições nessas mesmas condições para confirmar tal hipótese. Contudo, no caso desse estudo ainda, conforme será discutido um pouco mais adiante, no **item 6.4.9**, também se observou um aumento nos níveis de ATP detectados no Tratamento após a dosagem dos fagos, o que pode corroborar, tal hipótese.

#### **6.4.6. H<sub>2</sub>S dissolvido (mg/L)**

Quanto ao H<sub>2</sub>S, infelizmente não foi possível quantificá-lo nas amostras coletadas, ainda que tenham sido tomados todos os cuidados descritos anteriormente no momento da amostragem e quanto à preservação da amostra para captura imediata do H<sub>2</sub>S dissolvido.

Vale ressaltar que se trata do mesmo procedimento de amostragem e método analítico utilizado no estudo do *Looping* do CENPES (onde o H<sub>2</sub>S foi um parâmetro importante com redução de 80%, 15 dias após a dosagem dos fagos) e em outras atividades relativas ao estudo de fagos e BRS no LIVM, nos quais não existiram problemas na detecção de H<sub>2</sub>S.

Provavelmente, o fato de não ter sido encontrado H<sub>2</sub>S significativo durante todo o período de ensaio nos *Loopings* da UFV, está associado ao escape de H<sub>2</sub>S para a fase gasosa e sua dispersão no meio ambiente, visto que era comum um leve cheio de H<sub>2</sub>S no laboratório onde os *Loopings* se encontram. Além disso, as altas concentrações de BRS medidas por NMP, assim como o consumo de sulfato (conforme será discutido adiante, nos itens 6.4.7 e 6.4.8) indicariam uma produção significativa de H<sub>2</sub>S.

Sendo assim, apesar de existir exaustão forçada no laboratório dos *Loopings* da UFV, recomenda-se fortemente que sejam utilizados sensores de lapela para detecção de níveis de exposição ocupacional ao H<sub>2</sub>S durante as atividades laboratoriais no LIVM, assim como seria importante identificar possíveis pontos de vazamento de gás em todo o circuito dos *Loopings*, visto que os mesmos pontos de escape de H<sub>2</sub>S, provavelmente são os pontos de entrada de O<sub>2</sub> nos sistemas.

Sugere-se ainda, adaptar um ponto de amostragem com *bags* de gás para análise do H<sub>2</sub>S por cromatografia gasosa, ou até mesmo acoplar um microcromatógrafo aos sistemas para permitir uma análise mais representativa e adequada desse parâmetro nos *Loopings*, no futuro.

#### **6.4.7. Sulfatos (mg/L)**

Em relação aos teores de sulfatos, ambos os *Loopings* se encontravam na faixa de 2300 mg/L antes da inoculação e na faixa de 2100 no Tratamento e 2000 no Controle no 42º dia (36 dias após a inoculação). Ou seja, foi observado um consumo de sulfato razoavelmente semelhante entre os sistemas nesse período, cerca de 8% no Tratamento e 12 % no Controle.

Já no 57º dia, 15 dias após a dosagem do coquetel fágico, o consumo de sulfato no Tratamento foi de cerca de 15% enquanto no Controle foi maior, em torno de 20%. Cabe salientar que o maior consumo no Controle ocorreu com uma concentração microbiana 40% inferior, em termos de DO<sub>600nm</sub> (0,8 no Controle frente a 1,4 no Tratamento). Lembrando que o aumento na DO pode estar associado apenas ao desprendimento das células do biofilme, no *Looping* Tratamento, como discutido anteriormente.

Pode-se inferir, portanto, que o consumo do sulfato (e consequente geração biogênica de H<sub>2</sub>S) foi 5% menor no Tratamento (mesmo com uma microbiota, aparentemente, muito maior) 15 dias após a dosagem do coquetel fágico, ainda que não tenha se conseguido medir diretamente os teores médios de H<sub>2</sub>S dissolvidos, indicando efeito dos fagos sobre a atividade das BRS.

#### **6.4.8. BRS (NMP/ml e NMP/cm<sup>2</sup>)**

Quanto às quantificações de BRS por NMP, tanto no fluido quanto nos cupons, tal como observado no estudo no *Looping* do CENPES, não foram detectadas alterações significativas ao longo dos ensaios, quer seja depois da inoculação, quer seja depois da dosagem do coquetel fágico.

Confirma-se assim, que os métodos de quantificação microbiana baseados em cultivo não oferecem sensibilidade suficiente para se avaliar o efeito dos fagos não-específicos sobre o biofilme, uma vez que não se sabe ainda se esses fagos encontram algum hospedeiro viável na diversidade dessas culturas ao ponto de infectá-lo, se multiplicar e lisar grande parte das células.

Isso posto, pode-se afirmar que a avaliação da eficiência de um produto à base de fagos não é algo comparável aos métodos convencionalmente utilizados para a avaliação da eficiência de produtos biocidas, sendo necessário portanto o desenvolvimento e padronização de um teste laboratorial que possa ser utilizado no futuro como método de qualificação de produtos à base de fagos.

Portanto, as análises qualitativas por MEV e perfilometria, se consolidam como métodos mais sensíveis para se avaliar o efeito dos fagos nos biofilmes, assim como tornou-se mais relevante ainda as análises quantitativas de determinação da R<sub>q</sub>, taxas de geração de H<sub>2</sub>S e de corrosão, ficando os métodos de quantificação microbiológica independentes de cultivo, como algo a ser mais bem investigado em novos estudos.

#### **6.4.9. ATP (pg/ml e pg/cm<sup>2</sup>)**

Quanto aos resultados obtidos pelas medidas do ATP, tanto no fluido como nos cupons, confirma-se a hipótese que os fagos têm de alguma ação sobre os biofilmes conforme citado anteriormente, uma vez que, observou-se um aumento, em torno de 20%, nas concentrações de ATP no fluido do *Looping* Tratamento, do 42º para o 57º dia (15 dias após a dosagem do coquetel fágico), o que pode indicar um potencial aporte de microrganismos desprendidos dos biofilmes.

Assim como, também se observou um aumento, maior ainda, acima de 60%, na concentrações de ATP nos cupons coletados no Tratamento no 57º dia, o que indica fortemente algum efeito dos fagos sobre os microrganismos do biofilme. Isso ocorre porque, uma vez que a ação dos fagos, ainda que não leve à lise das células, causa perturbações na homeostase do biofilme e alterações metabólicas nas células,

levando ao aumento nos níveis de expressão de diferentes genes, alguns relacionados à produção da matriz do biofilme, o que requer mais energia e maior produção de ATP por parte da célula. Esse fato já havia sido observado em estudos anteriores com o fago UFV13 frente a culturas de BRS de água de produção (CARMO, 2019).

#### **6.4.10. Título viral (UFP/ml)**

A determinação do título viral no fluido do *Looping* Tratamento, demonstrou que a concentração dos fagos de *E. coli* se mantiveram mais altas ( $10^6$  UFP/ml), próximas à concentração dosada ( $10^7$  UFP/ml) após as 2 semanas de ensaio, enquanto as concentrações do fago de *E. cloacae* se mantiveram mais baixas ( $10^4$  UFP/ml).

Isso pode ter ocorrido devido à simples diferença na composição do coquetel, que possui 3 fagos de *E. coli* e 1 de *E. cloacae*, ou, ainda, é possível que algum dos fagos de *E. coli* tenha encontrado alguma bactéria hospedeira viável na comunidade microbiana estabelecida no *Looping*. Contudo, não é possível afirmar algo a esse respeito, pois seriam necessários ensaios mais longos, a fim de se observar quanto tempo os fagos perduram no sistema em comparação à sua persistência no mesmo meio, porém estéril, ou mesmo se observar se em algum momento a concentração de fagos volta a crescer.

De qualquer forma, é possível afirmar que a água do mar natural utilizada nos ensaios não possui nenhum outro fago capaz de crescer nos hospedeiros utilizados na produção desse coquetel, visto que no 42º dia, antes da dosagem do coquetel, não foi observada formação de UFP, de modo que o meio de teste não constitui um interferente para o monitoramento desse coquetel, ao menos pela avaliação de UFP.

#### **6.4.11. MEV**

Conforme citado anteriormente, não foi possível obter imagens de MEV com contraste adequado para visualização do biofilme formado sobre os cupons tal como foi feito no estudo no *Looping* do CENPES. Provavelmente devido à fixação do material biológico em função da utilização do formaldeído no lugar do glutaraldeído e da ausência de tratamento com tetróxido de ósmio pelo protocolo utilizado.

Sendo assim, as imagens de MEV foram feitas nos cupons destinados às análises de perda de massa, e, portanto, representam apenas a morfologia da corrosão observada após a decaagem dos cupons, ou seja, após a remoção do biofilme e dos depósitos de corrosão.

A partir das imagens obtidas, pode-se observar que no 42º dia (36 dias após a inoculação dos sistemas, antes da dosagem do coquetel) os cupons já apresentavam pits de corrosão, o que pode indicar uma maior influência da contaminação por OD ocorrida durante os ensaios no *Looping* da UFV do que devido à MIC e geração biogênica de H<sub>2</sub>S, visto que em tempos curtos (15 a 30 dias) não é muito comum o aparecimento de muitos pits exclusivamente devido à MIC.

Portanto, apesar de que no 57º dia (pós-fagos), o *Looping* Controle, aparentemente ter acelerado a corrosão devido ao aumento do tamanho e profundidade dos pits, em comparação ao Tratamento, apenas com base nas análises de MEV, não seria possível atribuir essa diferença à ação do coquetel fágico sobre o biofilme, visto que a exposição dos cupons ao OD no Controle foi maior (1 ppm a mais considerando o OD médio e 60 ppm a mais se considerado o OD acumulado de todo o período) do que no Tratamento.

Provavelmente os pits de corrosão observados nos cupons, bem como a diferença observada entre o Tratamento e o Controle, se devem sobretudo à corrosão causada pelo OD, visto que se avaliarmos os dados de OD médios apenas do período após a dosagem dos fagos, ou seja, do 43º ao 57º dia, observa-se que a diferença de exposição dos sistemas ao OD foi ainda maior, O OD médio no Tratamento foi em torno de 1,5 ppm e no Controle foi de 3,0 ppm, enquanto o OD acumulado foi em torno de 22 ppm no Tratamento e 46 ppm no Controle, uma variação grande, que por si só já poderia justificar diferenças nas taxas de corrosão.

Contudo, ao se analisar exclusivamente o *Looping* Tratamento antes e depois da dosagem do coquetel fágico, observa-se que aparentemente, a corrosão não evoluiu, ou seja, os pits mantiveram o mesmo aspecto alcançado até então, mesmo após mais 15 dias de exposição a níveis de OD semelhantes ao ciclo anterior (cerca de 12 dias em anaerobiose e o restante do tempo com OD médio em torno de 5,5 ppm) e mesmo com um pH ligeiramente mais baixo que no Controle.

Portanto, apesar de não ser possível fazer uma comparação adequada da ação do coquetel fágico entre o Tratamento e o Controle devido à contaminação diferencial pelo OD entre os sistemas, a análise comparativa apenas do *Looping* Tratamento

antes e depois do coquetel, pode indicar a ação dos fagos e corrobora os resultados discutidos anteriormente, relativos às análises de  $DO_{600nm}$ , ATP e à diferença significativa no consumo de sulfato, que foi menor no Tratamento, mesmo apresentando uma maior  $DO_{600nm}$ .

Nesse período, os fagos podem ter desestruturado parte do biofilme, minimizando a MIC (o que se correlaciona aos resultados da  $DO_{600nm}$  e do ATP) e reduzido a geração biogênica de  $H_2S$  (o que se correlacionado aos dados de sulfato), o que por sua vez, desacelerou as taxas de corrosão (como será discutido adiante), refletindo na morfologia aparente dos pits observados nas análises de MEV, que mesmo na presença do OD, não progrediram mais depois que o coquetel fágico foi aplicado.

Essas mesmas características são observadas pelas imagens de perfilometria óptica, análises de  $R_q$  e determinação das taxas de corrosão que serão discutidas adiante, corroborando com o indicativo de ação dos fagos sobre o biofilme formado.

#### **6.4.12. Perfilometria óptica e rugosidade média quadrática – $R_q$ ( $\mu m$ )**

As imagens de perfilometria e a determinação da  $R_q$  por sua vez, foram realizadas nos cupons coletados para tal fim, e, portanto, ao contrário das análises de MEV, consideram o biofilme depositado sobre os cupons.

Dessa forma, apesar das diferenças observadas nas imagens de perfilometria e na  $R_q$  entre o Tratamento e o Controle, também poderem ter sido influenciadas em parte pela contaminação diferencial pelo OD durante os ensaios, essas análises podem ser mais bem relacionadas e representativas do efeito do coquetel fágico, visto que contemplam o biofilme permitindo sua avaliação qualitativa (pelas imagens de perfilometria) e quantitativa (pela  $R_q$ ).

Pelas imagens de perfilometria, observa-se que no sistema Tratamento, após a dosagem do coquetel fágico, a quantidade e profundidade aparente dos *pits* não avançou, enquanto no Controle foram observados pits em maior quantidade e tamanhos significativamente maiores. Tal constatação visual se confirma quantitativamente pelos resultados de determinação da  $R_q$ , visto que a rugosidade após a dosagem do coquetel foi significativamente maior (51%) no Controle do que no Tratamento.

#### 6.4.13. Taxas de corrosão

Por fim, as taxas de corrosão obtidas para os cupons, seguem o mesmo raciocínio da interpretação dos dados de MEV, perfilometria e Rq. As taxas de corrosão no 42º dia (pré-fagos) já eram classificadas como altas, sendo ligeiramente mais alta no Controle em comparação ao Tratamento (provavelmente em função da contaminação com o OD). Essa diferença se acentuou ainda mais no Controle até o 57º dia (pós-fagos), enquanto permaneceu exatamente a mesma no Tratamento.

Novamente, visto que nesse período (do 42º ao 57º dia) a diferença de exposição ao OD entre o Controle e o Tratamento foi ainda maior (1,5 ppm a mais considerando o OD médio), tal diferença não se deve exclusivamente ao efeito do coquetel fágico, mas sim a um efeito sinérgico da corrosão provocada pelo OD com a MIC e a geração biogênica de H<sub>2</sub>S.

Contudo, ao se analisar o *Looping* Tratamento antes e depois da dosagem do coquetel fágico, observa-se que a taxa de corrosão permaneceu inalterada, mesmo após mais 15 dias de exposição a níveis de OD semelhantes ao ciclo anterior, e, portanto, indica a ação dos fagos e corrobora os resultados discutidos anteriormente, relativos às análises de DO<sub>600nm</sub>, ATP, à diferença significativa no consumo de sulfato, MEV, Perfilometria e Rq.

Conforme sugerido anteriormente, o fato da taxa de corrosão não ter evoluído após a dosagem do coquetel fágico pode ser um indicativo da ação dos fagos, ou seja, nesse período, os fagos podem ter desestruturado parte do biofilme, minimizando a MIC (o que se correlaciona aos resultados da DO<sub>600nm</sub> e do ATP) e a geração biogênica de H<sub>2</sub>S (o que se correlaciona aos dados de sulfato), o que por sua vez, desacelerou a corrosão, refletindo em uma taxa de corrosão que, mesmo na presença do OD, não progrediu mais depois que o coquetel fágico foi aplicado.

De qualquer forma, tais inferências necessitam de novas investigações. Sendo assim, sugere-se que além de se repetir os ensaios em *Looping* buscando minimizar a influência do OD, sejam investigadas formas de identificar se tal corrosão está mais relacionada ao OD ou mais relacionada à MIC e geração biogênica de H<sub>2</sub>S. Para isso indica-se: **(i)** instalação de pequenos trechos de dutos metálicos completos para serem avaliados quanto à morfologia e posição dos *pits* ao final do ensaio, uma vez que a MIC tende a formar *pits* localizados na geratriz inferior da tubulação, enquanto a corrosão pelo OD tende a ser generalizada em todo o diâmetro interno e, **(ii)** a

realização de coleta dos resíduos de corrosão depositados sobre os cupons para análises de metais, a fim de identificar a maior ou menor presença de óxidos (que se correlacionariam à contaminação por OD) e sulfeto de ferro (que se correlacionaria com a MIC e geração biogênica do H<sub>2</sub>S).

## **6.5. AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO USO DE BACTERÍOFAGOS**

### **6.5.1. Ecotoxicidade**

Conforme esperado, os resultados de ecotoxicidade dos produtos biocidas, THPS 75% e 40%, foram extremamente elevados, 0,0000134% e 0,0000084% (CE50 > 10<sup>-5</sup> %), respectivamente.

Entretanto, vale ressaltar que a ecotoxicidade do produto com menor concentração (40%) foi cerca de 10x maior que a do produto com maior concentração (75%), indicando que a ecotoxicidade deles não está relacionada apenas ao princípio ativo biocida, mas também aos demais compostos utilizados na formulação, os quais, em geral, não são revelados pelos fornecedores.

Já o coquetel fágico apresentou ecotoxicidade extremamente inferior à ecotoxicidade dos biocidas, algo em torno de pelo menos 1 milhão de vezes menor.

A ecotoxicidade dos lotes de coquetel fágico avaliados, nas concentrações de 10<sup>7</sup> e 10<sup>9</sup> UFP/ml, ficou em torno de 41 e 24%, respectivamente, o que poderia indicar que uma diluição de 100x no número de partículas virais confere uma redução em torno de 50% na ecotoxicidade. Contudo, a ecotoxicidade do meio LB residual (sem fagos) foi cerca 50% mais alta (13%) que a ecotoxicidade do coquetel em maior concentração (10<sup>9</sup> UFP/ml), o que indica que grande parte da ecotoxicidade observada pode estar relacionada aos componentes residuais do meio de cultura utilizado para crescimento das bactérias hospedeiras do processo de produção dos fagos ou subprodutos gerados nesse processo.

Em função disso, não é possível afirmar que a ecotoxicidade tenha relação direta de algum efeito dos fagos diretamente sobre as células da bactéria *V. fischeri*. Mas se for esse o caso, pode-se esperar maiores percentuais de CE50 (ou seja, menor ecotoxicidade) quando forem realizados ensaios com organismos teste de cadeia trófica superior.

O principal aspecto que restringe a comparação do coquetel frente aos biocidas comerciais quanto à ecotoxicidade é o fato de que, enquanto os biocidas foram avaliados em suas formulações finais, não é possível reproduzir em laboratório a concentração final esperada para um coquetel fágico produzido em escala comercial (no mínimo  $10^{11}$  UFP/ml), ficando tal análise, restrita a concentrações inferiores, cuja composição dos componentes residuais dos insumos utilizados no meio de cultivo, provavelmente, não representam adequadamente um possível produto comercial.

Adicionalmente, enquanto a dosagem dos produtos biocidas se baseia na massa do produto (mg/L), ou seja, leva em consideração a densidade do produto para se fazer o cálculo do volume a ser dosado, a dosagem do coquetel fágico leva em consideração a concentração de partículas virais no produto. Sendo que a densidade em si não muda significativamente mesmo em concentrações muitas ordens de grandeza superiores. Ou seja, coquetéis com  $10^7$  ou  $10^9$  UFC/ml possuem praticamente a mesma densidade de ( $1,04 \text{ g/cm}^3$ ) a qual, por sua vez, é bem próxima à densidade da água, tornando-se difícil uma comparação quantitativa dos produtos em relação às dosagens praticadas em campo.

De qualquer forma, comparando-se as dosagens praticadas em campo para os biocidas e os respectivos valores de ecotoxicidade obtidos (**Tabela 28**), pode-se afirmar que os biocidas são utilizados em concentrações cerca de 1000x maiores que a CE50.

Já para o coquetel fágico, ainda que se desconsidere as particularidades e restrições da comparação citada acima, com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que a CE50 de cada concentração é mais próxima à concentração de dosagem a ser praticada ( $10^7$  UFP/ml), variando em torno de 10x para mais ou 10x para menos (entre  $10^6$  e  $10^8$  UFP/ml). Ainda assim, este é um resultado comparativamente melhor em relação à ecotoxicidade da concentração de dosagem praticada para os biocidas comerciais (1000x superior à CE50).

**Tabela 28.** Análise comparativa dos valores de CE50 obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda para ambientes marinhos pelo sistema Microtox®, frente às concentrações de dosagem praticadas para biocidas e esperadas para o coquetel fágico em plataformas de petróleo.

	Produto	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Concentração de dosagem praticada em campo		CE50 <sub>15min</sub>	
1	<b>Biocida padrão THPS 75%</b>	1,370	200 mg/L	0,0149%	0,0000134%	
2	<b>Biocida para tanques THPS 40%</b>	1,320		0,0151%	0,0000084%	
3	<b>Coquetel fágico (10<sup>9</sup> UFP/ml)</b>	1,043	10 <sup>7</sup> UFP/ml		2,4 x 10 <sup>8</sup> UFP/ml	24%
4	<b>Coquetel fágico (10<sup>7</sup> UFP/ml)</b>	1,041			4,1 x 10 <sup>6</sup> UFP/ml	41%

Tal comparação, também reforça a hipótese de que o resultado da ecotoxicidade pode não ser linear e diretamente relacionado à concentração de fagos. Provavelmente ele é influenciado sobretudo pelos demais componentes residuais do meio de produção, o que ainda pode ser amplamente otimizado em uma escala de produção industrial minimizando este efeito.

Contudo, apesar da literatura científica de modo geral, apresentar como uma das principais vantagens dos fagos, o fato deles não causarem ecotoxicidade, pois somente seriam capazes de impactar suas bactérias hospedeiras (DEC; WERNICKI; URBAN-CHMIEL, 2020; KUTTER et al., 2010; LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011; WRIGHT et al., 2009), até o momento, não foram encontrados artigos publicados que de fato tenham realizado qualquer tipo de ensaio ecotoxicológico, quer seja com um coquetel fágico comercial ou com uma solução contendo um ou mais fagos (principalmente utilizando alguma bactéria como organismo teste).

Sendo assim, o resultado de ecotoxicidade obtido nesse estudo para o coquetel fágico selecionado, trata-se de um dado inédito na literatura. Portanto, estudos mais aprofundados, com maior abrangência e repetibilidade são necessários e essenciais, sobretudo utilizando concentrações mais altas de fagos e em um coquetel produzido em escala industrial.

De qualquer forma, estes resultados, ainda que preliminares, permitem afirmar que o coquetel fágico é, sem dúvida, um produto ambientalmente muito mais seguro e adequado que os biocida comerciais, comumente usados na indústria do petróleo.

### 6.5.2. Biodegradabilidade

Em relação aos teores de DQO medidos, observa-se que os valores entre os produtos biocidas são razoavelmente proporcionais aos teores de THPS em cada produto (75% e 40%), sendo a DQO total do biocida para tanques 43% inferior à DQO do biocida padrão. Além disso, os valores de DOQ para ambos os produtos biocidas são altos, sendo isto, por si só, um indicativo de provável baixa biodegradabilidade.

Já os teores de DQO do coquetel fágico e do meio LB residual representam cerca de 1,5% e 2,5% dos teores de DQO dos produtos biocidas padrão e para tanques respectivamente, indicando, portanto, um maior potencial de serem produtos rapidamente biodegradados.

Em relação à comparação entre o coquetel fágico e o meio LB residual, os teores de DQO são razoavelmente próximos, diferindo em torno de apenas 7%, indicando que a lise das células durante a produção dos fagos, bem como os procedimentos laboratoriais para concentração e formulação do coquetel, provavelmente, pouco interferem na DQO do produto final, ao menos para a concentração de  $10^9$  UFP/ml, em condições de produção laboratoriais.

Quanto aos resultados de  $O_2$  medidos nos tempos avaliados (0, 7, 14 e 28 dias), observa-se que não ocorreram diferenças entre as duplicatas avaliadas, garantindo alta confiabilidade e reprodutibilidade do ensaio. Contudo, observa-se que os consumos de  $O_2$  foi baixo em todos os produtos avaliados, mesmo após 28 dias de teste (0,4 a 0,8 mg/L), ou seja, ficaram bem próximos ao consumo do controle branco.

Por sua vez, o consumo de  $O_2$  nos controles da toxicidade para todos os produtos se mantiveram bem próximos ao consumo da substância de referência, indicando que a presença dos produtos não provoca efeito inibitório na biodegradabilidade do benzoato de sódio, assim como, o consumo de  $O_2$  nos controles físico-químicos se mantiveram bem próximos de zero, ou seja, equivalentes ao controle branco, indicando que não ocorre degradação do  $O_2$  por mecanismos abióticos como, por exemplo, hidrólise ou adsorção.

Isso significa que todos os produtos apresentaram percentuais de biodegradabilidade muito baixos, sendo classificados como não biodegradáveis.

Para os produtos biocidas, este já é um resultado esperado e bem conhecido, entretanto, para o coquetel de fagos é um resultado contrário ao que se encontra na literatura, que em geral considera que devido à sua natureza e especificidade, um

produto à base de fagos seria classificado como de alta biodegradabilidade (DEC; WERNICKI; URBAN-CHMIEL, 2020; KUTTER et al., 2010; LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011; WRIGHT et al., 2009) e, portanto, ambientalmente mais interessante.

Porém, até o presente momento, não foi encontrado nenhum artigo que tenha realizado um teste de biodegradabilidade de fato utilizando uma suspensão de um ou mais fagos. Além disso, todas as fichas de dados (equivalentes à FISPQ nacional) de produtos à base de fagos comercializados no exterior, encontradas até o momento, para diferentes aplicações, trazem a informação de persistência e degradabilidade como dados não disponíveis (INTRALYTIX, 2022; OMNILYTICS INC., 2022).

Em relação ao meio LB residual, esperava-se que ele apresentasse uma biodegradabilidade maior que a do coquetel fágico, uma vez que os fagos poderiam atuar sobre os microrganismos presentes na água do mar, interferindo no resultado da biodegradabilidade, enquanto o meio de cultura, basicamente estimularia a atividade microbiana.

Entretanto, isso não foi observado. A biodegradabilidade do meio LB residual (1,25%) em 28 dias foi praticamente a metade da biodegradabilidade do coquetel fágico (2,32%), nesse mesmo tempo. Pode-se imaginar então, que os componentes do meio e/ou outras substâncias produzidas pelas bactérias hospedeiras durante a produção dos fagos, são provavelmente as responsáveis pela baixa biodegradabilidade observada, o que por sua vez, trata-se de um parâmetro que poderá ainda ser amplamente otimizado em escala de produção comercial.

O meio LB é composto basicamente por extrato de levedura e triptona. Não foram encontrados artigos que tenham testado essas substâncias pelo método de biodegradabilidade em água do mar da OECD 306 ou qualquer outro ensaio equivalente, assim como, as principais FISPQs encontradas para estes reagentes comerciais de diferentes fornecedores (MERCK, 2015; MILLIPORE, 2021, 2022; SIGMA-ALDRICH, 2015) trazem a informação de persistência e degradabilidade como dados não disponíveis. Apenas uma FISPQ para triptona foi encontrada com a descrição “espera-se que seja biodegradável” (OXOID, 2013).

De qualquer forma, comparativamente aos biocidas, a biodegradabilidade do coquetel fágico foi cerca de 100x superior, demonstrando que, ainda que esse resultado de baixa biodegradabilidade venha a se confirmar em estudos futuros e em suspensões de fagos preparadas em escala industrial, continuamos nos referindo a um produto de menor impacto ambiental em comparação a biocidas químicos.

Conforme análise comparativa, apresentada na **Tabela 29**, considerando a concentração utilizada no teste de biodegradabilidade padrão (2 mg/L), a concentração dos produtos biocidas no teste foi 100x inferior à concentração de dosagem em campo (200 mg/L), enquanto, a concentração do coquetel fágico, foi cerca de 10x inferior ( $1,92 \times 10^6$  UFP/ml) à concentração esperada para seu uso em campo ( $10^7$  UFP/ml).

**Tabela 29.** Concentração dos produtos utilizada no teste de biodegradabilidade em comparação às dosagens praticadas para biocidas e esperadas para o coquetel fágico em plataformas de petróleo.

	Produto	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Concentração de dosagem praticada em campo	Concentração no teste de biodegradabilidade
1	Biocida padrão THPS 75%	1,37	200 mg/L	2 mg/L
2	Biocida para tanques THPS 40%	1,32	200 mg/L	2 mg/L
3	Coquetel fágico ( $10^9$ UFP/ml)	1,04	$10^7$ UFP/ml	$1,92 \times 10^6$ UFP/ml

Ainda assim, a biodegradabilidade dos biocidas foi muito inferior (cerca de 100x menor) à do coquetel fágico, portanto, com base nesses resultados, ainda que considerado como não biodegradável em água do mar segundo o padrão da OECD 306, pode-se dizer que, comparando-se as dosagens a serem praticadas em condições reais, a biodegradabilidade do coquetel é em torno de 1000x maior que a biodegradabilidade dos biocidas.

Além disso, conforme os resultados observados nos controles da toxicidade, na concentração de teste (2 mg/L) os produtos biocidas não apresentaram efeito antimicrobiano na microbiota da água do mar ao ponto de impedir a biodegradação da substância de referência. Assim como, o coquetel fágico, na concentração de teste ( $1,92 \times 10^6$  UFP/ml) também não provocou inibição da biodegradabilidade do benzoato de sódio.

Sendo assim, com base nesses resultados, pode-se concluir que os fagos selecionados para compor o coquetel fágico utilizado, não possuem efeito danoso aos microrganismos naturalmente presentes na água do mar e, provavelmente, podem ser considerado um produto ambientalmente seguro, mesmo se descartado no mar após

sua utilização, em uma concentração razoavelmente alta ( $10^6$  UFP/ml), bem próxima à concentração que se pretende avaliar em campo ( $10^7$  UFP/ml).

Ainda, segundo a própria norma OECD 306, um resultado negativo de biodegradabilidade não exclui o potencial do produto ser biodegradado no meio ambiente, apenas indica que mais estudos são necessários (OECD, 1992b). Desta forma, entende-se que até o momento, este resultado de avaliação da biodegradabilidade por um método de referência reconhecido e aplicado internacionalmente, ainda que preliminar, trata-se de um dado inédito na literatura e que, portanto, são essenciais maiores investigações e estudos mais aprofundados, com maior abrangência e repetibilidade, sobretudo a partir de composições de fagos produzidas em escala industrial.

Dessa forma, mais estudos são necessários, sobretudo, utilizando concentrações mais próximas daquelas a serem encontradas na prática, ou seja, levando em consideração não apenas a concentração do produto e de sua dosagem, mas também, a dispersão e diluição do produto no ambiente, bem como as características físico-químicas e biológicas do local de interesse.

### **6.5.3. Corrosividade**

Quanto ao pH dos produtos, apesar do pH dos biocidas puros serem bem semelhantes (próximos de 3,0) observa-se que imediatamente após a sua dosagem (200 mg/L) na água do mar natural, o pH do fluido com o biocida padrão fica mais baixo (em torno de 6,9) que do biocida para tanques (que fica em torno de 8,3), o que provavelmente se refere ao efeito preventivo da corrosividade ocasionado pelos demais componentes da formulação do produto para tanques (como a presença do inibidor de corrosão).

Contudo, após algumas horas, ambos os pHs sobem e permanecem equivalentes (na faixa de 8,6 a 9,1) ao longo do restante do tempo dos ensaios, o que demonstra o efeito tamponante da água do mar (DICKSON, 1993; JURY et al., 2013; THOMPSON; BONNAR, 1931).

Já o coquetel fágico puro, o qual naturalmente apresenta um pH mais neutro, levemente básico (pH = 7,9), manteve o pH na faixa de 8,6 a 9,1 após sua dosagem na concentração de  $10^7$  UFP/ml (1% v/v), ao longo de todo o tempo do ensaio, semelhante ao controle. Esse fato, por si só, já é uma característica vantajosa para

um produto a ser dosado nos sistemas reais, pois demonstra que o produto não incrementa a corrosividade do fluido.

Quanto às taxas de corrosão, considerando a classificação da corrosividade segundo a Norma NACE SP0775-2018-SG (NACE INTERNATIONAL, 2018), pode-se dizer que os valores médios de taxas de corrosão em água do mar obtidos nos ensaios de corrosividade para o controle (0,022 mm/ano), o coquetel fágico (0,015 mm/ano) e o biocida para tanques (0,014 mm/ano) são classificados como baixos, enquanto a taxa de corrosão do biocida padrão (0,031 mm/ano) é classificada como moderada.

Os valores das taxas de corrosão do coquetel fágico e do biocida para tanques se aproximaram muito e podem ser considerados equivalentes, já o valor do controle ficou um pouco acima destes, porém ainda classificado como baixo. Portanto, pode-se afirmar que nem o biocida pra tanques, nem o coquetel incrementam a corrosividade da água do mar natural.

Agora, fazendo-se uma análise comparativa entre as taxas de corrosão dos biocidas, o biocida padrão apresentou uma corrosividade cerca de 50% superior ao biocida para tanques, o que já o classifica com um grau de corrosividade moderado mesmo em água do mar (que possui alto poder tamponante).

Esse resultado já era esperado, uma vez que se sabe que o THPS 75% é bastante corrosivo (KEASLER et al., 2017; SHARMA et al., 2018). Por outro lado, o biocida para tanques, apesar de também ser à base de THPS, possui uma concentração de THPS inferior (40%) ao biocida padrão e também possui um inibidor de corrosão em sua formulação que tende a formar um filme de proteção na superfície do metal (ASKARI; M. et al., 2018; SASTRI; V.S., 2002).

Em relação ao coquetel fágico, apesar das taxas de corrosão do coquetel e do biocida para tanques terem sido muito semelhantes, não se pode imaginar que a razão disso seja a mesma. Ou seja, não seria algum componente do meio de produção do coquetel que tem algum efeito protetor tal como o inibidor de corrosão presente no biocida para tanques. Entretanto tal hipótese não foi testada. A hipótese mais plausível é que de fato, nem os fagos, nem nenhum outro componente do coquetel, possui características corrosivas, ainda que os componentes do meio de cultura não tenham sido testados individualmente.

Sendo assim, pode-se afirmar que o coquetel fágico avaliado não possui características corrosivas e que, portanto, não se espera que venha a ser um produto que impacte a corrosividade dos fluidos nem o próprio sistema de dosagem.

#### 6.5.4. Inibição do tratamento biológico de água de produção

Em relação às taxas de remoção de amônia observadas no experimento, todos os controles apresentaram taxas bastante elevadas, durante todo o período avaliado, sempre acima de 90% e em sua maioria na faixa de 96 a 99 %, o que demonstra a alta estabilidade, robustez e eficiência do lodo aclimatado a ambas as salinidades selecionadas.

Nos Tratamentos a 55 g/L de salinidade observou-se que imediatamente após a dosagem do coquetel fágico, ocorreu uma queda média, em torno de 35%, na taxa de remoção de amônia, a qual continuou caindo, atingindo uma inibição máxima em torno de 42% no 6º dia. Contudo, cerca de 1 semana depois (8º dia), essa taxa se recupera razoavelmente, atingindo 76% de nitrificação e a partir de 2 semanas (16º dia), aproximadamente, os níveis de remoção de amônia se recuperam totalmente, retomando patamares próximos aos do Controle, com níveis de nitrificação acima de 90%.

Esse resultado demonstra que, ainda que venha a ocorrer um grande descontrole na utilização do coquetel fágico na plataforma de petróleo, que essa água de produção contendo um alto residual de fagos chegue ao terminal para ser tratada e mesmo que essa fosse a única água a entrar na unidade de tratamento, o impacto no sistema biológico tenderá a ser pequeno e rapidamente recuperável de forma natural sem necessidade de qualquer intervenção, o que demonstra a robustez do atual processo biológico de tratamento de água de produção industrial.

Apesar da escassez de dados em literatura científica sobre a avaliação de fagos em contextos semelhantes ao deste estudo, uma informação interessante e que de certa forma corrobora os resultados aqui observados, foi encontrada em relação a um produto comercial à base de fagos utilizado em aquicultura, chamado CUSTUS®<sub>YRS</sub>, da empresa ACD Pharmaceuticals (ACD PHARMA) sediada na Noruega (ACD PHARMA, 2022).

Segundo a própria ACD PHARMA, o produto CUSTUS®<sub>YRS</sub> foi lançado em 2018, como sendo o primeiro produto à base de fagos aplicado à aquicultura no mundo. O produto contém fagos específicos para bactérias do gênero *Yersinia*, que causam doenças (yersiniosis) com alta mortalidade em peixes, sobretudo salmões (CARSON; WILSON, 2009; TOBBACK et al., 2007) e que também se aderem

formando biofilmes nos materiais e equipamentos das fazendas de produção de peixes (COQUET et al., 2002).

Informações divulgadas no site da ACD PHARMA relatam que eles demonstraram que a aplicação do produto controla a pressão de infecção de *Y. ruckeri* sem causar nenhum impacto na microbiota necessária ao adequado funcionamento dos biofiltros utilizados nos tanques de produção dos peixes (ACD PHARMA, 2022).

Nos Tratamentos a 125 g/L de salinidade, observa-se que logo após a dosagem do coquetel fágico, ocorre uma queda menor na taxa de remoção de amônia (em torno de 24%) do que aquela observada na salinidade de 55 g/L (cerca de 35% de inibição). Porém, no 6º dia, essa queda aumenta para cerca de quase 64% de inibição e se acentua até atingir uma inibição máxima de cerca de 82% após quase 2 semanas (13º dia). A partir de então, a nitrificação começa a se recuperar, porém não se recupera completamente dentro dos 20 dias avaliados na fase experimental, quando ainda permanece apenas com cerca de 61% de remoção de amônia.

Em resumo, pode-se dizer que enquanto a 55 g/L de salinidade a inibição máxima da nitrificação atinge cerca de 42%, em menos de uma semana após a dosagem dos fagos, na salinidade de 125 g/L essa inibição máxima é maior, atingindo cerca de 82%, porém ela leva mais tempo para acontecer, pois só ocorre depois de cerca de 2 semanas após a dosagem dos fagos.

Já a recuperação dessa nitrificação não ocorre tão rápido a 125 g/L de salinidade como ocorre a 55 g/L, onde a nitrificação já se recupera completamente em apenas 2 semanas. Contudo, pode-se afirmar que a recuperação também ocorre para a salinidade de 125 g/L, porém, não é possível estimar esse prazo precisamente, pois o último ponto avaliado semanalmente foi no 20º dia após a dosagem dos fagos (quando a inibição ainda permanecia em 39%) e depois disso, só foi feita uma análise 35 dias após o encerramento da fase experimental, quando então a nitrificação já se encontrava recuperada por completo. Ou seja, pode-se afirmar que a recuperação da nitrificação na salinidade de 125 g/L ocorre mais lentamente que a 55g/L e que acontece em algum momento entre 20 e 55 dias depois da dosagem dos fagos.

Provavelmente, tal diferença entre as salinidades avaliadas ocorre em função da diversidade das microbiotas que compõem cada um dos sistemas e devido à pressão ambiental à qual o sistema de maior salinidade está submetido, o que o deixa mais sensível à perda de sua eficiência e sua estabilidade, em função de choques e/ou perturbações das variáveis químicas e ambientais. Situação esta, que também

já foi observada com esses lodos aclimatados frente a variações de temperatura e de disponibilidade de carbono (dados ainda não publicados).

Nesse contexto, para o cenário de um futuro tratamento da água de produção hipersalina, seria necessária uma investigação mais detalhada do potencial impacto desse coquetel fágico, considerando **(i)** variações na concentração de dosagem do coquetel, **(ii)** simulação dessa dosagem frente à atual vazão de alimentação do sistema, **(iii)** tempos variados de residência da água de produção após a dosagem do coquetel, bem como **(iv)** variações na vazão de alimentação, de modo a se estimar com mais precisão o tempo de recuperação das taxas de remoção de amônia e as possíveis estratégias operacionais a serem adotadas, caso necessário.

Quanto à quantificação dos fagos, os resultados demonstraram que nenhum dos fagos utilizados no coquetel encontrou hospedeiros capazes de permitir a produção de novas partículas virais no lodo destes sistemas, uma vez que após cerca de 1 semana (8º dia), nenhuma amostra do fluido analisado foi capaz de gerar UFP nas bactérias hospedeiras.

Apenas no 6º dia após a dosagem é que os fagos de *E. coli* ainda se faziam presentes, enquanto o fago de *Enterobacter* já não aparecia mais, provavelmente devido ao fato dos primeiros estarem em maior concentração no coquetel, visto que a formulação desse coquetel se refere a 3 fagos de *E. coli* para 1 de *Enterobacter*.

Sendo assim, pode-se dizer que mesmo em uma possível situação de alto descontrole na aplicação, o uso desse coquetel fágico, mesmo sendo composto por fagos não-específicos, não representa impacto aos sistemas atuais de tratamento biológico de água de produção em terminais de petróleo. No entanto, é necessária uma avaliação mais aprofundada para um futuro cenário de tratamento em condições hipersalinas, abrangendo variações de concentração de fagos e de vazão de alimentação. Além disso, pode-se dizer que os fagos são depurados pelo próprio sistema, não representando risco a montante do tratamento, ou seja, ao lançamento por emissários submarinos desse efluente tratado tal como é feito hoje.

## **7. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS**

### **7.1. INÓCULOS MICROBIANOS**

Inóculos microbianos representativos dos cenários de interesse de aplicação da tecnologia de bacteriófagos foram obtidos a partir das amostras coletadas em tanque *stop* e em tanques de armazenamento de petróleo de plataformas críticas em biocorrosão e geração biogênica de H<sub>2</sub>S, de modo que as respectivas culturas de BRS tornaram-se disponíveis, sendo utilizadas como referência principal para os diversos estudos em andamento.

### **7.2. SELEÇÃO DO COQUETEL FÁGICO**

Foram selecionados quatro fagos não-específicos para compor o coquetel fágico utilizado tanto nos estudos nos *Loopings* da UFV, quanto nos ensaios de avaliação de potenciais impactos ambientais e operacionais. Essa seleção foi realizada com base em um conjunto amplo de resultados experimentais que avançaram continuamente sob diferentes aspectos e que já obtiveram resultados significativos suficientes para subsidiar a definição de um produto mínimo viável (MVP) a ser avaliado futuramente em um teste piloto de campo.

### **7.3. ESTUDOS EM SISTEMAS DE LOOPING**

O primeiro estudo com fagos no *Looping* do CENPES comprovou a remoção efetiva do biofilme através dos dados de MEV, perfilometria e determinação da Rq e uma redução em torno de 80% do H<sub>2</sub>S gerado em apenas 15 dias após a dosagem do coquetel fágico, indicando ainda a possibilidade de um efeito de longo prazo, observado por 5 meses após a dosagem do coquetel, o que impacta positivamente a frequência de dosagem e conseqüentemente a viabilidade econômica da tecnologia.

O segundo estudo nos *Loopings* da UFV, já utilizando o coquetel fágico pré-selecionado, foi impactado pela contaminação com o OD que influenciou os resultados de corrosão e não permitiu confirmar os níveis de redução de H<sub>2</sub>S. Contudo, os resultados obtidos através das análises de DO<sub>600nm</sub>, ATP, consumo de sulfato, MEV,

perfilometria e Rq, corroboraram a ação dos fagos sobre a comunidade microbiana do biofilme e indicaram efeito significativo na desaceleração do processo de corrosão e de formação de *pits*, resultando em uma taxa de corrosão 30% menor e uma Rq 51% menor na presença do tratamento com o coquetel fágico.

#### **7.4. POTENCIAIS IMPACTOS AMBIENTAIS**

Quanto aos potenciais impactos ambientais avaliados, os resultados obtidos são inéditos, porém ainda preliminares. Portanto, precisam ser aprofundados e um amplo nicho de investigação se abre nesse sentido, visto que não foram encontrados estudos científicos na literatura sobre este tema para produtos à base de fagos. De qualquer forma, os resultados obtidos, já demonstram que o coquetel fágico, quando comparado aos produtos biocidas, possui ecotoxicidade bem inferior e biodegradabilidade muito superior.

##### **7.4.1. Ecotoxicidade**

Os resultados de ecotoxicidade aguda para ambientes marinhos demonstram que o coquetel fágico mesmo na concentração mais alta avaliada ( $10^9$  UFP/ml) apresenta ecotoxicidade pelo menos 1 milhão de vezes inferior à ecotoxicidade dos biocidas à base de THPS, sendo, sem dúvida, um produto ambientalmente muito mais seguro e adequado que qualquer biocida. Além disso, o meio LB residual apresenta uma ecotoxicidade cerca de 2 vezes superior à ecotoxicidade do coquetel fágico, indicando que provavelmente, grande parte do potencial ecotóxico do coquetel não se relaciona diretamente aos fagos, mas provavelmente aos componentes residuais do meio de cultivo ou subprodutos da sua produção, os quais podem ser otimizados em escala industrial.

##### **7.4.2. Biodegradabilidade**

Os resultados de biodegradabilidade em água do mar, demonstraram que o coquetel fágico teria que ser classificado como não biodegradável. Contudo, a partir dos resultados de controle da toxicidade, pôde-se concluir que o coquetel fágico não apresentou efeito danoso ou inibitório aos microrganismos naturalmente presentes na

água do mar e portanto, ele pode ser considerado ambientalmente seguro, visto que a baixa biodegradabilidade observada, provavelmente, se deve muito mais aos componentes residuais do meio de cultura utilizado na produção do que propriamente aos fagos.

## **7.5. POTENCIAIS IMPACTOS OPERACIONAIS**

Quanto aos potenciais impactos operacionais avaliados, a corrosividade do coquetel fágico se demonstrou inferior à do biocida padrão e equivalente à do biocida para tanques, o que já representa ganhos operacionais se utilizado em escala industrial em substituição ou mesmo em conjunto aos biocidas. A avaliação da inibição ao processo de nitrificação do tratamento biológico de água de produção, demonstrou que o coquetel fágico não confere impacto aos sistemas atuais de tratamento dos terminais de petróleo e nem no descarte do efluente final.

### **7.5.1. Corrosividade**

As taxas de corrosão obtidas demonstraram que o coquetel fágico não possui características corrosivas, sendo classificado como um produto de corrosividade baixa, equivalente ao próprio controle e ao atual biocida para tanques e bem inferior à do biocida padrão. Portanto, pode-se afirmar que trata-se de um produto que não contribuirá com incremento na corrosividade dos sistemas em que se almeja sua aplicação.

### **7.5.2. Inibição do tratamento biológico de água de produção**

A avaliação de um potencial impacto do coquetel fágico no tratamento biológico da água de produção, demonstrou que a utilização desses fagos em plataformas, mesmo sendo fagos não-específicos, não representa impacto à inibição do processo de nitrificação e desenquadramento dos efluentes tratados nos sistemas biológicos atualmente utilizados nos terminais e nem ao efluente tratado lançado por emissários submarinos.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

A partir do conjunto de resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os fagos não-específicos, possuem atuação em biofilmes enriquecidos com BRS, representativos da indústria do petróleo, com grande potencial de desempenho na remoção desses biofilmes e redução da geração biogênica de H<sub>2</sub>S sobretudo em tanques de plataformas.

Os ensaios realizados no *Looping* do CENPES demonstraram a remoção do biofilme e a redução de cerca de 80% do H<sub>2</sub>S gerado em apenas 15 dias após a dosagem dos fagos.

Já os ensaios realizados nos novos sistemas de *Looping* da UFV, apesar de terem sido influenciados pela contaminação com oxigênio e não terem permitido a análise dos teores de H<sub>2</sub>S, confirmaram a ação dos fagos sobre a comunidade microbiana do biofilme e indicaram efeito significativo na desaceleração do processo de corrosão e de formação de *pits*.

Adicionalmente, foram gerados resultados inéditos demonstrando que o coquetel fágico pré-selecionado apresenta características vantajosas em comparação a produtos químicos biocidas, tanto do ponto de vista ambiental (menor ecotoxicidade e maior biodegradabilidade), quanto operacional (baixa corrosividade e baixo impacto ao processo de nitrificação do sistema de tratamento biológico de água de produção).

## 9. PERSPECTIVAS

### 9.1. ESTUDOS EM SISTEMAS DE LOOPING

- Realizar novos ensaios nos sistemas de *Loopings* da UFV, a fim de se obter principalmente resultados de geração de H<sub>2</sub>S e de taxas de corrosão com menor influência da contaminação por OD;
- Realizar ensaios de longo prazo nos *Loopings*, a fim de se avaliar em um primeiro momento tempos mais longos após a dosagem do coquetel fágico e em um segundo momento, avaliar a frequência de dosagem do coquetel;
- Padronizar os tempos e procedimentos de comissionamento, inoculação, alimentação e dosagem de solução nutritiva nos ensaios em *Loopings*, a fim de se obter uma melhor comparação dos resultados frente à influência dos parâmetros físico-químicos;
- Incluir um sensor para análise do potencial redox (ORP) nos *Loopings* da UFV, visando o monitoramento desse parâmetro relevante para a atividade das BRS.
- Incluir a quantificação da densidade e profundidade dos pits dos cupons amostrados e análise de metais e resíduos dos cupons;
- Realizar estudos de caracterização da diversidade microbiana, no fluido e nos cupons, frente ao efeito do coquetel fágico a partir do momento em que os ensaios nos *Loopings* da UFV forem padronizados, permitindo sua reprodutibilidade;
- Avaliar diferentes culturas microbianas mistas em ensaios em *Looping*, obtidas de diferentes sistemas operacionais a fim de se confirmar a abrangência da tecnologia e estimar potenciais níveis de redução de corrosão e de geração de H<sub>2</sub>S para os diferentes cenários de aplicação.

### 9.2. ECOTOXICIDADE

- Realizar novos testes de ecotoxicidade pelo sistema Microtox® com o mesmo coquetel fágico, porém em diferentes concentrações, preferencialmente concentrações mais altas e com o coquetel produzido em escala industrial;

- Avaliar a ecotoxicidade individual de cada um dos 4 fagos que compõe o coquetel fágico utilizado nesse estudo, de modo a identificar qual ou quais possuem maior efeito sobre a *V. fischeri*, a ser realizado tanto pelo sistema Microtox®, quanto pela determinação de curvas de crescimento da bactéria na ausência e presença de cada fago;
- Realizar testes de ecotoxicidade aguda e crônica, para ambientes marinhos e de água doce, com organismos teste de diferentes níveis tróficos;
- Ampliar os estudos de avaliação da ecotoxicidade para produtos biológicos em desenvolvimento, sobretudo produtos à base de fagos.

### 9.3. BIODEGRADABILIDADE

- Realizar novos testes de biodegradabilidade em água do mar com o mesmo coquetel fágico avaliado neste estudo, porém preferencialmente produzido em escala industrial;
- Realizar testes de biodegradabilidade em água do mar com o meio LB integral e os seus componentes individuais (triptona e extrato de levedura);
- Realizar análises de DBO, nos produtos avaliados, bem como no meio LB integral e nos seus componentes individuais, conforme o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 5210 Respirometric Method* (APHA; AWWA; WEF, 2017) de modo a se demonstrar a relação DBO/DQO como um indicativo complementar de biodegradabilidade;
- Realizar testes de biodegradabilidade imediata referentes a ambientes terrestres e de água doce, conforme teste nº 301 da OECD: *Ready biodegradability* (OECD, 1992a), com o mesmo coquetel fágico avaliado neste estudo, porém preferencialmente produzido em escala industrial;
- Incentivar a capacitação de novas instituições de pesquisa, empresas e startups na execução de testes de biodegradabilidade conforme métodos de referência da OECD (nº 306 e 301) e/ou equivalentes reconhecidos pela legislação brasileira;
- Ampliar os estudos de avaliação da biodegradabilidade para produtos biológicos em desenvolvimento, sobretudo produtos à base de fagos.

#### **9.4. CORROSIVIDADE**

- Realizar estes mesmos ensaios de corrosividade em condições bióticas (com adição de um inóculo enriquecido em BRS), de modo a comparar as taxas de corrosão e incluindo a obtenção de dados eletroquímicos, de modo a correlacioná-los com a formação do biofilme e o efeito dos produtos sobre ele;
- Realizar testes de corrosividade com os produtos puros, porém nas condições da especificação técnica de produtos biocidas para tanques de plataformas (com duração de 7 dias, a 60°C);
- Realizar estes ensaios de corrosividade, porém com o coquetel fágico produzido em escala industrial.

#### **9.5. INIBIÇÃO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUA DE PRODUÇÃO**

- Caracterizar a diversidade microbiana do lodo biológico nas diferentes salinidades, antes e após a dosagem do coquetel fágico, de modo a investigar correlações do efeito dos fagos nas bactérias nitrificantes e desnitrificantes, visando a identificação de novos fagos que possam apresentar menor efeito na microbiota hipersalina e/ou desenvolver estratégias de recuperação mais rápidas da nitrificação, nessas condições;
- Aprofundar os estudos na condição hipersalina, considerando variações na concentração de dosagem do coquetel, simulação dessa dosagem frente à atual vazão de alimentação do sistema, tempos variados de residência da água de produção após a dosagem do coquetel, bem como variações na vazão de alimentação, de modo a se estimar com mais precisão o tempo de recuperação das taxas de remoção de amônia e as possíveis estratégias operacionais a serem adotadas caso necessário.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON, S. T. et al. Editorial: Phage therapy: Past, present and future. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–7, 2017.

ABEDON, S. T.; MURRAY, K. L. Archaeal viruses, not archaeal phages: An archaeological dig. **Archaea**, v. 2013, 2013.

ABNT. **NBR 14725-2 - Produtos químicos - Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente. Parte 2: Sistema de classificação de perigo.** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 13 jun. 2009a.

ABNT. **NBR 14725-1 - Produtos químicos - Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente. Parte 1: Terminologia.** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 26 ago. 2009b.

ABNT. **NBR 15308 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com misídeos (Crustacea).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 26 maio 2017.

ABNT. **NBR 12648 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 7 mar. 2018.

ABNT. **NBR 15350 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 18 ago. 2020.

ABNT. **NBR 15411-1 - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri*.** Parte 1: Método utilizando bactérias recém-cultivadas. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 27 maio 2021a.

ABNT. **NBR 15411-2 - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri*.** Parte 2: Método de ensaio utilizando bactérias desidratadas. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 27 maio 2021b.

ABNT. **NBR 15411-3 - Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri*.** Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 27 maio 2021c.

ABNT. **NBR 16723 - Ecotoxicologia aquática - Método de ensaio com copépodos marinhos e estuarinos (Copepoda, Crustacea).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 25 ago. 2021d.

ABNT. **NBR 16181 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas.** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 25 ago. 2021e.

ABNT. **NBR 16530 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Artemia sp (Crustacea, Brachiopoda).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 23 set. 2021f.

ABNT. **ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.** 2022a. Disponível em: <<https://conteudo.abntcolegao.com.br/assinatura-de-normas-tecnicas>>. Acesso em: 15 de outubro de 2022.

ABNT. **NBR 12713 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 26 jan. 2022b.

ABNT. **NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 25 fev. 2022c.

ABNT. **NBR 15499 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes.** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 25 maio 2022d.

ABNT. **NBR 16456 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio de curta duração com embriões de mexilhões (Mollusca - Bivalvia).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 4 ago. 2022e.

ABNT. **NBR 13373 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera).** ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil, 8 set. 2022f.

ABO-ELMAATY, S.; EL DOUGDOUG, N. K.; HAZAA, M. M. Improved antibacterial efficacy of bacteriophage-cosmetic formulation for treatment of Staphylococcus aureus in vitro. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 2, p. 201–206, 2016.

ACD PHARMA. **CUSTUS®YRS: Bacteriophages against yersiniosis.** Disponível em: <<https://acdpharma.com/custusyrs-eng/>>. Acesso em: 29 de setembro de 2022.

AGBOLUAJE, M.; SAUVAGEAU, D. Bacteriophage Production in Bioreactors. Em: AZEREDO, J.; SILLANKORVA, S. (Eds.). **Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice, Methods in Molecular Biology**. v. 1693p. 173–193, 2018.

AKAMINE, R. N.; SOUSA, M. P.; WALDOW, V. DE A. **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO BIOCIDA THPS NA MICROBIOTA SÉSSIL (BIOFILME) DOS SISTEMAS DE INJEÇÃO DE ÁGUA DAS PLATAFORMAS P-57 E P-58 (UN-ES).** CENPES/PETROBRAS - Comunicação Técnica - CT TARH 018/2021, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2021.

AL-BLOUSHI, M. et al. Performance assessment of oxidants as a biocide for biofouling control in industrial seawater cooling towers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 59, p. 127–133, mar. 2018.

AL-HUMAM, A. A. et al. Drilling Fluids Microbial Impact and Mitigation. **Journal of Physical Science and Application**, v. 10, n. 1, 28 jan. 2021.

ALMEIDA, G. M. DE F.; SUNDBERG, L. R. The forgotten tale of Brazilian phage therapy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. e90–e101, 2020.

ALS. **Microtox Toxicity Test**. 2018. Disponível em: <<https://www.alsglobal.com/en/Search#q=microtox>>. Acesso em: 5 de agosto de 2022. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

AMCA. **Biofilm Control Program (BCP™)**. 2021. Disponível em: <<https://amsainc.com/bcp-chemistry-an-effective-biodispersant-for-cooling-tower-treatment-programs/>>. Acesso em: 16 de maio de 2021.

AMIN ALI, O. et al. Iron corrosion induced by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* at 70 °C. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 154, n. June, 2020.

ANANTHARAMAN, K. et al. Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. **ISME Journal**, v. 12, n. 7, p. 1715–1728, 2018.

ANDRADE, A. M. T. DE et al. **Offshore Production Units for Pre-Salt Projects**. All Days. **Anais**. OTC, 4 maio 2015.

ANDREWS, B.; FIELDS, S. Balance between promiscuity and specificity in phage  $\lambda$  host range. **ISME Journal**, 2021.

ANGELOPOULOU, A. et al. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis—live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 5–6, p. 564–580, 2019.

ANP. **Plano de Desenvolvimento do Campo de Marlim**. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/images/planosdesenvolvimento/Marlim.pdf>>. Acesso em: 8 de março de 2020.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd. ed. Standard Methods Organization, 2017.

ASKARI; M. et al. Film former corrosion inhibitors for oil and gas pipelines - A technical review. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 58, p. 92–114, out. 2018.

ASKARI, M. et al. Downhole corrosion inhibitors for oil and gas production – a review. **Applied Surface Science Advances**, v. 6, p. 100128, dez. 2021.

ASLAN, S.; SIMSEK, E. Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 24–29, ago. 2012.

ASTDR. **Public Health Statement for Sulfur Trioxide and Sulfuric Acid**. 2021. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/TSP/PHS/PHS.aspx?phsid=254&toxid=47>>. Acesso em: 26 de abril de 2022.

ASTM INTERNATIONAL. **G1-03: Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens**. West Conshohocken, PA, USA., 2017. Disponível em: <<https://www.astm.org/g0001-03r17e01.html>>

ASTM INTERNATIONAL. **G31-21: Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals**. West Conshohocken, PA, USA., 2021. Disponível em: <<https://www.astm.org/g0031-21.html>>

AUGUSTINOVIC, Z. et al. Microbes-oilfield enemies or allies? **Oilfield Review**, v. 24, n. 2, p. 4–17, 2012.

AZEREDO, J.; SILLANKORVA, S. **Bacteriophage therapy: From Lab to Clinical Practice**. [s.l.] Humana Press, 2018. v. 1693.

AZEREDO, J.; SUTHERLAND, I. The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 261–266, 2008.

BADAMSHIN, A. G. et al. Genesis of Organochlorine Compounds in Crude Oil and Petroleum Products (A Review). **Petroleum Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1190–1199, 2 nov. 2021.

BADER, M. S. H. Seawater versus produced water in oil-fields water injection operations. **Desalination**, v. 208, n. 1–3, p. 159–168, abr. 2007.

BALDONI-ANDREY, P. et al. **Detection and Monitoring of Biofilm Growth in the Seawater Sulfate Removal Units**. All Days. **Anais. SPE**, 20 maio 2015.

BALLANTYNE, B.; JORDAN, S. L. Chapter 9 - Biocides. Em: MARRS, T. C.; BALLANTYNE, B. (Eds.). **Pesticide Toxicology and International Regulation**. [s.l.] John Wiley and Sons Ltd, 2004.

BALOGH, B. et al. Phage Therapy for Plant Disease Control. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 48–57, 2010.

BARAKA-LOKMANE, S. et al. **Sea Water Desulphation – Optimisation of Scale Treatment and Reduction of OPEX & CAPEX**. Day 2 Thu, June 21, 2018. **Anais. SPE**, 20 jun. 2018.

BARTON, L. L.; FARDEAU, M.-L.; FAUQUE, G. D. **Chapter 10 - Hydrogen sulfide: a Toxic Gas Produced by Dissimilatory Sulfate and Sulfur Reduction and Consumed by Microbial Oxidation**. Springer Science+Business Media Dordrecht, v. 14, 2014.

BARTON, L. L.; FAUQUE, G. D. **Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 68, 2009.

BASAFA, M.; HAWBOLDT, K. Reservoir souring: sulfur chemistry in offshore oil and gas reservoir fluids. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 9, n. 2, p. 1105–1118, 2019.

BEEDER, J. et al. **Archaeoglobus fulgidus Isolated from Hot North Sea Oil Field Waters** **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. 1994.

BELGINI, D. R. B. et al. Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2689–2700, 2014.

BELGINI, D. R. B. et al. Integrated diversity analysis of the microbial community in a reverse osmosis system from a Brazilian oil refinery. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 473–486, set. 2018.

BENNETT, A. Membrane technology: Developments in ultrafiltration technologies. **Filtration + Separation**, v. 49, n. 6, p. 28–33, nov. 2012.

BEN-ZAKEN, H. et al. Isolation and Characterization of Streptococcus mutans Phage as a Possible Treatment Agent for Caries. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 825, 2021.

BERTHEAS, U. et al. Use of DBNPA to control biofouling in RO systems. **Desalination and Water Treatment**, v. 3, n. 1–3, p. 175–178, 2009.

BHATTACHARJEE, A. S. et al. Bacteriophage therapy for membrane biofouling in membrane bioreactors and antibiotic-resistant bacterial biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 8, p. 1644–1654, 2015.

BHATTACHARYA, S. K.; UBEROI, V.; DRONAMRAJU, M. M. Interaction Between Acetate Fed Sulfate Reducers and Methanogens. **Water Research**, v. 30, n. 10, p. 2239–2246, 1996.

BIOPORTEFOLIO. **BACTERIÓFAGOS**. 2015. Disponível em: <<https://webportefoliobio.weebly.com/blogue/bacteriofagos>>. Acesso em: 16 de maio de 2019.

BIRKELAND, N. K. et al. Complete genome sequence analysis of Archaeoglobus fulgidus strain 7324 (DSM 8774), a hyperthermophilic archaeal sulfate reducer from a North Sea oil field. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2017.

BLENKINSOPP, S. A.; COSTERTON, J. W. Understanding bacterial biofilms. **Trends in Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 138–143, 1991.

BORIE, C.; ROBESON, J.; GALARCE, N. Lytic bacteriophages in Veterinary Medicine: a therapeutic option against bacterial pathogen. **Archivos de Medicina Veterinari**, v. 46, n. 2, p. 167–179, 2014.

BURGER, E. D. et al. Flexible Treatment Program for Controlling H<sub>2</sub>S in FPSO Produced-Water Tanks. **SPE Projects, Facilities & Construction**, v. 2, n. 03, p. 1–9, 19 set. 2007.

BURROWES, B. et al. Bacteriophage therapy: Potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, n. 9, p. 775–785, 2011.

CALOW, P. P. **Handbook of Ecotoxicology**. Blackwell Science Ltd, 1998.

CAMPBELL, C. **Advances in testing and monitoring of biocides in oil and gas**. Elsevier Ltd, 2017.

CARLBERG, B. L. **Vacuum Deaeration - A New Unit Operation for Waterflood Treating Plants**. All Days. **Anais...SPE**, 3 out. 1976.

CARMO, A. J. Influência do fago vB\_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP. p. 67, 2019.

CARSON, J.; WILSON, T. Yersiniosis in Fish. **Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure**, p. 1–19, jan. 2009.

CARVALHO, A. et al. Determination of dissolved oxygen in water by the Winkler method: Performance modelling and optimisation for environmental analysis. **Microchemical Journal**, v. 165, p. 106129, jun. 2021.

CAZARES, D. et al. A Novel Group of Promiscuous Podophages Infecting Diverse Gammaproteobacteria from River Communities Exhibits Dynamic Intergenous Host Adaptation. **mSystems**, v. 6, n. 1, 2021.

CHATTERJEE, A.; DUERKOP, B. A. Sugar and Fatty Acids Accelerate Prophage Induction. **Cell Host and Microbe**, v. 25, p. 175–176, 2019.

CHATURVEDI, S. et al. A Review on Properties and Applications of Xanthan Gum. Em: **Microbial Polymers**. Singapore: Springer Singapore, p. 87–107, 2021.

CHAVES, I. A.; MELCHERS, R. E. Pitting corrosion in pipeline steel weld zones. **Corrosion Science**, v. 53, n. 12, p. 4026–4032, 2011.

CHHIBBER, S.; KAUR, T.; KAUR, S. Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from Diabetic Foot Infections. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–11, 2013.

CHIEN, S. H. et al. Pilot-scale cooling tower to evaluate corrosion, scaling, and biofouling control strategies for cooling system makeup water. **Review of Scientific Instruments**, v. 83, n. 2, p. 024101, fev. 2012.

CHRYSALIDIS, A.; KYZAS, G. Z. Applied cleaning methods of oil residues from industrial tanks. **Processes**, v. 8, n. 5, p. 1–28, 2020.

CLARK, C. E.; VEIL, J. A. **Produced water volumes and management practices in the United States**. Argonne, IL (United States), 2009.

COCHRAN, W. G. Estimation of Bacterial Densities by Means of the “Most Probable Number”. **Biometrics**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 1950.

CONAMA. **Resolução número 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)**. Ministério do Meio Ambiente. Brasil, 17 mar. 2005.

CONAMA. **Resolução número 393 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA)**. Ministério do Meio Ambiente. Brasil, 8 ago. 2007.

CONAMA. **Resolução número 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)**. Ministério do Meio Ambiente. Brasil, 13 maio 2011.

COQUET, L. et al. Adhesion of Yersinia ruckeri to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 26, n. 4, p. 373–378, dez. 2002.

COTE, C. et al. Corrosion of low carbon steel by microorganisms from the 'pigging' operation debris in water injection pipelines. **Bioelectrochemistry**, v. 97, p. 97–109, jun. 2014.

CRADDOCK, H. A. Chapter 4 - Phosphorus Chemistry. Em: **Oilfield Chemistry and Its Environmental Impact**. John Wiley and Sons Ltd, p. 211–231, 2018.

CRISPIM, J. S. et al. Screening and characterization of prophages in *Desulfovibrio* genomes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

CRISPIM, J. S. et al. *Desulfovibrio alaskensis* prophages and their possible involvement in the horizontal transfer of genes by outer membrane vesicles. **Gene**, v. 703, n. April, p. 50–57, 2019.

DALL'AGNOLL, L. T.; MOURA, J. J. G. Sulfate-Reducing Bacteria and Biocorrosion. Em: **Understanding Biocorrosion – Fundamentals and Applications**. European Federation of Corrosion by Woodhead Publishing Limited, p. 57–70, 2010.

DANTAS, E. **Determinação das taxas de corrosão - tratamento de águas de refrigeração e caldeiras**. [s.l.] Editora José Olympio, ECOLAB, 1988.

DAVIDSON, E.; STEWART, S. **Open Hole Completions Drilling Fluid Selection**. SPEA/IADC 39284. **Anais**.1997.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–122, 2003.

DAVIS, J. B.; UPDEGRAFF, D. M. Microbiology in the petroleum industry. **Bacteriological reviews**, v. 18, n. 4, p. 215–238, 1954.

DAVIS, R. A.; MCELHINEY, J. E. **The Advancement of Sulfate Removal from Seawater in Offshore Waterflood Operations**. CORROSION 2002 - Paper Number: NACE-02314. **Anais**...Denver, Colorado: 2002.

DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4339–4344, 1994.

DE ZWART, D.; SLOOFF, W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. **Aquatic Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 129–138, set. 1983.

DEC, M.; WERNICKI, A.; URBAN-CHMIEL, R. Efficacy of experimental phage therapies in livestock. **Animal Health Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 69–83, 2020.

DEVRIES, P.; SCOLES, L. R. **H2S Safety Aboard An Offshore Production Facility Handling Crude Oil And Associated Sour Natural Gas**. Southeast Asia Show. **Anais**...Society of Petroleum Engineers, 4 abr. 1984.

DFELX. **Desenvolvimento e Fabricação de Equipamentos para Laboratório**. 2012. Disponível em: <<https://www.dfelx.com.br/>>. Acesso em: 27 de julho de 2020.

DIAS, R. DE S. **CONTROLE DE BIOFILMES EM MEMBRANAS DE OSMOSE INVERSA ATRAVÉS DE BACTERIÓFAGOS**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Brasil, 2014.

DIAS, R. S. et al. Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 8, p. 3930–3939, 2013.

DIAS, R. S.; DE PAULA, S. O.; SOUSA, M. P. DE. **PROCESSO DE PREPARO DE COMPOSIÇÕES DE BACTERIÓFAGOS, COMPOSIÇÕES DE BACTERIÓFAGOS E USO**. Depósito de patente. BR 10 2020 023886-8. 2020.

DICKSON, A. G. The measurement of sea water pH. **Marine Chemistry**, v. 44, n. 2–4, p. 131–142, dez. 1993.

DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 125–138, 2020.

DONLAN, R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 66–72, 2009.

DOW MICROBIAL CONTROL. **Selection Guide for Microbial Control Actives in Oil and Gas Operations**. 2013.

DOWNWARD, B. L.; TALBOT, R. E.; HAACK, T. K. **Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium Sulfate (Thps) A New Industrial Biocide With Low Environmental Toxicity**. Corrosion97 - Paper Number: NACE-97401. **Anais...New Orleans, Louisiana: 1997. Disponível em:** <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR97/All-CORR97/NACE-97401/113535>>

DRULIS-KAWA, Z. et al. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 699–722, 2013.

DUARTE, J. et al. New insights on phage efficacy to control *Aeromonas salmonicida* in aquaculture systems: An in vitro preliminary study. **Aquaculture**, v. 495, n. January, p. 970–982, 2018.

DURDEVIC, P.; RAJU, C. S.; YANG, Z. Potential for Real-Time Monitoring and Control of Dissolved Oxygen in the Injection Water Treatment Process. **IFAC-PapersOnLine**, v. 51, n. 8, p. 170–177, 2018.

DWIVEDI, S. K.; VISHWAKARMA, M. Hydrogen embrittlement in different materials: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 46, p. 21603–21616, 2018.

DY, R. L.; RIGANO, L. A.; FINERAN, P. C. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 6, p. 1605–1613, 2018.

ECHA. **Sulfuric Acid**. 2021. Disponível em: <<https://www.echa.europa.eu/web/guest/substance-information/-/substanceinfo/100.028.763>>. Acesso em: 06 de novembro de 2021.

ECKERT, R. A.; CARRICK, H. J. Evidence for consumer regulation of biofilm-nutrient interactions among hardwater streams (Pennsylvania, USA). **Hydrobiologia**, v. 722, n. 1, p. 183–198, 2014.

ECKERT, R. B. Emphasis on biofilms can improve mitigation of microbiologically influenced corrosion in oil and gas industry. **Corrosion Engineering, Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 163–168, 16 maio 2015.

ECKERT, R. B.; SKOVHUS, T. L. Advances in the application of molecular microbiological methods in the oil and gas industry and links to microbiologically influenced corrosion. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 169–176, 2018a.

ECKERT, R. B.; SKOVHUS, T. L. Advances in the application of molecular microbiological methods in the oil and gas industry and links to microbiologically influenced corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 169–176, jan. 2018b.

ELBREKI, M. et al. Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. **Journal of Viruses**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

ELIAVA. **Intesti Bacteriophage**. 1923. Disponível em: <<https://phage.ge/products/?lang=en>>. Acesso em: 27 de julho de 2021.

ELLWOOD, D. C. et al. Surface-associated growth. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 297, n. 1088, p. 517–532, 1982.

EL-SHIBINY, A.; EL-SAHHAR, S.; ADEL, M. Phage applications for improving food safety and infection control in Egypt. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 2, p. 556–567, 2017.

ENESENS. **NR15 – Atividades e Operações Insalubres**. 2015. Disponível em: <<https://www.enesens.com.br/nr15-atividades-e-operacoes-insalubres/>>. Acesso em: 12 de maio de 2019.

ENNING, D. et al. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1772–1787, 2012.

ENNING, D.; GARRELF, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014.

EYDAL, H. S. C. et al. Bacteriophage lytic to *Desulfovibrio aespoensis* isolated from deep groundwater. **ISME Journal**, v. 3, n. 10, p. 1139–1147, 2009.

FAKHRU'L-RAZI, A. et al. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2–3, p. 530–551, 30 out. 2009a.

FAKHRU'L-RAZI, A. et al. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2–3, p. 530–551, 30 out. 2009b.

FALKIEWICZ-DULIK, M.; JANDA, K.; WYPYCH, G. **Handbook of Material Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization**. 2nd. ed. Toronto, Canadá: ChemTec Publishing, 2015.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. **Science**, v. 320, p. 1034–1039, 2008.

FEBVRE, H. P. et al. PHAGE study: Effects of supplemental bacteriophage intake on inflammation and gut microbiota in healthy adults. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2019.

FEINER, R. et al. A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 641–650, 2015.

FENCHEL, T. Bacterial Ecology. In: **eLS. John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido.**, 2011.

FENCHEL, T. Microorganisms (Microbes), Role of. **Reference Module in Life Sciences**, n. February 2016, p. 1–11, 2016.

FERREIRA, J. A. et al. Bioreactor for Accurately Assessing Biocide Effectiveness in Controlling Biogenic Souring in Mature Oil Wells. **SPE Journal**, v. 23, n. 05, p. 1809–1816, 17 out. 2018.

FIKE, D. A.; BRADLEY, A. S.; ROSE, C. V. Rethinking the ancient sulfur cycle. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 43, n. April, p. 593–622, 2015.

FINŠGAR, M.; JACKSON, J. Application of corrosion inhibitors for steels in acidic media for the oil and gas industry: A review. **Corrosion Science**, v. 86, p. 17–41, 2014.

FIRLIEYANTI, A. S.; CONNERTON, P. L.; CONNERTON, I. F. Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 121–127, 2016.

FLEMMING, H. C. Microbial Biofouling: Unsolved Problems, Insufficient Approaches, and Possible Solutions. **Biofilm Highlights, Springer Series on Biofilms**, v. 5, p. 81–109, 2011.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H. C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247–260, 2019.

FLEMMING, H.-C. Reverse osmosis membrane biofouling. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 14, n. 4, p. 382–391, maio 1997.

FLEMMING, H.-C. Why Microorganisms Live in Biofilms and the Problem of Biofouling. **Springer Series on Biofilms**, p. 1–10, 2008.

FRAISE, A. P. Biocide abuse and antimicrobial resistance - A cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 11–12, 2002.

FREEMAN, H. B. **MICROBIAL CONTAMINATION OF DRILLING FLUIDS AND ITS IMPLICATIONS ON DRILLING**. 34th Annual Technical Meeting of the Petroleum Society of CIM. **Anais**. 1983. Disponível em: <<http://onepetro.org/PETSOCATM/proceedings-pdf/83ATM/All-83ATM/PETSOC-83-34-22/2033157/petsoc-83-34-22.pdf/1>>

FU, W. et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 397–404, 2010.

GABARDO, I. T. et al. Evaluation of Produced Water from Brazilian Offshore Platforms. Em: **Produced Water**. New York, NY: Springer New York, p. 89–113, 2011.

GANEGAMA ARACHCHI, G. J. et al. Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 1105–1116, 2013.

GAO, P. et al. Bacterial and Archaeal Community Distribution in Oilfield Water Re-injection Facilities and the Influences from Microorganisms in Injected Water. **Microbial Ecology**, 29 nov. 2021.

GARCIA, D. C. S. et al. **Estudo da correlação entre corrosão sob tensão e permeação de hidrogênio em aço de baixa liga utilizando técnicas eletroquímicas para verificação da influência do meio H<sub>2</sub>S no aço utilizado**. INTERCORR 2012. **Anais...** Salvador- BA: ABRACO, 2012.

GARCIA-ORDIALES, E. et al. Assessment of the toxicity toward *Vibrio fischeri* in sediments of a mining impacted estuary in the north of Spain. **Science of The Total Environment**, v. 660, p. 826–833, abr. 2019.

GARUD, R. M. et al. A Short Review on Process and Applications of Reverse Osmosis. **Universal Journal of Environmental Research and Technology**, v. 1, n. 3, p. 233–238, 2011.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 1–10, 1999.

GHIRARDINI, A. V. et al. Microtox® solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 3, p. 851–861, mar. 2009.

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

GOGOI, B. K.; BEZBARUAH, R. L. Microbial degradation of sulfur compounds present in coal and petroleum. **Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection**, p. 427–456, 2002.

GOLDMAN, G.; STAROSVETSKY, J.; ARMON, R. Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages. **Journal of Membrane Science**, v. 342, n. 1–2, p. 145–152, 2009.

GOODRIDGE, L. D.; BISHA, B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. **Bacteriophage**, v. 1, n. 3, p. 130–137, 2011.

GOODRIDGE, L.; ABERDON, S. T. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. **Feature Article**, v. 53, n. 6, p. 254–262, 2003.

GORDILLO ALTAMIRANO, F. L.; BARR, J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 2019.

GOULD, S. J. The Origin of Life on the Earth. **Scientific American**, v. 271, n. 4, p. 84–91, 1994.

GREGG, M.; RAMACHANDRAN, S. **Review of Corrosion Inhibitor Developments and Testing for Offshore Oil and Gas Production Systems**. CORROSION 2004 - Paper Number: NACE-04422. **Anais**. 2004. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR04/All-CORR04/NACE-04422/115798>>

GREIN, F. et al. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 145–160, 2013.

GROBE, K. J.; ZAHLLER, J.; STEWART, P. S. Role of dose concentration in biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 10–15, 2002.

GROVE, T.; STAMOPOULOS, S. **Practical Application of Sustainability Criteria to Floating Production, Storage and Offloading Systems - Today and Tomorrow**. Day 3 Wed, May 04, 2022. **Anais...OTC**, 25 abr. 2022.

GU, J. D.; MITCHELL, R. Biodeterioration. Em: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 309–341, 2013.

GU, T. New understandings of biocorrosion mechanisms and their classifications. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 4, n. 4, 2012.

GUERRERO, R.; BERLANGA, M. Life's unity and flexibility: The ecological link. **International Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 225–235, 2006.

GULE, N. P.; BEGUM, N. M.; KLUMPERMAN, B. Advances in biofouling mitigation: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 535–555, 18 mar. 2016.

GUTIÉRREZ, D. et al. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–15, 2016.

HAMBLY, E.; SUTTLE, C. A. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 444–450, 2005.

HAMED, S. B.; BELHADRI, M. Rheological properties of biopolymers drilling fluids. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 67, n. 3–4, p. 84–90, ago. 2009.

HAMILTON, W. A. Sulphate-Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion. **Corrosion**, p. 195–217, 1985.

HASHEMI, S. J. et al. Bibliometric analysis of microbiologically influenced corrosion (MIC) of oil and gas engineering systems. **Corrosion**, v. 74, n. 4, p. 468–486, 2018.

HEAD, I. M.; GRAY, N. D.; LARTER, S. R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–23, 2014.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 344–352, 2003.

HEFTOS. **P-37**. 2021. Disponível em: <<https://www.heftos.com.br/atuacao.html>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2021.

HERZBERG, M.; ELIMELECH, M. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. **Journal of Membrane Science**, v. 295, n. 1–2, p. 11–20, maio 2007.

HERZBERG, M.; KANG, S.; ELIMELECH, M. Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Biofouling of Reverse Osmosis Membranes. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 12, p. 4393–4398, 15 jun. 2009.

HIDALGO, K. J. et al. Genome-Resolved Meta-Analysis of the Microbiome in Oil Reservoirs Worldwide. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1812, 26 ago. 2021.

HINCAPIE-LADINO, D.; FALLEIROS, N. A. HYDROGEN INDUCED CRACKING IN MICROALLOYED STEELS MICROLIGADOS. **Tecnologia em Metalurgia Materiais e Mineração**, v. 12, n. 1, p. 82–93, 2015.

HOLMFELDT, K. et al. Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their *Flavobacterium* hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6730–6739, 2007.

HUG, L. A. et al. A new view of the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 1–6, 2016.

HUGHES, K. A.; SUTHERLAND, I. W.; JONES, M. V. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: The role of phage-borne polysaccharide depolymerase. **Microbiology**, v. 144, n. 11, p. 3039–3047, 1998.

HUPSEL, A. L. et al. Combinação de processos com membranas para remoção de sulfato da água do mar para injeção em reservatórios de petróleo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 403–412, mar. 2020.

HYMAN, P. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, 2019.

HYMAN, P.; ABEDON, S. T. Chapter 7 - Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. Em: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 70p. 217–248, 2010.

IGUNNU, E. T.; CHEN, G. Z. Produced water treatment technologies. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 9, n. 3, p. 157–177, set. 2014.

INTRALYTIX. **Bacteriophage Products**. 2022. Disponível em: <<http://www.intralytix.com/index.php?page=prod>>. Acesso em: 29 de setembro de 2022.

IRIARTE, F. B. et al. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1704–1711, 2007.

ISO. **ISO 5813 - Water quality - Determination of dissolved Oxygen - Iodometric method**. 1983.

ITOH, T.; IINO, T. Chapter 9 - Phylogeny and Biological Features of Thermophiles. Em: SATYANARAYANA, T.; LITTLECHILD, J.; KAWARABAYASI, Y. (Eds.). **Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles**. Springer Science+Business Media Dordrecht, p. 249–270, 2013.

ITOH, T.; SUZUKI, K.; NAKASE, T. *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 879–887, 1998.

ITOH, T.; SUZUKI, K.; SANCHEZ, P. C. *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 1157–1163, 1999.

JAVAHERDASHTI, R. **Microbiologically Influenced Corrosion**. London: Springer London, 2008.

JAY, Z. J. et al. The distribution, diversity and function of predominant Thermoproteales in high-temperature environments of Yellowstone National Park. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 4755–4769, 2016.

JELLEN, B. I.; GIOVANNELLI, D.; FALKOWSKI, P. G. The Role of Microbial Electron Transfer in the Coevolution of the Biosphere and Geosphere. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, n. June, p. 45–62, 2016.

JENSEN, M. L. et al. **Improving Risk Based Inspection with Molecular Microbiological Methods**. CORROSION 2013, Paper Number: NACE-2013-2247 . **Anais...**Orlando, Florida: NACE, 2013.

JETTEN; M.S.M.; HORN; S.J.; VAN LOOSDRECHT; M.C.M. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 9, 1997.

JIMÉNEZ, S. et al. State of the art of produced water treatment. **Chemosphere**, v. 192, p. 186–208, fev. 2018.

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

JOŃCZYK-MATYSIAK, E. et al. Phages in Therapy and Prophylaxis of American Foulbrood – Recent Implications From Practical Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. August, p. 1–16, 2020.

JONES, C. et al. **Thps: A Review Of The First 25 Years, Lessons Learned, Value Created And Visions For The Future**. CORROSION 2012 - Paper Number: NACE-2012-1505. **Anais...** Salt Lake City, Utah, USA: 2012. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR12/All-CORR12/NACE-2012-1505/120169>>

JONES, C. R. et al. **Keeping Pace with the Need for Advanced, High Performance Biocide Formulations of Oil Production Applications**. CORROSION 2006 - Paper Number: NACE-06663. **Anais**. San Diego, California, USA: 2006.

JONES, C. R. et al. **Thps: A Holistic Approach To Treating Sour Systems**. CORROSION 2008 - Paper Number: NACE-08659. **Anais**. New Orleans, Louisiana: 2008. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR08/All-CORR08/NACE-08659/119148>>

JURY, C. et al. Buffer Capacity, Ecosystem Feedbacks, and Seawater Chemistry under Global Change. **Water**, v. 5, n. 3, p. 1303–1325, 6 set. 2013.

KAHRILAS, G. A. et al. Biocides in hydraulic fracturing fluids: A critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 16–32, 2015.

KAKOOEI, S.; ISMAIL, M. C.; ARIWAHJOEDI, B. Mechanisms of microbiologically influenced corrosion: A review. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 4, p. 524–531, 2012.

KALATZIS, P. G. et al. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages,  $\phi$ st2 and  $\phi$ grn1; Phage therapy application for biological control of vibrio alginolyticus in aquaculture live feeds. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.

KARAGULER, T.; KAHRAMAN, H.; TUTER, M. Analyzing effects of ELF electromagnetic fields on removing bacterial biofilm. **Biocybernetics and Biomedical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 336–340, 2017.

KATO, S. Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 141–148, 2016.

KAWAHARA, J. et al. CHEMICAL CROSS- LINKING BY GLUTARALDEHYDE BETWEEN AMINO GROUPS ITS MECHANISM AND EFFECTS. Em: SWIFT, G.; CARRAHER, C. E.; BOWMAN, C. N. (Eds.). **Polymer Modification**. [s.l.] Springer Science+Business Media, p. 119–131, 1997.

KEASLER, V. et al. **Biocides overview and applications in petroleum microbiology**. Elsevier Ltd, 2017.

KEEN, E. C. Phage therapy: Concept to cure. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUL, p. 1–3, 2012.

KELLAND, M. A. **Production Chemicals for the Oil and Gas Industry**. 2nd. ed. [s.l.] CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014.

KELLY, D. et al. Development of a broad-host-range phage cocktail for biocontro. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 1, p. 31–37, 2011.

KESSLER, D. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 6, p. 825–840, 2006.

KIM, J. **Phage as a Therapeutic Agent**. 2015. Disponível em: <<https://thryve.medium.com/phage-as-a-therapeutic-agent-ed4c466302e5>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2019.

KNECHT, L. E.; VELJKOVIC, M.; FIESELER, L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–16, 2020.

KRAMER, J. F.; O'BRIEN, F.; STRBA, S. F. **A New High Performance Quaternary Phosphonium Biocide For Microbiological Control In Oilfield Water Systems**. CORROSION 2008 - Paper Number: NACE-08660. **Anais...**New Orleans, Louisiana: 2008.

KRISCH, H. M.; PRERE, M.-F.; TETART, F. **PROCESS OF PRODUCTION OF BACTERIOPHAGE COMPOSITIONS AND METHODS IN PHAGE THERAPY FIELD**. Patent No .: **US 8,178,087 B2**. USA, 2012.

KRYACHKO, Y.; HEMMINGSEN, S. M. The Role of Localized Acidity Generation in Microbially Influenced Corrosion. **Current Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 870–876, 2017.

KUCERA, J. **Reverse Osmosis - Industrial Processes and Applications**. 2nd. ed. Salen, Massachusetts, USA: Scrivener Publishing LLC, 2015.

KUTTER, E. Chapter 14 - Phage host range and efficiency of plating. **Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolatins, Characterization, and Interactions**, v. 501, p. 141–149, 2009.

KUTTER, E. et al. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 69–86, 2010.

LAANTO, E. et al. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–9, 2015.

LABP. **Ensaio de biodegradabilidade em água do mar**. Procedimento de ensaio laboratorial. Laboratório de Processos (LABP), CENPES/PETROBRAS. Rio de Janeiro, 2022.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317–327, 2010.

LACERDA, J. A. S. et al. **DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE FLUIDO COM BAIXA ECOTOXICIDADE PARA TESTE HIDROSTÁTICO E HIBERNAÇÃO DE DUTOS OFFSHORE**. CENPES/PETROBRAS - Relatório Técnico - RT PDDES/BIO 006/2011, PT-105.01.10170 - ECORISCO - MTFD - Minimização da Toxicidade de Fluidos para Dutos, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2011.

LAHME, S. et al. Severe Corrosion of Carbon Steel in Oil Field Produced Water Can Be Linked to Methanogenic Archaea Containing a Special Type of [NiFe] Hydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 1–17, 2021.

LANQUETIN, B. **Experience Gained From Floating-Units Integrity Management**. Offshore Technology Conference. **Anais...Offshore Technology Conference**, 8 abr. 2006.

LAPUERTA, M.; SÁNCHEZ-VALDEPEÑAS, J.; SUKJIT, E. Effect of ambient humidity and hygroscopy on the lubricity of diesel fuels. **Wear**, v. 309, n. 1–2, p. 200–207, jan. 2014.

LARSEN, J. et al. **Molecular Identification Of Mic Bacteria From Scale And Produced Water: Similarities And Differences**. CORROSION 2008, Paper Number: NACE-08652. **Anais...** New Orleans, Louisiana: NACE, 2008.

LARSEN, J. et al. **Consortia Of Mic Bacteria And Archaea Causing Pitting Corrosion In Top Side Oil Production Facilities**. Paper presented at the CORROSION 2010, San Antonio, Texas, March, 2010.

LEHRER, S. et al. **New Hydrogen Sulfide Scavenger Development for Downhole Mixed Production Applications - Lab and Field Data**. SPE International Symposium on Oilfield Chemistry - Paper Number: SPE-173788-MS. **Anais**. The Woodlands, Texas: 2015. Disponível em: <<https://onepetro.org/SPEOCC/proceedings-abstract/15OCS/2-15OCS/D021S006R005/182691>>

LETCHUMANAN, V. et al. Insights into bacteriophage application in controlling vibrio species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, 2016.

LEUNG, H. W. Aerobic and anaerobic metabolism of glutaraldehyde in a river water-sediment system. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 267–273, 2001a.

LEUNG, H. W. Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 1, p. 26–39, 2001b.

LI, R.; LI, B.; LI, X. An integrated membrane bioreactor system with iron-dosing and side-stream co-fermentation for enhanced nutrient removal and recovery: System performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 248–255, jul. 2018.

LI, X. X. et al. Diversity and composition of sulfate-reducing microbial communities based on genomic DNA and RNA transcription in production water of high temperature and corrosive oil reservoir. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–17, 2017.

LI, Y.; WANG, D.; ZHANG, L. Experimental and theoretical research on a new corrosion inhibitor for effective oil and gas acidification. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26464–26475, 2019.

LIENGEN, T. et al. **Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications**. [s.l.] Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido, 2014.

LIFE EXTENSION. **FLORASSIST G1 whit phage tecnology**. 2021. Disponível em: <<https://www.amazon.com/Life-Extension-FLORASSIST@-Phage-Technology/dp/B071NMN8SW>>. Acesso em: 13 de novembro de 2021.

LIMA, M. A. G. DE A. et al. **Estudo da Biocorrosão em Cupons Metálicos Expostos a Ambiente Marinho**. INTERCORR 2008 - 157. **Anais**. Recife, PE, Brasil, 2008.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. **Microbiologically Influenced Corrosion**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2007.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. Microbiologically influenced corrosion: An update. **International Materials Reviews**, v. 59, n. 7, p. 384–393, 2014.

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. Microbiologically Influenced Corrosion. Em: **Oil and Gas Pipelines: Integrity and Safety Handbook**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, p. 387–398, 2015.

LITTLE, B.; WAGNER, P.; MANSFELD, F. An overview of microbiologically influenced corrosion. **Electrochimica Acta**, v. 37, n. 12, p. 2185–2194, 1992.

LITTLE, J. W. Lysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. **Phages**, p. 37–54, 2014.

LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S. T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111–114, 2011.

LOH, B. et al. Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 5, 12 fev. 2021.

LOMANS, B. P. et al. **Proposal of Improved Biomonitoring Standard for Purpose of Microbiologically Influenced Corrosion Risk Assessment**. Day 1 Mon, May 09, 2016. **Anais...SPE**, 9 maio 2016.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. Em: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTA, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (Eds.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 261–270, 2004.

LOTO, C. A. Microbiological corrosion: mechanism, control and impact—a review. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 92, n. 9–12, p. 4241–4252, 2017.

MADDAH, H.; CHOGLE, A. Biofouling in reverse osmosis: phenomena, monitoring, controlling and remediation. **Applied Water Science**, v. 7, n. 6, p. 2637–2651, 27 out. 2017.

MADSEN, J. S. et al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 183–195, 2012.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA NO BIOMONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, out. 2008.

MALIK, D. J. et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 100–133, nov. 2017.

MALIK, D. J. Bacteriophage Encapsulation Using Spray Drying for Phage Therapy. **Current Issues in Molecular Biology**, p. 303–316, 2021.

MALONE RUBRIGHT, S. L.; PEARCE, L. L.; PETERSON, J. Environmental toxicology of hydrogen sulfide. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 71, p. 1–13, 2017.

MAND, J. et al. The role of acetogens in microbially influenced corrosion of steel. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–1, 2014.

MANIVANNAN, G. **Desinfection and Decontamination - Principles, Applications and Related Issues**. CRC Press, 2008.

MAPA/ANVISA/IBAMA. **Instrução Normativa Conjunta específica para fins de registro de produtos microbiológicos que se caracterizam como produtos técnicos, agrotóxicos e afins, segundo definições estabelecidas no Decreto 4.074, incisos IV e XXXVII. Instrução Normativa Conjunta - MAPA/ANVISA/IBAMA**, 2006.

MARAZIOTI, C.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas Denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. **Water Research**, v. 37, n. 6, p. 1239–1251, mar. 2003.

MARTINEZ, C. M.; ALVAREZ, L. H. Application of redox mediators in bioelectrochemical systems. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 5, p. 1412–1423, 2018.

MATEUS, L. et al. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. **Aquaculture**, v. 424–425, p. 167–173, 2014.

MATIJAŠEVIĆ, LJ. Analysis of Cooling Water Systems in a Petroleum Refinery. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 28, n. 4, p. 451–457, 5 jan. 2015.

MATSUZAKA, E. et al. A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 409–411, 2003.

MAXWELL, S. **Predicting Microbially Influenced Corrosion (MIC) in Seawater Injection Systems**. All Days. **Anais. SPE**, 30 maio 2006.

MAY, P. M. et al. Goodbye to S<sup>2-</sup> in aqueous solution. **Chemical Communications**, v. 54, n. 16, p. 1980–1983, 2018.

MCDONNELL, G. E. **Antisepsis, Disinfection and Sterilization - Types, Action and Resistance**. 2nd. ed. Washington, DC: ASM Press, 2017.

MCELHINEY, J. E.; DAVIS, R. A. **Desulphated Seawater and its Impact on t-SRB Activity: An Alternative Souring Control Methodology**. CORROSION 2002 - Paper Number: NACE-02028. **Anais**. Denver, Colorado: 2002. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR02/All-CORR02/NACE-02028/114091>>

MCGINLEY, H. R. et al. **Glutaraldehyde: An Understanding Of Its Ecotoxicity Profile And Environmental Chemistry**. CORROSION 2009 - Paper Number: NACE-09405. **Anais...**Atlanta, Georgia, USA: 2009.

MCILWAINE, D. B. Oilfield application for biocides. **Directory of Microbicides for the Protection of Materials**, p. 157–175, 2004.

MEADEN, S.; KOSKELLA, B. Exploring the risks of phage application in the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. November, p. 1–8, 2013.

MERCK. **FISPQ - Tryptone Soya Broth. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**, 2015.

MICROBICS CORPORATION. **Microtox Manual - A toxicity testing handbook**. 1992.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking Isabelle. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MILLIPORE. **FISPQ - Tryptone Soya Agar - TSA. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**, 2021.

MILLIPORE. **FISPQ - EXTRATO DE LEVEDURA. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**, 2022.

MINGOTTI, B. S. **Fragilização por hidrogênio em aços de baixa liga destinados ao transporte de óleo e gás**. Guaratinguetá: UNESP - Universidade Estadual Paulista, 2017.

MIRZAEI, M. K.; NILSSON, A. S. Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. 2458–2461, 2007.

MORAIS, J. M. DE. **Petróleo em águas profundas - Uma história tecnológica da PETROBRAS na exploração e produção offshore**. Brasília - DF: IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2013.

MORRIS, B. E. L.; KRAAN, G. M. VAN DER. Chapter 11 - Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry - Application of biocides and chemical treatments to both combat microorganisms and reduce (bio)corrosion. Em: SKOVHUS, T. L.; ENNING, D.; LEE, J. S. (Eds.). **Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry**. Taylor and Francis Group, 2017.

MOUSSA, M. S. et al. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. **Water Research**, v. 40, n. 7, p. 1377–1388, abr. 2006.

MÜLLER, A. L. et al. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases. **ISME Journal**, v. 9, n. 5, p. 1152–1165, 2015.

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

NACE INTERNATIONAL. **SP0775-2018-SG - “Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations”**. 2018. Disponível em: <<https://store.nace.org/sp0775-2013-formerly-rp0775-2>>.

NADELL, C. D.; DRESCHER, K.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 589–600, 2016.

NAGUMO, M. **Fundamentals of hydrogen embrittlement**. Springer Nature, 2016.

NALEPA, C. J.; WILLIAMS, T. M. Chapter 19 - Biocides: Selection and Application. Em: AMJAD, Z. (Ed.). **The Science and Technology of Industrial Water Treatment**. IWA Publishing and CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 381–410, 2010.

NASR-EL-DIN, H. A.; KELKAR, S. K.; SAMUEL, M. **Development and Field Application of a New Hydrogen Sulfide Scavenger for Acidizing Sour-Water Injectors**. International Symposium on Oilfield Chemistry - Paper Number: SPE-106442-MS. **Anais**. Houston, Texas, USA: 2007. Disponível em: <<https://onepetro.org/SPEOCC/proceedings-abstract/07OCS/All-07OCS/SPE-106442-MS/141680>>

NEE, S. More than meets the eye. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 804–805, 2004.

NEE, S. The Neutral Theory of Biodiversity: Do the Numbers Add up? **Functional Ecology**, v. 19, n. 1, p. 173–176, 2005.

NEVIUS, B. A.; BAGWELL, C. E.; BRIGMON, R. L. Characterization of Microbial Communities in TCE-Contaminated Seep Zone Sediments. **Journal of the South Carolina Academy of Science**, v. 2, p. 25–29, 2004.

NGASSAM-TCHAMBA, C. et al. In vitro and in vivo assessment of phage therapy against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 762–770, 2020.

NIOSH. **Sulfuric Acid**. 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0577.html>>. Acesso em: 16 de maio de 2021.

NORD STREAM. **Pre-commissioning Pig (pipeline inspection gauge)**. 2021. Disponível em: <<https://www.nord-stream.com/press-info/images/pre-commissioning-pig-pipeline-inspection-gauge-2718/>>. Acesso em: 23 de junho de 2021.

NR-15. **Norma Regulamentadora 15 - Atividades e Operações Insalubres**. 1978. Disponível em: <<https://www.gov.br/trabalho/pt-br/inspecao/seguranca-e-saude-no-trabalho/normas-regulamentadoras/nr-15.pdf>>.

NUNES, G. C. et al. **PETROBRAS Experience on Water Management for Brown Fields**. Paper presented at OTC - Offshore Technology Conference. OTC 21384. **Anais**. Texas, USA.: OTC, 2 maio 2011.

OECD. **301 - Ready Biodegradability - OECD Guideline for testing of chemicals**. 1992a.

OECD. **306 - Biodegradability in Seawater - OECD Guideline for testing of chemicals**. 1992b.

OECD. **OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development**. 2022. Disponível em: <<https://www.oecd.org/>>. Acesso em: 7 de Agosto de 2022.

OFIR, G.; SOREK, R. Review Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1260–1270, 2018.

OLIVEIRA, C. B. J. F. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - CORROSÃO INFLUENCIADA POR MICRORGANISMOS EM DUTOS HIBERNADOS**. CENPES/PETROBRAS - Relatório Técnico - RT BIO 009/2019, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2019.

OLIVEIRA, C. B. J. F.; SOUSA, M. P.; WALDOW, V. DE A. **CINÉTICA DE PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE H<sub>2</sub>S EM FLUIDO DE COMPLETAÇÃO BASE ÁGUA**. CENPES/PETROBRAS - Comunicação Técnica - CT TMEC 011/2022, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2022.

OLIVEIRA, C. B. J. F.; WALDOW, V. DE A. **Aspectos microbiológicos do teste de reinjeção de água produzida na P-62 (Campo de Roncador, UN-BC)**. CENPES/PETROBRAS - Relatório Técnico - RT PDIDMS/TARH 0013/2021, PT-200.20.00142.01.01: Estudos de Reservatório para Reinjeção de Água Produzida, EV-00727: Quantificação da Perda de Injetividade Cenário Reinjeção, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2021.

OLIVEIRA, C. B. J. F.; WALDOW, V. DE A. **Aspectos microbiológicos do teste de reinjeção de água produzida na P-55 (Campo de Roncador, UN-ES)**. CENPES/PETROBRAS - Relatório Técnico - RT PDIDMS/TARH 0012/2021, PT-200.20.00142.01.01: Estudos de Reservatório para Reinjeção de Água Produzida e EV-00727: Quantificação da Perda de Injetividade Cenário Reinjeção, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2021.

OLIVEIRA, C. B. J. F.; WALDOW, V. DE A.; SOUSA, M. P. **Considerações sobre os aspectos microbiológicos do teste de reinjeção de água produzida na P-54 (Campo de Roncador, UN-BC)**. CENPES/PETROBRAS - Relatório Técnico - RT PDIDMS/TARH 006/2021, PT-200.20.00142.01.01: Estudos de Reservatório para Reinjeção de Água Produzida, EV-00727: Quantificação da Perda de Injetividade Cenário Reinjeção, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2021.

OMNILYTICS INC. **Agriphage - Product Info**. 2022. Disponível em: <<https://www.agriphage.com/product-info/>>. Acesso em: 29 de setembro de 2022.

ORIANI, R. A. Hydrogen embrittlement of Steels. **Annual Review of Materials Science**, v. 8, p. 327–357, 1978.

OSHA. **Hydrogen Sulfide: Health Hazards**. 1970. Disponível em: <<https://www.osha.gov/hydrogen-sulfide>>.

OXOID. **FISPQ - TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR . FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA**, 2013.

PAGGA, U. Testing biodegradability with standardized methods. **Chemosphere**, v. 35, n. 12, p. 2953–2972, dez. 1997.

PANNEKENS, M. et al. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. **New Biotechnology**, v. 49, p. 1–9, mar. 2019.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 88–104, 2013.

PAULUS, W. Part Two - Microbicide data Organisation of microbicide data - Compounds with activated halogen atoms. Em: **Directory of Microbicides for the protection of materials**. Dordrecht, Países Baixos: Springer, p. 681–707, 2004.

PEDENAUD, P.; HURTEVENT, C.; BARAKA-LOKMANE, S. Industrial experience in sea water desulfation. **Society of Petroleum Engineers - SPE International Conference and Exhibition on Oilfield Scale 2012**, n. May, p. 387–394, 2012.

PEDRÓS-ALIÓ, C. Marine microbial diversity: can it be determined? **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 257–263, jun. 2006.

PEDRÓS-ALIÓ, C. The Rare Bacterial Biosphere. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, n. 1, p. 449–466, 15 jan. 2012.

PEEL, J.; HOWARTH, C. R.; RAMSHAW, C. Process Intensification: Hige Seawater Deaeration. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 76, n. 5, p. 585–593, jul. 1998.

PENKALA, J. et al. **A Cost Effective Treatment to Mitigate Biogenic H<sub>2</sub>S on a FPSO**. CORROSION 2004, Paper Number: NACE-04751. **Anais**. New Orleans, Louisiana, USA: NACE, 28 mar. 2004.

PÉREZ, K. F. B. et al. New methodological improvements in the Microtox® solid phase assay. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 105–110, jan. 2012.

PETROBRAS. **O caminho do petróleo**. Youtube, 2016. 1 vídeo (2:07 min). Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=a2ObyRy9dG8>>. Acesso em: 25 de julho de 2021.

PETROBRAS. **Guia de Boas Práticas - Prevenção de eventos de H<sub>2</sub>S na atividade de construção de poços marítimos. POCOS/SM/SMS-SM e POCOS/SPO/SP/FLUI**. Rio de Janeiro, RJ., 24 nov. 2020.

PIETILÄ, M. K. et al. Archaeal viruses and bacteriophages: Comparisons and contrasts. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 334–344, 2014.

PINA, M. et al. The archeoviruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 1035–1054, 2011.

PIPING WORLD. **Pipeline Pigging - Purpose, Pig Types and Procedure**. 2019. Disponível em: <<https://www.piping-world.com/pipeline-pigging-types-procedure>>. Acesso em: 19 de maio de 2019.

PIRNAY, J.-P. et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 7, p. 2173–2179, 14 jul. 2015.

PLUGGE, C. M. et al. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAY, p. 1–8, 2011.

POTTS, D. E.; AHLERT, R. C.; WANG, S. S. A critical review of fouling of reverse osmosis membranes. **Desalination**, v. 36, n. 3, p. 235–264, mar. 1981.

PUBCHEM. **Benzododecinium chloride**. 2021a. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8753#section=Structures>>.

PUBCHEM. **Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate**. 2021b. Disponível em: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrakis\\_hydroxymethyl\\_phosphonium\\_sulfate](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrakis_hydroxymethyl_phosphonium_sulfate)>.

PUBCHEM. **2,2-Dibromo-2-cyanoacetamide**. 2021c. Disponível em: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_2-Dibromo-2-cyanoacetamide#section=2D-Structure](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_2-Dibromo-2-cyanoacetamide#section=2D-Structure)>.

PUBCHEM. **Glutaraldehyde**. 2021d. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3485#section=Structures>>.

QADIR, M. I.; MOBEEN, T.; MASOOD, A. Phage therapy: Progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, p. 1–9, 2018.

QUARTAROLI, L. et al. Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 859–870, 4 jan. 2017a.

QUARTAROLI, L. et al. Nitrification of Petroleum Extraction Produced Water: Salt Concentrations and Nitrifying Activity. **Environmental Engineering Science**, v. 34, n. 4, p. 258–264, abr. 2017b.

RABUS, R. et al. A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 66, p. 55–321, 2015.

RABUS, R.; HANSEN, T. A.; WIDDEL, F. **The prokaryotes: Prokaryotic physiology and biochemistry**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.

RAHUMA, M. N. Corrosion in Oil and Gas Industry: A Perspective on Corrosion Inhibitors. **Journal of Material Science & Engineering**, v. 03, n. 03, p. 4172, 2014.

RAJASEKAR, A. et al. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1175–1188, 2010.

RANA, G. et al. **Development of High Temperature Non-Triazine Based Hydrogen Sulfide Scavenger: Corrosion Mitigation and Impact on the Refinery Operations**. CORROSION 2017 - Paper Number: NACE-2017-9530. **Anais**. 2017. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR17/All-CORR17/NACE-2017-9530/125663>>

RAVENSDALE, M. **Bacteriophages and their use for biological control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* soft rot of calla lily**. Dissertação de Mestrado. University of Guelph/Canada, 2004.

REBELLO, L. R. B.; SIEPMAN, T.; DREXLER, S. Correlations between TDS and electrical conductivity for high-salinity formation brines characteristic of South Atlantic pre-salt basins. **Water SA**, v. 46, n. 4 October, 27 out. 2020.

RIZK, T. et al. **The Effect of Desulphuated Seawater Injection on Microbiological Hydrogen Sulphide Generation and Implication for Corrosion Control**. CORROSION 98 - Paper Number: NACE-98287. **Anais**. San Diego, California: 1998.

ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a Facultatively Anaerobic, Facultatively Autotrophic Sulphur Bacterium. **Microbiology**, v. 129, n. 9, p. 2847–2855, 1 set. 1983.

ROBINSON, D. Oil and gas: Water treatment in oil and gas production – does it matter? **Filtration & Separation**, v. 47, n. 1, p. 14–18, jan. 2010.

ROBINSON, K. et al. **Reservoir Souring in a Field With Sulphate Removal: A Case Study**. All Days. **Anais...SPE**, 19 set. 2010.

ROCHA, M. I. et al. **First Fill Diesel Fuel Development**. 25th SAE BRASIL International Congress and Display. 25 out. 2016.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 794–803, 2003.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777–786, 2015.

SANDERS, P. F.; STURMAN, P. J. Biofouling in the Oil Industry. Em: **Petroleum Microbiology**. Washington, DC, USA: ASM Press, p. 171–198, 2014.

SANTOS, V. V. C. M. et al. **Potencial de aplicação da tecnologia do Ultra-Violeta em fluidos utilizados em teste hidrostático**. INTERCORR, 2012.

SASTRI; V.S. **Corrosion Inhibitors: Principles and Applications**. v. 49, 2002.

SCHMIDT, O. **Wood and tree fungi: Biology, damage, protection, and use**. Berlin: Springer, 2006.

SCHNEIDER, R. et al. Dynamics of organic carbon and of bacterial populations in a conventional pretreatment train of a reverse osmosis unit experiencing severe biofouling. **Journal of Membrane Science**, v. 266, n. 1–2, p. 18–29, 1 dez. 2005.

SHARMA, M. et al. Biocide-mediated corrosion of coiled tubing. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181934, 26 jul. 2017.

SHARMA, M. et al. Effect of selected biocides on microbiologically influenced corrosion caused by *Desulfovibrio ferrophilus* IS5. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

SHARP, R. Bacteriophages: Biology and history. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 7, p. 667–672, 2001.

SHIFFMAN, M. E.; CHARALAMBOUS, B. M. The search for archaeal pathogens. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 45–51, 2012.

SIGMA-ALDRICH. **FISPQ - EXTRATO DE LEVEDURA. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**, 2015.

SILVA;, C. A. M. DA et al. **GERENCIAMENTO DA CORROSÃO INTERNA DOS DUTOS DA TRANSPETRO**. INTERCORR 2008. **Anais**. Recife/PE: ABRACO, 2008a. Disponível em: <[https://abraco.org.br/src/uploads/intercorr/2008/INTERCORR2008\\_013.pdf](https://abraco.org.br/src/uploads/intercorr/2008/INTERCORR2008_013.pdf)>

SILVA;, C. A. M. DA et al. **INTERNAL CORROSION REMOTE MONITORING ON PIPELINES**. INTERCORR 2008. **Anais**. Recife/PE: ABRACO, 2008b. Disponível em: <[https://abraco.org.br/src/uploads/intercorr/2008/INTERCORR2008\\_112.pdf](https://abraco.org.br/src/uploads/intercorr/2008/INTERCORR2008_112.pdf)>

SILVA, J. D. DA. **CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BACTERÍÓFAGO LÍTICO vB\_EcoM\_UFV09**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa - UFV, MG, Brasil, 2019.

SILVA, L. C. F. et al. Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 130, p. 1–7, maio 2018.

SILVA, L. C. F. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, p. 109294, out. 2019.

SINGH, D. D. N.; KUMAR, A. A Fresh Look at ASTM G 1-90 Solution Recommended for Cleaning of Corrosion Products Formed on Iron and Steels. **CORROSION**, v. 59, n. 11, p. 1029–1036, nov. 2003.

SINGH, M.; SRIVASTAVA, R. K. Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 3–13, jan. 2011.

SINGLA, A.; SANKAR, K. M.; SINGH, Y. Ecotoxicology: Methods and Risks. Em: **Handbook of Nanomaterials and Nanocomposites for Energy and Environmental Applications**. Cham: Springer International Publishing, p. 1–19, 2020.

SIRILATTHAPORN, P. et al. **Export Pipeline Material Selection for Extreme Sour Service Application**. Day 1 Wed, March 01, 2023. **Anais**. IPTC, 28 fev. 2023.

SKOVHUS, T. L.; ECKERT, R. B. **Practical Aspects of MIC Detection, Monitoring and Management in the Oil and Gas Industry**. CORROSION 2014, Paper Number: NACE-2014-3920 . **Anais**...San Antonio, Texas, USA.: NACE, 2014.

SKOVHUS, T. L.; ENNING, D.; LEE, J. S. **Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry**. 1st. ed. 2017.

SKURNIK, M.; PAJUNEN, M.; KILJUNEN, S. Biotechnological challenges of phage therapy. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 7, p. 995–1003, 2007.

SMART, J. S. **Black Powder Movement In Gas Pipelines**. CORROSION 2011, Paper Number: NACE-11089. **Anais**. Houston, Texas, USA: 2011. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR11/All-CORR11/NACE-11089/120532>>

SOOKNAH, R.; PAPAIVINASA, S.; REVIE, R. W. **Modelling The Occurrence Of Microbiologically Influenced Corrosion**. Paper presented at the CORROSION 2007. Paper Number: NACE-07515. **Anais**...Nashville, Tennessee, USA.: NACE, 11 mar. 2007.

SOOKNAH, R.; PAPAIVINASAM, S.; REVIE, R. W. **Validation Of A Predictive Model For Microbiologically Influenced Corrosion**. Paper presented at the CORROSION 2008. Paper Number: NACE-08503. **Anais**...New Orleans, Louisiana, USA.: NACE, 16 mar. 2008.

SOUSA, M. P. **Reatores biológicos de sistemas de tratamento de água de produção em terminal aquaviário de petróleo. Arquivo pessoal CENPES/PETROBRAS.** São Sebastião (SP), 12 dez. 2017.

SOUZA, R. S. et al. **MÉTODO PARA REMOVER NITROGÊNIO AMONIACAL DE EFLUENTES HIPERSALINOS ATRAVÉS DE UM CONSÓRCIO CONTENDO MICRORGANISMOS NITRIFICANTES HETEROTRÓFICOS E DESNITRIFICANTES AERÓBIOS RESISTENTES A ALTA SALINIDADE.** BR 10 2022 015797-9. 10 ago. 2022.

SPX COOLING TECHNOLOGIES. **Cooling Tower Fundamentals.** 2nd. ed. Overland Park, Kansas, USA: SPX Cooling Technologies, Inc, 2009.

STAROSVETSKY, D. et al. Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, n. 2, p. 79–87, 2001.

STETTER, K. O. et al. Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: Evidence for a novel branch of archaeobacteria. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 822–824, 1987.

STEWART, P. S.; GRAB, L.; DIEMER, J. A. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilmsystem. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 495–500, 1998.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, 2001.

SUMMER, E. J. et al. **Phage of Sulfate Reducing Bacteria Isolated From High Saline Environment.** CORROSION 2011 - Paper Number: NACE-11222. **Anais...**Houston, Texas, USA: 2011.

SUTHERLAND, I. W. et al. The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 1, p. 1–6, 2004.

TECHNOBRAS. **P-47.** 2021. Disponível em: <fonte: <https://technobras.com/projects/projeto-para-plataforma-p-47/>>. Acesso em: 22 de outubro de 2021.

THIRD, K. A. et al. Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 39, n. 15, p. 3523–3530, set. 2005.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia do Petróleo.** 2a Edição ed. 2001.

THOMPSON, T. G.; BONNAR, R. U. The Buffer Capacity of Sea Water. **INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY**, v. 3, n. 4, p. 393–395, 15 out. 1931.

TIAN, H. et al. Compositions and abundances of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing microorganisms in water-flooded petroleum reservoirs with different temperatures in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–14, 2017.

TOBBACK, E. et al. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 30, n. 5, p. 257–268, maio 2007.

TOMAT, D. et al. Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 3–10, 2013.

TRANSPETRO. **Mapa de localização dos terminais e dutos**. Disponível em: <<https://transpetro.com.br/transpetro-institucional/nossas-atividades/dutos-e-terminais.htm>>. Acesso em: 23 de outubro de 2022.

UCHIYAMA, T. et al. Iron-corroding methanogen isolated from a crude-oil storage tank. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1783–1788, 2010.

USHANOV, L. et al. Application of *Campylobacter jejuni* phages: Challenges and perspectives. **Animals**, v. 10, n. 2, p. 1–21, 2020.

VANCE, I.; THRASHER, D. R. Reservoir Souring: Mechanisms and Prevention. Em: **Petroleum Microbiology**. Washington, DC, USA: ASM Press, p. 123–142, 2014.

VEIGA, A. DE A. **Estudo do Efeito Biocida do Cloro e do Peróxido de Hidrogênio em Sistemas de Resfriamento com Reúso de Efluente como Água de Reposição**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 11 ago. 2010.

VENZLAFF, H. et al. Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. **Corrosion Science**, v. 66, p. 88–96, 2013.

VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. November, p. 1–17, 2019.

VIDELA, H. **Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais**. Edgard Blucher, 2003.

VIDELA, H. A. **Manual of Biocorrosion**. Lewis Publishers, CRC Press, 1996.

VIGNERON, A. et al. Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2545–2554, 2016.

VIGNERON, A.; HEAD, I. M.; TSESMETZIS, N. Damage to offshore production facilities by corrosive microbial biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2525–2533, 2018.

VINHAS, G. M. et al. **Avaliação da Formação de Biofilmes e Biocorrosão em Cupons AISI 304L Imersos em Água Salina**. INTERCORR 2008 - 155. **Anais**. Recife, PE, Brasil: 2008.

VON SPERLING, M. **PRINCÍPIOS DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS**. 4a. ed., 2016.

VONASEK, E. L. et al. Incorporating Phage Therapy into WPI Dip Coatings for Applications on Fresh Whole and Cut Fruit and Vegetable Surfaces. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 7, p. 1871–1879, 2018.

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

VROUWENVELDER, J. S. et al. Quantitative biofouling diagnosis in full scale nanofiltration and reverse osmosis installations. **Water Research**, v. 42, n. 19, p. 4856–4868, dez. 2008.

WALDOW, V. DE A. **MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO E MÉTODOS MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS**. CENPES/PETROBRAS - RT BIO 017/2018, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2018.

WALDOW, V. DE A.; SOUSA, M. P. DE; OLIVEIRA, C. B. J. F. DE. **REVISÃO SOBRE O USO DE BIOCIDAS NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO E GÁS**. CENPES/PETROBRAS - RT BIO 005/2019, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2019.

WALTERS, E. et al. Simultaneous nitrification/denitrification in a biofilm airlift suspension (BAS) reactor with biodegradable carrier material. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4461–4468, out. 2009.

WANG, X. et al. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1513–1520, 2019.

WANG, Y.; JAIN, L. **MIC Assessment Model for Upstream Production and Transport Facilities**. Paper presented at the CORROSION 2016. Paper Number: NACE-2016-7769. **Anais**. Vancouver, British Columbia, Canada: NACE, 6 mar. 2016.

WENTEN, I. G.; KHOIRUDDIN. Reverse osmosis applications: Prospect and challenges. **Desalination**, v. 391, p. 112–125, ago. 2016.

WERNICKI, A.; NOWACZEK, A.; URBAN-CHMIEL, R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 179, 16 dez. 2017.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 456–467, 2013.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 1998.

WIENCEK, M.; CHAPMAN, J. S. **Water Treatment Biocides: How Do They Work and Why Should You Care?** CORROSION 99 - Paper Number: NACE-99308. **Anais**. San Antonio, Texas: 1999. Disponível em: <<https://onepetro.org/NACECORR/proceedings-abstract/CORR99/All-CORR99/NACE-99308/128332>>

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WOODTLI, J.; KIESELBACH, R. Damage due to hydrogen embrittlement and stress corrosion cracking. **Engineering Failure Analysis**, v. 7, n. 6, p. 427–450, 2000.

WRANGHAM, J. B.; SUMMER, E. J. **Planktonic Microbial Population Profiles Do Not Accurately Represent Same Location Sessile Population Profiles**. CORROSION 2013, Paper Number: NACE-2013-2780. **Anais**. Orlando, Florida: NACE, 2013.

WRIGHT, A. et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology**, v. 34, n. 4, p. 349–357, ago. 2009.

WUNCH, K.; STIPANIČEV, M.; FRENZEL, M. **Microbial Bioinformatics in the Oil and Gas Industry**. Boca Raton: CRC Press, 2021.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. A synergistic d-tyrosine and tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate biocide combination for the mitigation of an SRB biofilm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 3067–3074, 2012.

XUE, Y.; VOORDOUW, G. Control of microbial sulfide production with biocides and nitrate in oil reservoir simulating bioreactors. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, 2015.

YE, Y. et al. A critical review on ammonium recovery from wastewater for sustainable wastewater management. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 749–758, nov. 2018.

YEMASHOVA, N. A. et al. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: A review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 315–337, 2007.

YOST, D. G.; TSOURKAS, P.; AMY, P. S. Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood Disease. **Bacteriophage**, v. 6, n. 1, p. e1122698, 2016.

YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S.; MCINERNEY, M. J. **Chapter 6 Microbial Processes in Oil Fields. Culprits, Problems, and Opportunities**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 66, 2009.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos - SP: RIMA, 2008.

ZHAO, K. et al. **Mechanistic Modeling Of Anaerobic Thps Degradation In Seawater Under Various Conditions**. CORROSION 2008 - Paper Number: NACE-08512. **Anais**...New Orleans, Louisiana, USA: 2008.

ZHOU, Y. et al. The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 45, n. 15, p. 4672–4682, out. 2011.

## APÊNDICE A - METODOLOGIAS

## SUMÁRIO

### APÊNDICE A - METODOLOGIAS

A1 . Técnica do Número Mais Provável (NMP) .....	258
A2. Reatores de inóculos microbianos .....	262
A3. Solução salina redutora.....	263
A3.1. Procedimento de preparo da solução salina redutora.....	263
A4. Meio de cultura para BRS-m .....	265
A4.1. Procedimento de preparo do meio Postgate E modificado .....	266
A4.2. Detecção do crescimento de BRS-m .....	268
A5. Solução de tioglicolato de sódio.....	270
A6. Determinação da atividade de BRS .....	271
A7. Meio de cultura para BRS-t.....	273
A7.1. Procedimento de preparo da Solução 1 (solução de elementos-traço) ..	274
A7.2. Procedimento de preparo da Solução 2 (composição básica original) ...	274
A7.3. Procedimento de preparo da Solução 3 (solução de ácidos orgânicos de cadeia curta) .....	275
A7.4. Procedimento de preparo do meio CAPCIS para BRS-t modificado.....	276
A7.5. Detecção do crescimento de BRS-t.....	277
A8. Meio de cultura para BANHT .....	278
A8.1. Procedimento de preparo do meio para BANHT.....	278
A8.2. Detecção do crescimento de BANHT .....	280
A9. Meio de cultura para BPA-a .....	281
A9.1. Procedimento de preparo do meio para BPA-a .....	281
A9.2. Detecção do crescimento de BPA-a .....	283
A10. Solução nutritiva .....	284
A10.1. Procedimento de preparo da solução nutritiva redutora .....	284
A11 . Preparo de cupons metálicos.....	286
A11.1. Jateamento e limpeza.....	286
A11.2. Armazenamento e preservação .....	286
A11.3. Esterilização.....	287
A12. Determinação dos teores de sulfetos dissolvidos por titulação potenciométrica	
288	

A12.1. Preparo de soluções para a titulação potenciométrica .....	290
A12.2. Procedimento de titulação potenciométrica .....	290
A12.3. Padronização do titulante (fatoração) .....	291
A12.4. Titulação da amostra .....	291
A13. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	293
A14. Perfilometria óptica .....	295
A15. Perda de massa e taxas de corrosão .....	297
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	299

## A1. TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

A metodologia de quantificação microbiana conhecida por Técnica do Número Mais Provável (NMP) ou *Most Probable Number* (MPN) é um conceito antigo, desenvolvido inicialmente para interpretar numericamente o crescimento de bactérias fermentativas em tubos múltiplos (MCCRADY, 1915).

Posteriormente foi amplamente adotada, de modo padronizado e aplicada para a quantificação de inúmeros tipos de microrganismos cultivados em meio líquido. Atualmente, ainda é de longe o método mais utilizado para detecção e quantificação de diferentes grupos microbianos pela indústria do petróleo e pela indústria química desenvolvedora e fornecedora de produtos biocidas (BHAGOBATY, 2014), onde é também comumente chamada de “*bug bottles*” (FICHTER et al., 2015).

A técnica do NMP é o método obrigatório em praticamente todas as normas técnicas vigentes da *ASTM (American Society for Testing and Materials) International* e da *NACE (National Association of Corrosion Engineers) International*, para o monitoramento de comunidades microbianas relacionadas à biocorrosão na indústria do petróleo (SKOVHUS; ECKERT; RODRIGUES, 2017; WALDOW, 2018).

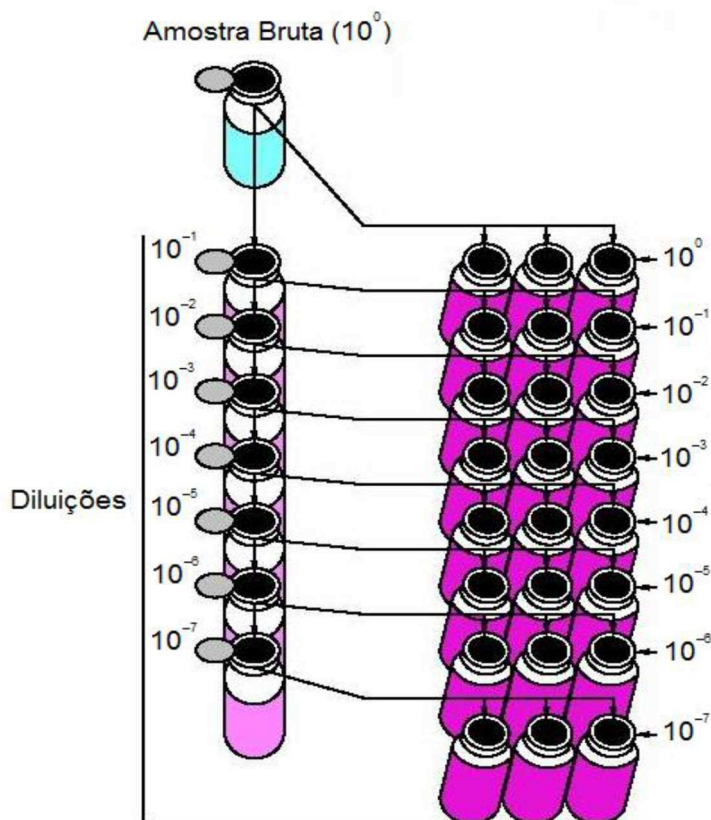
A técnica do NMP tem por objetivo estimar numericamente a densidade de microrganismos em uma amostra líquida, independente de se realizar uma contagem direta, pois diluições da amostra são inoculadas em frascos múltiplos contendo o meio de cultura líquido, os quais são incubados ao longo do tempo e verifica-se visualmente o crescimento dos microrganismos em função de alterações de coloração de indicadores e/ou produção de metabólitos no meio (COCHRAN, 1950; CORNELL; SPECKMAN, 1967; HARRIGAN, 1998; OBLINGER; KOBURGER, 1975).

A estimativa de densidade microbiana pela técnica do NMP **baseia-se no princípio de probabilidade**, fundamentada em dois pressupostos principais: **(i) a distribuição randômica dos microrganismos em uma amostra líquida**, ou seja, um microrganismo possui a mesma probabilidade de estar presente em qualquer volume da amostra, não existindo qualquer tendência ao agrupamento ou à repulsão entre as células; e, **(ii) a capacidade de um único microrganismo exibir crescimento no meio utilizado**, ou seja, se ao menos uma célula viável cultivável para o meio utilizado, estiver presente no volume amostral coletado, ao ser incubado, esse microrganismo será capaz de crescer ao ponto de demonstrar visualmente, em

ao menos uma diluição, seu crescimento pelo princípio do meio de cultura utilizado (COCHRAN, 1950; CORNELL, 2006; GONZÁLEZ, 1996; WOODWARD, 1957).

Portanto, a técnica do NMP é um método dependente de cultivo que se baseia no princípio da diluição seriada até a extinção (OBLINGER; KOBURGER, 1975). A **Figura A1** ilustra esquematicamente o princípio de diluição e inoculação do método conforme as seguintes etapas:

- (i) uma alíquota da amostra, no fator de 1:10, é inoculada em triplicata em frascos contendo o meio de cultura líquido para o tipo de microrganismos em avaliação;
- (ii) outra alíquota da amostra é diluída serialmente, no fator de 1:10, em frascos contendo solução salina adequada ao tipo de microrganismo em avaliação (no caso de microrganismos anaeróbios, utiliza-se uma solução salina redutora, cujo preparo será apresentado com mais detalhes adiante no **item A3**);
- (iii) as diluições são inoculadas em triplicata em frascos contendo o mesmo meio de cultura líquido;
- (iv) esse conjunto de frascos é então incubado na temperatura adequada e pelo período padronizado para o tipo de microrganismo em avaliação;
- (v) o crescimento microbiano em cada frasco é acompanhado e anotado diariamente segundo o princípio de detecção de cada tipo de microrganismo;
- (vi) após o período de incubação a combinação dos resultados de frascos positivos e negativos, são avaliados em comparação à tabela de probabilidade estatística do método (HARRIGAN, 1998; MAN, 1977), a partir da qual, a estimativa de densidade celular é dada na unidade de NMP/ml.



**Figura A1.** Representação esquemática das diluições e inoculações da amostra nos frascos de um kit de quantificação pela técnica do Número Mais Provável (NMP).

Em amostras de sistemas operacionais da indústria do petróleo, as estimativas de NMP/ml geralmente se encontram na faixa de  $\geq 10^0$  até  $\leq 10^7$ . Por esta razão, os kits de quantificação microbiológica são compostos por 7 frascos de diluição e 24 frascos com meio de cultura, conforme ilustrado nas **Figura A2**.



A



B

**Figura A2.** (A) Kit de quantificação microbiológica utilizado no monitoramento de rotina de campo na indústria do petróleo. (B) Distribuição dos frascos no interior do kit.

De modo geral, na maior parte dos problemas associados à presença de microrganismos indesejados na indústria do petróleo, o nível de contaminação microbiana pode ser classificado conforme a **Tabela A1**.

**Tabela A1.** Classificação do nível de contaminação microbiana em função da quantificação microbiológica pela técnica do NMP.

Quantificação microbiana pela técnica do NMP	Nível de contaminação
$\geq 10^6$	Altíssima
$10^5$	Muito Alta
$10^4$	Alta
$10^3$	Média
$10^2$	Baixa
$10^1$	Muito Baixa
$\leq 10^0$	Baixíssima

O processamento das amostras portanto, consiste na inoculação dos kits de quantificação microbiológica pela técnica do NMP. Posteriormente, esses mesmos kits podem ser utilizados para a obtenção de culturas a serem utilizadas como inóculo para estudos e ensaios laboratoriais (conforme será abordado em mais detalhes no **item A2**)

A técnica do NMP, também é utilizada para a quantificação de amostras de resíduos, bem como de biofilmes em superfícies. No caso de resíduos, eles devem ser coletados em frascos cuja massa tenha sido previamente aferida e registrada. Após a coleta, o frasco é pesado novamente, para que a estimativa do NMP possa ser convertida para a massa total de resíduo, ou seja, em NMP/g.

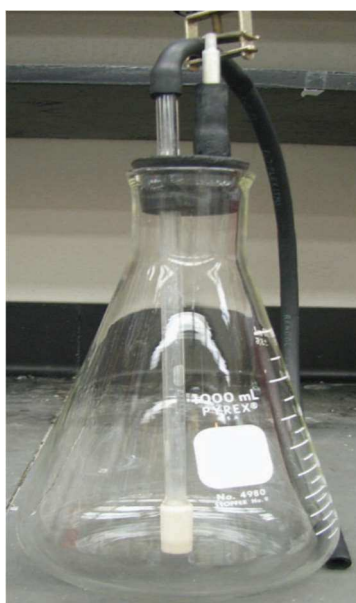
Já no caso de coleta em superfícies de equipamentos e estruturas, a área superficial amostrada deve ser medida e no caso de uma amostra de cupom, deve-se conhecer a área superficial do cupom, de modo que a estimativa do NMP seja convertida para NMP/cm<sup>2</sup>.

Para a quantificação em cupons, eles devem ser coletados em frascos contendo solução salina redutora (normalmente utilizam-se os frascos do tipo antibiótico de 10 ml ou de 50 ml) e em seguida sonicados em ultrassom, em 3 ciclos de 1 min, a 40 Hz e 135 W, para desprendimento do biofilme aderido ao cupom. Então, o fluido contendo os microrganismos é submetido à quantificação por NMP, convertendo-se o valor obtido em ml para a área em cm<sup>2</sup> do cupom.

## A2. REATORES DE INÓCULOS MICROBIANOS

Para a obtenção de culturas microbianas a serem utilizadas como inóculos para estudos e ensaios laboratoriais, pode-se aproveitar os frascos dos kits de quantificação por NMP. Após o período de incubação dos kits das amostras coletadas, todos os frascos que apresentarem crescimento podem ser transferidos para reatores como o da **Figura A3**, contendo o respectivo meio de cultura.

Estes reatores consistem em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 ml ou 1.000 ml contendo uma tampa de vedação com uma entrada e uma saída para realização da purga com gás nitrogênio ( $N_2$ ) no fundo do frasco, diretamente no líquido (STROBEL, 2009). Tais reatores permitem a propagação de maiores volumes de culturas anaeróbicas para a obtenção de inóculo suficiente para ensaios laboratoriais, bem como, permitem manter as culturas ativas, sendo realimentadas e purgadas ao longo do tempo necessário para sua utilização nos experimentos laboratoriais.



**Figura A3.** Reator de propagação de inóculos anaeróbios (STROBEL, 2009).

Essas culturas, em geral, são mantidas em incubação e realimentação constante (mensalmente), sendo utilizadas como inóculos de referência de seus respectivos cenários operacionais para vários estudos com diferentes objetivos, principalmente, na qualificação de novos produtos biocidas comerciais, na avaliação de antimicrobianos em desenvolvimento, bem como na montagem de microcosmos para simulação de sistemas operacionais.

### A3. SOLUÇÃO SALINA REDUTORA

A solução salina redutora conforme descrita no Padrão de Execução do CENPES, PE-2P&D-01620 - PREPARO DE SOLUÇÃO SALINA REDUTORA PARA PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS E UTILIZAÇÃO COMO DILUIÇÃO (CENPES/PETROBRAS, 2017a), é a solução utilizada tanto para realizar a diluição seriada das amostras destinadas à técnica do NMP, quanto para a coleta de resíduos, biofilmes e cupons, quando se pretende fazer a avaliação de microrganismos anaeróbios nessas amostras.

#### A3.1. Procedimento de preparo da solução salina redutora

As etapas de preparo da solução salina redutora (CENPES/PETROBRAS, 2017a) consistem em:

- Adicionar cerca de 500 ml de água em um recipiente com volume útil igual ou superior a 1.000 ml. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de N<sub>2</sub>. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser avaliada;
- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de N<sub>2</sub> de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de N<sub>2</sub> durante todo o tempo de preparo e envase, de modo a garantir um meio anóxico (com O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm);
- Adicionar os componentes da solução apresentados na **Tabela A2** a seguir e aguardar sua completa dissolução homogeneização;

**Tabela A2.** Composição da solução salina redutora (CENPES/PETROBRAS, 2017a).

Componente	Quantidade/L
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido Ascórbico	0,1 g
Resazurina (0,025 %, m/v)	4,0 ml

- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N<sub>2</sub>;

- Completar o volume para 1.000 ml com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,2$  com NaOH 1 N ou HCl 1 N.
- Distribuir a solução em frascos do tipo antibiótico sob purga de N<sub>2</sub> com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 7 frascos de 10 ml, nos quais são adicionados 9 ml da solução;
- Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
- Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm;

#### A4. MEIO DE CULTURA PARA BRS-M

O meio de cultura utilizado para detecção e quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato Mesófilas (**BRS-m**) é o meio denominado de **meio Postgate E** (POSTGATE, 1984) **modificado**, sendo o meio de cultura tradicionalmente utilizado para a quantificação de BRS-m na indústria do petróleo, descrito a seguir, conforme o Padrão de Execução do CENPES, PE-2P&D-01590-A - PREPARO DE MEIOS DE CULTURA POSTGATE “E” MODIFICADO PARA BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO MESÓFILAS (M-BRS) (CENPES/PETROBRAS, 2017b),

A incubação padrão é realizada na temperatura de **30 ± 2 °C** ou **37 ± 2 °C** por um período de **28 dias**. O preparo do meio modificado consiste na: **(i)** utilização de **água do mar sintética ou natural**; **(ii)** substituição do ácido tioglicólico por uma solução de **tioglicolato de sódio**; e **(iii)** adição de **ágar-ágar**.

A água do mar apresenta uma salinidade em torno 3,5 % (35,0 g/L) e deve ser ajustada com cloreto de sódio (NaCl) para a salinidade da própria amostra que se pretende avaliar (aceitando-se uma variação em torno de 2,5 g/L). Para o cálculo da massa de NaCl a ser adicionada, utiliza-se a equação abaixo:

$$m_{\text{NaCl}} = [(S_d - S_a) - 0,03] \times 0,913$$

Onde:  $m_{\text{NaCl}}$  é a massa de NaCl a ser adicionada por litro de meio, em g;

$S_d$  é a salinidade desejada, em g/L;

$S_a$  é a salinidade da água utilizada no procedimento, em g/L.

Nos casos em que a salinidade da amostra é menor que a da água do mar, deve ser utilizada água destilada como base para a preparação e adicionado o NaCl para adequação da salinidade, contudo, para amostras com salinidade abaixo de 0,8% (8,0 g/L) não há a necessidade de adição de NaCl, uma vez que os sais utilizados na composição do meio já conferem essa salinidade mínima.

A substituição do ácido tioglicólico pelo tioglicolato de sódio deve-se ao fato de que em alta temperatura o ácido tioglicólico enegrece o ferro presente no meio, podendo ocasionar falsos positivos na detecção e quantificação de BRS (SANTOS, 2018). O tioglicolato de sódio atua como agente redutor do meio de cultura e juntamente com ácido ascórbico, permite que se alcance um potencial de oxirredução (ORP) abaixo de -100 mV, ideal para o metabolismo das BRS (BHATTACHARYA; UBEROI; DRONAMRAJU, 1996; NEVIUS; BAGWELL; BRIGMON, 2004).

O ágar-ágar é adicionado com o objetivo de favorecer a detecção de bactérias que necessitam de uma superfície de adesão para seu crescimento, as quais são características de sistemas susceptíveis a biocorrosão (SURINACH, 1987). Essa pequena quantidade de ágar-ágar também ajuda a manter um potencial de oxirredução baixo, através da estabilização do meio contra correntes de convecção, mantendo por isso, a anoxia nas zonas mais profundas do meio (LABORCLIN, 2019a).

O procedimento de preparo do meio Postgate E modificado, bem como dos demais meios de cultura que serão apresentados adiante, levam em consideração a necessidade de preparo de grandes volumes normalmente requeridos para quaisquer análises de rotina na indústria do petróleo.

Portanto, se tratam de variações dos métodos convencionais de preparo de meios de cultura para anaeróbios estritos (ARANKI; FRETTER, 1972; HUNGATE, 1969; MOORE, 1966), os quais foram adequados de modo a se tornarem viáveis e exequíveis em larga escala laboratorial. Dentre estas adequações estão: (i) a utilização dos frascos do tipo antibiótico com purga do *headspace* ao invés dos tubos do tipo *Hungate* e utilização de câmara de anaerobiose (MILLER; WOLIN, 1974); e (ii) a realização de purga com N<sub>2</sub> diretamente no meio de cultura em preparação, para obtenção da anoxia (FEIO et al., 1998; STROBEL, 2009).

Estas alternativas foram sendo desenvolvidas, testadas para situações reais e aprimoradas ao longo do tempo, visando manter a representatividade necessária para um monitoramento de campo adequado e correlacionado aos problemas operacionais. Além disso, são historicamente aplicadas e se adequam aos mais diversos tipos de amostras da indústria do petróleo, de modo que ainda hoje, são as técnicas mais empregadas por todas as empresas de petróleo e empresas desenvolvedoras e fornecedoras de produtos biocidas e isso, apesar de serem baseadas em cultivo, que possuem limitações de detecção inerentes à própria técnica.

#### **A4.1. Procedimento de preparo do meio Postgate E modificado**

A seguir segue a descrição das etapas do procedimento de preparo do meio Postgate E modificado (CENPE S/PETROBRAS, 2017b):

- Adicionar de 900 ml a 4.500 ml de água em um recipiente com capacidade adequada ao volume de meio que se pretende preparar. Utilizar preferencialmente

um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de gás N<sub>2</sub>. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;

- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de N<sub>2</sub> de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de N<sub>2</sub> durante todo o tempo de preparo e envase, de modo a garantir um meio anóxico (com O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm);
- Adicionar 1,9 g/l de ágar-ágar ao recipiente pré-aquecido sob agitação até sua completa dissolução;
- Adicionar os demais componentes do meio seguindo a sequência apresentada na **Tabela A3**. O lactato de sódio, o sulfato de ferro(II) e a resazurina devem ser adicionados por último para evitar precipitações e eventuais contaminações;

**Tabela A3.** Componentes do meio de cultura Postgate E modificado para quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato Mesófilas (BRS-m).

Componente*	Quantidade/L
Cloreto de Magnésio Hexaidratado – MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,83 g
Cloreto de Amônio – NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Sulfato de Sódio – Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
Cloreto de Cálcio Hexaidratado – CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,0 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Fosfato Monobásico de Potássio – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Ácido Ascórbico – C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	0,1 g
Sulfato de Ferro(II) Heptaidratado – FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Lactato de Sódio 50 % (m/v)	7,0 ml
Resazurina 0,025 % (m/v)	4,0 ml

\*Os componentes são apresentados na tabela em sua ordem de adição durante o preparo.

- Ajustar o pH para 7,6 ± 0,2 com NaOH 1 N ou HCl 1 N;
- Transferir a solução para uma proveta ou balão volumétrico e completar o volume para 1.000 ml com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada com purga de gás N<sub>2</sub>;
- Distribuir o meio em frascos do tipo antibiótico sob purga de N<sub>2</sub> com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 24 frascos de 10 ml, nos quais são adicionados 9 ml do meio e 2 frascos de 50 ml nos

quais são adicionados 45 ml do meio. Apenas os kits de BRS apresentam esses 2 frascos de 50 ml, os quais foram introduzidos para se obter uma análise indireta da atividade das BRS (conforme apresentado com mais detalhes no **item A6**);

- Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
- Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm e então resfriar sob temperatura ambiente. Após a esterilização, parte do ágar-ágar presente no meio continua na forma de flocos, com a cor do meio variando de incolor a levemente rosa. Caso apresente aspecto alaranjado e/ou com pontos de enegrecimento após a autoclavação, o meio deve ser descartado;
- Após o resfriamento dos frascos autoclavados, adicionar a solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v) dentro de câmara de segurança biológica para evitar a contaminação do meio. Para frascos de 10 ml, adicionar 0,1 ml e para os frascos de 50 ml, adicionar 0,5 ml de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio no meio seja de 0,124 g/L;
- Agitar os frascos de forma a deixar os flocos de ágar-ágar em suspensão.

A resazurina é utilizada como um indicador de oxirredução que apresenta coloração fortemente rosa quando oxidado e mantém uma coloração transparente quando é reduzido em completa anaerobiose ou levemente rosa quando em condição anóxica, sendo assim, os meios de cultura normalmente preparados para o monitoramento representativo de condições de campo, costuma apresentar a coloração levemente rosa, que se refere a uma condição de O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm.

Os meios de cultura preparados dessa forma, assim como os respectivos kits de quantificação, podem ser armazenados em temperatura ambiente, e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

#### **A4.2. Detecção do crescimento de BRS-m**

Quanto à avaliação do crescimento microbiano no meio Postgate E modificado, um frasco é considerado positivo quando se torna totalmente negro, ou quando se torna acinzentado com pontos negros. Essa coloração negra se refere a precipitados

de sulfeto de ferro (FeS), resultantes da reação do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) gerado pelas BRS, com o ferro proveniente do sulfato de ferro utilizado no meio.

## A5. SOLUÇÃO DE TIOGLICOLATO DE SÓDIO

A solução de tioglicolato de sódio a 1,24 % (m/v), ou seja, 12,4 g/L (**Tabela A4**), faz parte da composição dos meios de cultura para microrganismos anaeróbicos e deve ser adicionada somente após a autoclavação do meio para evitar precipitação.

Conforme citado anteriormente, o tioglicolato de sódio atua como um agente redutor do meio de cultura para garantir o baixo potencial de oxirredução, requerido pelo metabolismo das BRS e demais microrganismos anaeróbicos.

**Tabela A4.** Composição da solução de tioglicolato de sódio a 1,24 % (m/v).

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Tioglicolato de sódio	1,24 g
Água destilada	100 ml

O preparo da solução, é feito pela dissolução de 1,24 g do tioglicolato de sódio em 100 ml de água destilada, dentro de frascos do tipo antibiótico de 50 ml ou 100 ml, sob purga de gás N<sub>2</sub>. O frasco é lacrado com septo de borracha e selo de alumínio e esterilizado em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm. Após a autoclavação e resfriamento, a solução é transferida para os frascos já esterilizados contendo o restante do meio de cultura com a utilização de uma seringa de 1 ml.

## A6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE BRS

A atividade de BRS é uma medida indireta qualitativa do potencial de geração de H<sub>2</sub>S pela comunidade microbiana de determinada amostra, obtida a partir da avaliação dos frascos qualitativos do kit de quantificação de BRS. Essa análise pressupõe que nem sempre maiores concentrações de células na amostra significam maior produção de H<sub>2</sub>S, assim como, permite detectar qualitativamente a presença de BRS mesmo em amostras cujo resultado de NMP/mL esteja abaixo do limite mínimo de detecção da técnica.

A determinação da atividade de BRS na amostra, consiste na inoculação de dois frascos de 50 ml presentes no kit de quantificação, denominados frascos qualitativos. Esses dois frascos são preparados com o mesmo meio de cultura, seguindo o mesmo procedimento dos demais frascos de 10 ml do kit e são inoculados com 5 ml (10 % v/v) da amostra em processamento.

Esses frascos são acompanhados diariamente quanto ao crescimento microbiano de modo a se determinar, dentro dos 28 dias de incubação, qual foi o dia em que os frascos se tornaram positivos. O valor da atividade corresponde ao tempo total de incubação (28 dias), dividido pelo tempo em que os frascos apresentaram crescimento positivo, conforme o cálculo abaixo:

$$\text{Atividade de BRS} = \frac{28 \text{ (dias)}}{\text{Crescimento positivo (dias)}}$$

A **Tabela A5**, apresenta os valores para classificação da atividade de BRS (em alta, média ou baixa) conforme o cálculo do crescimento observado.

**Tabela A5.** Classificação da atividade de BRS pela análise dos frascos qualitativos do kit de quantificação de BRS-m.

Atividade de BRS	Valor
Alta	> 4,00
Média	1,34 a 4,00
Baixa	≤ 1,33

Deste modo, além da estimativa da densidade celular, é possível analisar comparativamente amostras que apresentam densidades semelhantes, porém atividades de BRS (potencial geração de H<sub>2</sub>S) distintas ou vice-versa. Além disso, em

muitos casos, amostras que não apresentam crescimento no primeiro conjunto de frascos de 10 ml inoculados, podem se tornar positivas nos frascos qualitativos de 50 ml, permitindo detectar a presença das BRS naquela amostra, ainda que a quantificação esteja abaixo do limite de detecção do método.

Dessa forma, o kit de quantificação de BRS-m pela técnica do NMP, além da determinação da densidade, permite uma análise comparativa de amostras quanto ao potencial de geração de  $H_2S$  por aquela comunidade microbiana e, portanto, um melhor diagnóstico do problema em campo.

## A7. MEIO DE CULTURA PARA BRS-T

O meio de cultura utilizado para detecção e quantificação de Bactérias Redutoras de Sulfato Termófilas (**BRS-t**), é conhecido como meio CAPCIS ou meio para BRS-t, pois foi desenvolvido pela empresa CAPCIS Ltd (atual INTERTEK), uma prestadora de serviços para a indústria de óleo e gás sediada no Reino Unido (COCHRANE et al., 1988; EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993).

O **meio CAPCIS ou para BRS-t modificado**, segundo o Padrão de Execução do CENPES, PE-P&D-01581-A - TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO TERMÓFILAS (BRS-t) (CENPES/PETROBRAS, 2018a), tem por objetivo detectar e quantificar, de forma mais representativa, os microrganismos cultiváveis que não são detectados pelo meio Postgate E modificado quando incubado a temperaturas mais altas. A incubação padrão do meio CAPCIS para BRS-t é realizada na temperatura de **55 ± 2 °C** por um período de **28 dias**.

As modificações no meio CAPCIS referem-se à: **(i)** adição de **sulfato de sódio** ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e **sulfito de sódio** ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) na composição original (Solução 2); e **(ii)** adição de uma **solução de ácidos orgânicos de cadeia curta** (Solução 3), em função de estudos realizados pela CAPCIS Ltd em parceria com o CENPES/PETROBRAS, utilizando diversas amostras de campo provenientes de poços produtores de petróleo em reservatórios de águas profundas.

Grande parte dos reservatórios de petróleo de águas profundas, apresentam condições favoráveis ao crescimento das BRS-t (60 a 80 °C) e níveis elevados de geração de  $\text{H}_2\text{S}$  dentro dos próprios reservatórios, nos quais, muitos dos poços, demonstraram melhores correlações dos níveis de  $\text{H}_2\text{S}$  com as quantificações de BRS-t pelo meio CAPCIS modificado ao invés de BRS-m (JURELEVICIUS et al., 2021; SANDERS; MOSLEY; HOLT, 1988; SANTOS, 2018).

O preparo do meio CAPCIS para BRS-t modificado envolve a preparação prévia de três soluções: **(i)** a **Solução 1**, que é uma solução de elementos-traço, a qual pode ser preparada e armazenada antecipadamente, sendo utilizada no preparo da Solução 2, **(ii)** a **Solução 2**, que é a composição básica original do meio e **(iii)** a **Solução 3**, que é uma solução de ácidos orgânicos de cadeia curta. Ambas as soluções 2 e 3 devem ser preparadas apenas no momento da sua utilização para composição do meio final.

### A7.1. Procedimento de preparo da Solução 1 (solução de elementos-traço)

A Solução 1, refere-se à solução de elementos-traço que será utilizada no preparo da Solução 2. Portanto, essa solução pode ser preparada com água destilada e não é necessário a preparação sob purga de gás N<sub>2</sub>, podendo ser preparada previamente e armazenada sob refrigeração. As etapas de preparo da Solução 1 consistem em:

- Adicionar 500 ml de água destilada em um recipiente com capacidade igual ou superior a 1.000 ml;
- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Adicionar os sais na ordem em que são apresentados na **Tabela A6** abaixo e aguardar sua completa dissolução;
- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico;
- Completar o volume para 1.000 ml com água destilada e reservar.

**Tabela A6.** Componentes da Solução 1 (solução de elementos traço) para preparo do meio de cultura CAPCIS para Bactérias Redutoras de Sulfato Termófilas (BRS-t) modificado (EDEN; LAYCOCK; FIELDER, 1993).

Componente	Quantidade
Ácido Bórico – H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,060 g
Cloreto de Magnésio – MgCl <sub>2</sub>	0,100 g
Cloreto de Cobalto – CoCl <sub>2</sub>	0,120 g
Cloreto de Zinco – ZnCl <sub>2</sub>	0,070 g
Cloreto de Níquel – NiCl <sub>2</sub>	0,020 g
Cloreto de Cobre(II) Di-hidratado – CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,015 g
Molibdato de Sódio – Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,025 g
Selenito de Sódio – Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,003 g

### A7.2. Procedimento de preparo da Solução 2 (composição básica original)

A Solução 2, refere-se à composição original do meio CAPCIS incluindo as modificações desenvolvidas (adição de sulfato e sulfito de sódio). As etapas de preparo da Solução 2 consistem em:

- Adicionar 400 ml de água em um recipiente com capacidade igual ou superior a 750 ml. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e

saída para conexão de uma purga de gás N<sub>2</sub>. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;

- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de N<sub>2</sub> de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de N<sub>2</sub> durante todo o tempo de preparo e envase, de modo a garantir um meio anóxico (com O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm);
- Adicionar os componentes na ordem em que são apresentados na **Tabela A7** abaixo e aguardar sua completa dissolução;
- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N<sub>2</sub>;
- Completar o volume para 750 ml com o mesmo tipo de água utilizado, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,2$  com NaOH 1 N ou HCl 1 N e reservar.

**Tabela A7.** Componentes da Solução 2 para preparo do meio de cultura CAPCIS para Bactérias Redutoras de Sulfato Termófilas (BRS-t) modificado (COCHRANE et al., 1988).

Componente	Quantidade
Sulfato de Sódio – Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
Sulfito de Sódio – Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Cloreto de Amônio – NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Cloreto de Cálcio Hexaidratado – CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,1 g
Sulfato de Magnésio Heptaidratado – MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,0 g
Sulfato de Ferro(II) Heptaidratado – FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Solução 1 (solução de elementos-traço)	1,0 ml

### **A7.3. Procedimento de preparo da Solução 3 (solução de ácidos orgânicos de cadeia curta)**

A Solução 3, refere-se à solução de ácidos orgânicos de cadeia curta, adicionada de modo a se obter melhor representatividade e recuperação dos microrganismos cultiváveis de amostras de campo. As etapas de preparo da Solução 3 consistem em:

- Adicionar 100 ml de água em um recipiente com capacidade igual ou superior a 150 ml. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de gás N<sub>2</sub>. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;
- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de N<sub>2</sub> de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de N<sub>2</sub> durante todo o tempo de preparo e envase, de modo a garantir um meio anóxico (com O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm);
- Adicionar os componentes na ordem em que são apresentados **Tabela A8** abaixo e aguardar sua completa dissolução;
- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N<sub>2</sub>;
- Completar o volume para 150 ml com o mesmo tipo de água utilizado, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,2$  com NaOH 1 N ou HCl 1 N e reservar.

**Tabela A8.** Componentes da Solução 3 (solução de ácidos orgânicos de cadeia curta) para preparo do meio de cultura CAPCIS para Bactérias Redutoras de Sulfato Termófilas (BRS-t) modificado (COCHRANE et al., 1988).

Componente	Quantidade
Ácido Ascórbico – C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	1,0 g
Ácido Lático – C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1,5 ml
Ácido Acético – C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,5 ml
Ácido Butanoico – C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,1 ml
Ácido Propanoico – C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	0,1 ml

#### **A7.4. Procedimento de preparo do meio CAPCIS para BRS-t modificado**

A preparação final do meio CAPCIS para BRS-t modificado (CENPE S/PETROBRAS, 2018a) consiste na mistura das Soluções 2 e 3 conforme as seguintes etapas:

- Misturar os 750 ml da Soluções 2 com os 150 ml da Solução 3 em uma proveta ou balão volumétrico com capacidade igual ou superior a 1.000 ml;
- Manter o recipiente sob agitação magnética e com purga de gás N<sub>2</sub>;

- Completar o volume para 1.000 ml com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,2$  com NaOH 1 N ou HCl 1 N;
- Distribuir o meio em frascos do tipo antibiótico sob purga de N<sub>2</sub> com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação, são utilizados 24 frascos de 10 ml, nos quais são adicionados 9 ml do meio;
- Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
- Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm;
- Após a esterilização, deixar resfriar em temperatura ambiente;
- Após o resfriamento, adicionar a solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v) dentro de câmara de segurança biológica, para evitar a contaminação do meio. Para frascos de 10 ml, adicionar 0,1 ml, de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio no meio seja de 0,124 g/L.

Os meios de cultura preparados dessa forma, assim como os respectivos kits de quantificação, podem ser armazenados em temperatura ambiente e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

#### **A7.5. Detecção do crescimento de BRS-t**

Quanto à avaliação do crescimento microbiano no meio CAPCIS para BRS-t modificado, o frasco é considerado positivo quando se torna totalmente negro, ou quando se torna acinzentado e/ou com pontos negros. Essa coloração negra, se refere a precipitados de sulfeto de ferro (FeS), resultantes da reação do H<sub>2</sub>S gerado pelas BRS com o ferro proveniente do sulfato de ferro utilizado no meio.

## A8. MEIO DE CULTURA PARA BANHT

O meio de cultura utilizado para detecção e quantificação de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (**BANHT**) é um meio rico, não definido, que contém fontes de carbono reduzido (HARRIGAN, 1998).

Tal como o meio Postgate E modificado, para melhor representatividade dos sistemas operacionais, o cultivo é realizado em condições anóxicas ( $O_2$  abaixo de 0,1 ppm). A incubação padrão é realizada na temperatura de  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  ou  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período de **28 dias**.

Em relação ao meio tradicional, o preparo do meio pra BANHT para a indústria do petróleo também consiste na: **(i)** utilização de **água do mar sintética ou natural** e **(ii)** substituição do ácido tioglicólico pela solução de **tioglicolato de sódio**, sendo preparado conforme o Padrão de Execução do CENPES, PE-2P&D-01598-A – TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS (BANHT) (CENPES/PETROBRAS, 2018b) descrito a seguir.

### A8.1. Procedimento de preparo do meio para BANHT

As etapas de preparo do meio BANHT (CENPES/PETROBRAS, 2018B) consistem em:

- Adicionar cerca de 500 ml de água em um recipiente com volume útil igual ou superior a 1.000 ml. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de gás  $N_2$ . O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;
- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de  $N_2$  de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de  $N_2$  durante todo o tempo de preparo e envaze, de modo a garantir um meio anóxico (com  $O_2$  abaixo de 0,1 ppm);
- Adicionar os componentes do meio na ordem em que são apresentados **Tabela A9** abaixo e aguardar sua completa dissolução;

**Tabela A9.** Componentes do meio de cultura para quantificação de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT).

<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Glicose	5,0 g
Peptona Universal	4,0 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Resazurina 0,025 % (m/v)	4,0 ml

- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N<sub>2</sub>;
- Completar o volume para 1.000 ml com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,2$  com NaOH 1 N ou HCl 1 N;
- Distribuir o meio em frascos do tipo antibiótico sob purga de N<sub>2</sub> com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 24 frascos de 10 ml, nos quais são adicionados 9 ml do meio;
- Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
- Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm;
- Após a esterilização, deixar resfriar em temperatura ambiente;
- Após o resfriamento, adicionar uma solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v) dentro de câmara de segurança biológica, para evitar a contaminação do meio. Para frascos de 10 ml, adicionar 0,1 ml, de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio no meio seja de 0,124 g/L;
- Após a adição do tioglicolato de sódio, o meio está pronto para uso. O meio apresenta aspecto translúcido e coloração róseo-avermelhada, caso apresente leve coloração alaranjada ou enegrecida, deve ser descartado.

Os meios de cultura preparados dessa forma, assim como os respectivos kits de quantificação, podem ser armazenados em temperatura ambiente e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

## **A8.2. Detecção do crescimento de BANHT**

Quanto à detecção do crescimento microbiano no meio para BANHT, um frasco é considerado positivo quando é possível notar turbidez devido à biomassa microbiana, normalmente observada no fundo do frasco e que se dispersa em forma de espiral quando o frasco é agitado.

## A9. MEIO DE CULTURA PARA BPA-A

O meio de cultivo utilizado para detecção e quantificação de Bactérias Produtoras de Ácidos Anaeróbias (**BPA-a**) é o meio tradicionalmente conhecido como meio **TSI** (*Triple Sugar Iron - Três Açúcares Ferro*), que foi desenvolvido para microrganismos facultativos acidogênicos. O princípio do meio TSI está baseado na fermentação dos carboidratos e na produção de H<sub>2</sub>S.

O meio TSI foi desenvolvido por HAJNA (1945), que adicionou sacarose à formulação do meio *Kligler's Iron Agar* (BD, 2014) com dois açúcares (glicose e lactose). O TSI possui glicose, lactose e sacarose, os quais, quando fermentados pelos microrganismos, liberam ácido. A variação de pH do meio, provocada pela acidificação do meio, é detectada pelo indicador vermelho de fenol, que altera sua coloração de vermelho para amarelo. Em pH neutro ou alcalino, o meio TSI também permite detectar a produção de H<sub>2</sub>S a partir do tiosulfato de sódio, devido à reação do H<sub>2</sub>S produzido com o citrato férrico amoniacal presente no meio (LABORCLIN, 2019b).

O TSI é utilizado para o cultivo de microrganismos acidogênicos facultativos e normalmente sua quantificação é feita por contagem de colônias em placas de Petri. A quantificação de BPA-a, portanto, constitui uma adaptação para a quantificação dos microrganismos acidogênicos anaeróbicos pelo método do NMP, preparado conforme o Padrão de Execução do CENPES, PE-2P&D-01570 - TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDOS (BPA) (CENPES/PETROBRAS, 2017c).

Sendo assim, a composição do meio é mantida, mas o tioglicolato de sódio é introduzido como agente redutor e o procedimento de preparo do meio segue os mesmos princípios dos demais meios anaeróbicos já apresentados, com o cultivo sendo realizado em condições anóxicas (O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm), para melhor representatividade dos sistemas operacionais. A incubação padrão é realizada na temperatura de **30 ± 2 °C** ou **37 ± 2 °C** por um período de **28 dias**.

### A9.1. Procedimento de preparo do meio para BPA-a

As etapas de preparo do meio BPA-a (CENPES/PETROBRAS, 2017c) consistem em:

- Adicionar cerca de 500 ml de água em um recipiente com volume útil igual ou superior a 1.000 ml. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de gás N<sub>2</sub>. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;
- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de N<sub>2</sub> de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de N<sub>2</sub> durante todo o tempo de preparo e envase, de modo a garantir um meio anóxico (com O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm);
- Adicionar os componentes do meio na ordem em que são apresentados **Tabela A10** abaixo e aguardar sua completa dissolução;

**Tabela A10.** Componentes do meio de cultura para quantificação de Bactérias Produtoras de Ácidos Anaeróbias (BPA-a) (CENPES/PETROBRAS, 2017c).

Componente	Quantidade
Sacarose	10,0 g
Lactose	10,0 g
D-(+)-Glicose	1,0 g
Peptona de Caseína	15,0 g
Peptona de Carne	5,0 g
Extrato de Levedura	3,0 g
Citrato de Ferro(III) Amoniacal – C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·(x)Fe·(y)H <sub>3</sub> N	0,5 g
Tiosulfato de Sódio – Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,5 g
Vermelho de Fenol – C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> S	0,024 g

- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N<sub>2</sub>;
- Completar o volume para 1.000 ml com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para 7,8 ± 0,2 com NaOH 1 N ou HCl 1 N;
- Distribuir o meio em frascos do tipo antibiótico sob purga de N<sub>2</sub> com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 24 frascos de 10 ml, nos quais são adicionados 9 ml do meio;
- Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
- Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm;

- Após a esterilização, deixar resfriar em temperatura ambiente;
- Após o resfriamento, adicionar uma solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v) dentro de câmara de segurança biológica, para evitar a contaminação do meio. Para frascos de 10 ml, adicionar 0,1 ml, de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio no meio seja de 0,124 g/L;
- Após a adição do tioglicolato de sódio, o meio está pronto para uso. O meio apresenta aspecto translúcido e coloração róseo-avermelhada, caso apresente leve coloração alaranjada ou enegrecida, deve ser descartado.

Os meios de cultura preparados dessa forma, assim como os respectivos kits de quantificação, podem ser armazenados em temperatura ambiente e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

#### **A9.2. Detecção do crescimento de BPA-a**

Quanto à detecção do crescimento microbológico no meio para BPA-a (CENPES/PETROBRAS, 2021), um frasco é considerado positivo quando a coloração do meio se altera de vermelho para amarelo, devido ao indicador vermelho de fenol, em função da redução do pH do meio, ocasionada pela produção de ácidos pelos microrganismos acidogênicos e é possível notar turbidez devido à biomassa microbiana.

## **A10. SOLUÇÃO NUTRITIVA**

A solução nutritiva normalmente é utilizada em ensaios microbiológicos relacionados ao estudo da biocorrosão e acidulação biogênica com os objetivos de: **(i)** estimular o crescimento microbiano; **(ii)** acelerar a formação de biofilmes; e **(iii)** garantir um aporte mínimo de nutrientes no sistema para a manutenção dos microrganismos presentes, sobretudo em ensaios de longo prazo.

Basicamente, a solução nutritiva corresponde às fontes de carbono presentes nos meios para BRS-m (lactato de sódio) e BANHT (glicose), adicionadas a uma solução salina (na salinidade de interesse), além do extrato de levedura como fonte de nutrientes essenciais diversos.

A solução nutritiva também pode ser preparada como uma solução redutora, basta se adicionar o tioglicolato de sódio e o ácido ascórbico e se adotar os mesmos procedimentos e cuidados durante o preparo de meios anaeróbios e/ou anóxicos.

Portanto, o procedimento abaixo descreve o preparo da solução nutritiva redutora, considerando as etapas adicionais e cuidados mais restritivos necessários, quando comparado ao simples preparo de uma solução nutritiva que não necessita de anaerobiose/anoxia.

### **A10.1. Procedimento de preparo da solução nutritiva redutora**

As etapas de preparo da solução nutritiva redutora consistem em:

- Adicionar cerca de 500 ml de água em um recipiente com volume útil igual ou superior a 1.000 ml;
- Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de gás N<sub>2</sub>;
- O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser utilizada;
- Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
- Conectar uma purga de N<sub>2</sub> de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
- Manter a purga de N<sub>2</sub> durante todo o tempo de preparo e envase, de modo a garantir um meio anóxico (com O<sub>2</sub> abaixo de 0,1 ppm);

- Adicionar os componentes da solução apresentados na **Tabela A11** abaixo e aguardar sua completa dissolução e homogeneização;

**Tabela A11.** Composição da solução nutritiva redutora.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Glicose	0,25 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Lactato de sódio 50 % (m/v)	4,0 ml
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido Ascórbico	0,1 g

- Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo purga de N<sub>2</sub>;
- Completar o volume para 1.000 ml com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N<sub>2</sub>;
- Ajustar o pH para  $7,6 \pm 0,2$  com NaOH 1 N ou HCl 1 N;
- Distribuir a solução em frascos do tipo antibiótico de 50 ml (ou frascos de volume adequado à necessidade do ensaio) sob purga de N<sub>2</sub> com o auxílio de uma bomba peristáltica;
- Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
- Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm.

A solução nutritiva preparada dessa forma, pode ser armazenada em temperatura ambiente e recomenda-se que seja utilizada em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

## A11. PREPARO DE CUPONS METÁLICOS

Os cupons metálicos utilizados como corpos de prova em ensaios laboratoriais relacionados à biocorrosão e geração biogênica de H<sub>2</sub>S, devem ser previamente jateados e esterilizados conforme o Padrão de Execução do CENPES, PE-2P&D-01595 – PROCEDIMENTO DE ESTERILIZAÇÃO DE CORPOS DE PROVA DE AÇO CARBONO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (CENPES/PETROBRAS, 2018c) descrito a seguir:

### A11.1. Jateamento e limpeza

- O jateamento dos cupons deve ser realizado em cabine de jateamento com microesferas de vidro na faixa de 90 a 125 µm;
- Após o jateamento, os cupons devem ser limpos com acetona PA (≥ 99,5%) para remoção de possíveis resíduos e óleos provenientes da manipulação.

**OBS:** No caso de cupons destinados a análises de perda de massa, eles deverão ser numerados (previamente ao jateamento) e pesados em balança analítica individualmente (após o jateamento e limpeza), tendo sua massa aferida anotada e correlacionada com a numeração.

### A11.2. Armazenamento e preservação

- Os cupons jateados e limpos podem ser: **(i)** acondicionados em sacos plásticos herméticos, fechados sob purga de gás N<sub>2</sub> e armazenados em dessecador com sílica gel ou **(ii)** podem ser simplesmente selados a vácuo e armazenados em ambiente livre de umidade e a temperatura ambiente.

**OBS:** os cupons podem ser armazenados por tempo indeterminado e utilizados desde que não sejam observados indícios de oxidação, como alterações de coloração e/ou formação de precipitados, nesse caso, os cupons podem ser reaproveitados desde que decapados (se necessário) e repetidos os procedimentos de jateamento, limpeza e pesagem.

### A11.3. Esterilização

- Previamente ao início dos ensaios (preferencialmente no mesmo dia), os cupons devem ser esterilizados;
- A esterilização consiste na disposição dos cupons sobre lenços de papel (ou papel toalha), dentro da cabine de segurança biológica (previamente limpa e esterilizada), sob luz ultravioleta (UV) e sob fluxo de gás N<sub>2</sub> estéril, por 90 min em cada face do cupom;
- Os cupons metálicos esterilizados, devem ser embrulhados nos lenços de papel e armazenados em dessecador com sílica gel, para mantê-los livre de umidade até a sua utilização nos ensaios.

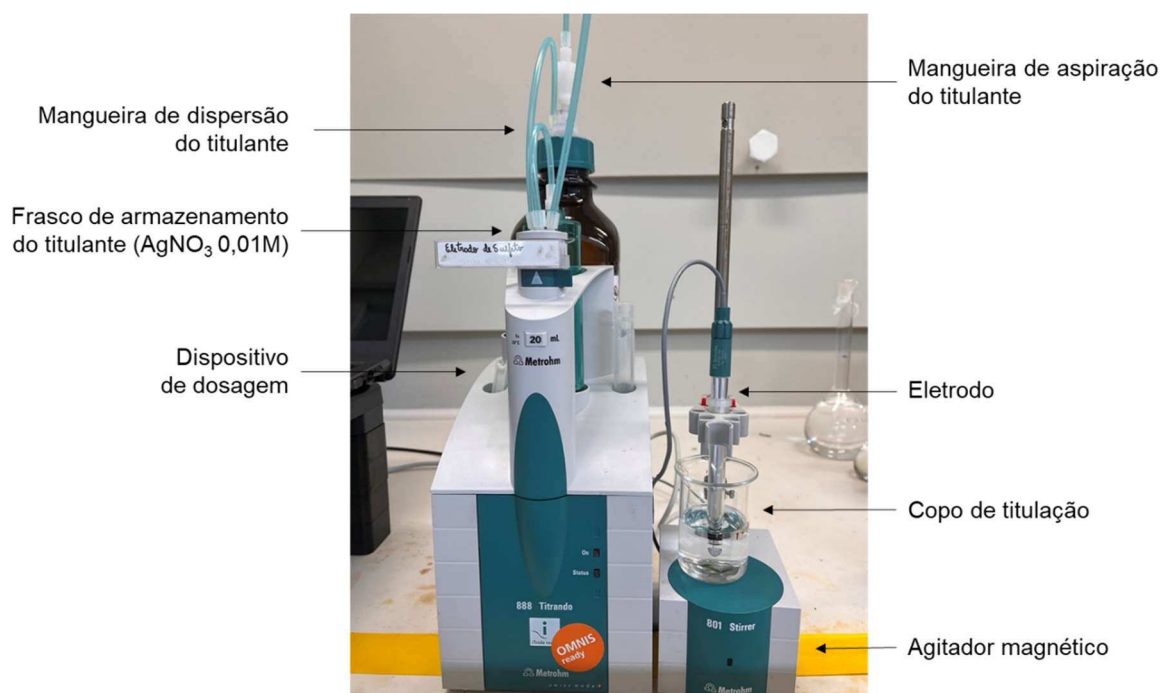
**OBS:** durante todo esse procedimento, os cupons devem ser manipulados utilizando-se luvas e/ou pinças estéreis para evitar a adesão de óleos e matéria orgânica das mãos do manipulador, pois isso, pode influenciar a fixação dos microrganismos e formação dos biofilmes.

## A12. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE SULFETOS DISSOLVIDOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

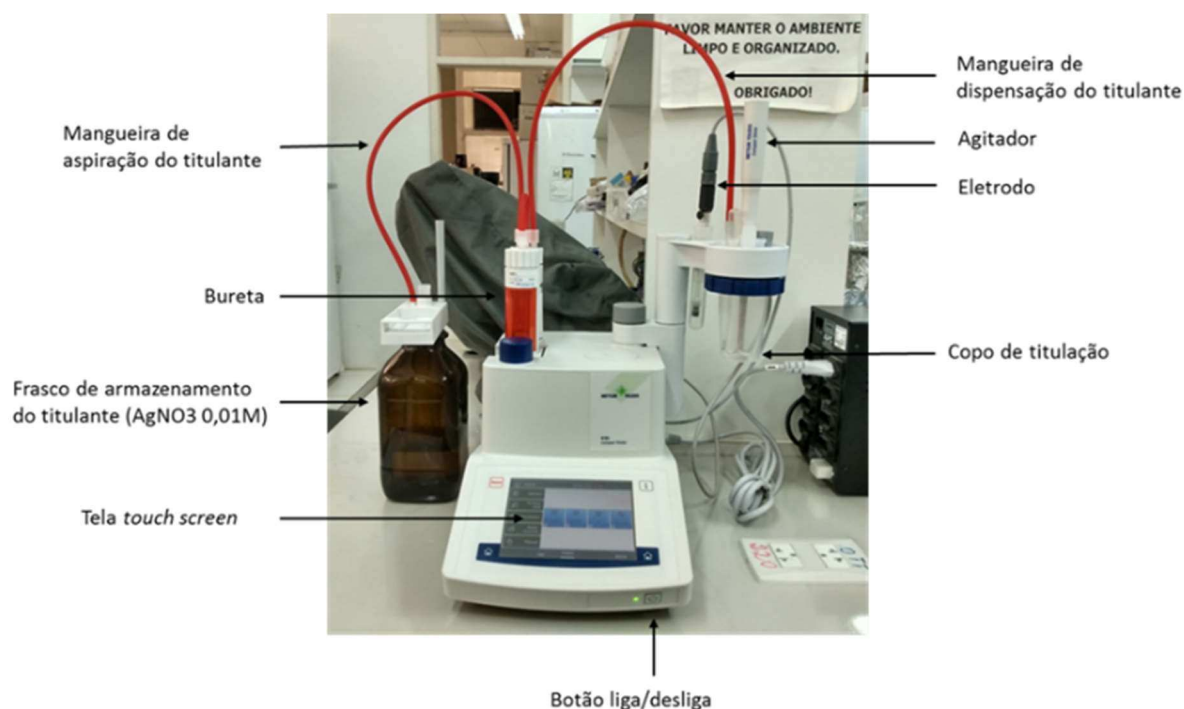
As análises de determinação dos teores de sulfetos dissolvidos são realizadas pelo método de titulação potenciométrica conforme o Padrão de Execução do CENPES, PE-2P&D-02561 - DETERMINAÇÃO DE SULFETOS E MERCAPTANOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA EM MEIOS DE CULTURA E ÁGUAS RESIDUAIS (CENPES/PETROBRAS, 2017d).

Essa metodologia está fundamentada em dois métodos de referência do UOP (*Universal Oil Products*) da *ASTM International*: (i) UOP 163-10 - *Hydrogen Sulfide and Mercaptan Sulfur in Liquid Hydrocarbons by Potentiometric Titration* (ASTM INTERNATIONAL, 2010); e, (ii) UOP 209-00 - *Alkalinity, Sulfide and Mercaptide Analyses of Used Refinery Caustic Solutions* (ASTM INTERNATIONAL, 2002).

O equipamento utilizado nas análises realizadas no CENPES é Titulador 888 Titrande (Metrohm), instalado no Laboratório de Processos (LABP), antigo Laboratório de Biotecnologia (BIO) (**Figura A4**); e, nas análises realizadas na UFV é o Titulador G10S (Mettler Toledo) instalado no Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM) (**Figura A5**).



**Figura A4.** Titulador 888 Titrande (Metrohm), utilizado para as análises de determinação dos teores de sulfetos dissolvidos no LABP do CENPES.



**Figura A5.** Titulador G10S (Mettler Toledo), utilizado para as análises de determinação dos teores de sulfetos dissolvidos no LIVM da UFV.

Para a quantificação do sulfeto dissolvido por titulação potenciométrica, a amostra contendo  $\text{H}_2\text{S}$  é misturada com uma solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 1,0 M, ocorrendo então a formação de sulfeto de sódio solúvel ( $\text{Na}_2\text{S}$ ). Essa mistura é inserida no titulador, acoplado com um eletrodo de lingote de prata sulfetado ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ), apropriado para determinações de compostos contendo enxofre (sulfetos e mercaptanos).

A titulação é feita utilizando nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), que permite uma quantificação indireta de  $\text{H}_2\text{S}$ . O produto principal da titulação é o sulfeto de prata insolúvel. Durante a titulação, geralmente aparecem dois pontos de inflexão. O primeiro ponto de inflexão corresponde ao sulfeto e o segundo ao dos mercaptanos. Os dois pontos aparecem em potencial negativo (mV). O resultado da quantificação de sulfeto e mercaptanos na amostra é mostrado em partes por milhão (ppm). Os limites inferiores do método são 1,0 ppm para o  $\text{H}_2\text{S}$  e 0,2 ppm para os mercaptanos.

Mercaptanos é um termo genérico para uma família de compostos orgânicos que contêm um grupo sulfídrico ( $-\text{SH}$ ) ligado a um átomo de carbono. Os mercaptanos são também chamados de tióis e, no caso de amostras biológicas, são em geral derivados do metabolismo de aminoácidos (KADOTA; ISHIDA, 1972). Contudo,

apesar de ser uma análise intrínseca ao método de titulação potenciométrica para a determinação dos teores de sulfetos, não há uma correlação direta bem estabelecida entre a geração biogênica de  $H_2S$  e os valores de mercaptanos, os quais podem variar muito entre amostras e em tempos diferentes de uma mesma cultura microbiana.

### A12.1. Preparo de soluções para a titulação potenciométrica

São utilizadas quatro soluções durante a titulação potenciométrica para determinação de sulfetos dissolvidos. A **Tabela A12** a seguir apresenta a composição dessas soluções. Os reagentes nitrato de prata e cloreto de sódio devem ser previamente secos em estufa a  $110^\circ C$  por 2 h. Todos os reagentes devem ter um grau de pureza P.A.

**Tabela A12.** Soluções utilizadas na titulação potenciométrica para determinação do teor de sulfetos dissolvidos.

Solução	Composição	Consumo/análise
<b>Titulante (nitrato de prata)</b>	- 1,6987 g de $AgNO_3$ 0,1 M - Avolumar com 1,0 L de água destilada	15,0 ml
<b>Padronização (do titulante)</b>	- 0,29226 g de $NaCl$ 0,1 M - 1 gota de $HNO_3$ 1:1 (em água destilada) - Avolumar com 50,0 ml de água destilada	3,0 ml (utilizado apenas na padronização)
<b>Hidróxido de Sódio (<math>NaOH</math>)</b>	- 40,0 g de $NaOH$ 1,0 M - Avolumar com 1,0 L de água destilada	50,0 ml
<b>Hidróxido de Amônio (<math>NH_4OH</math>)</b>	- 5,0 ml de solução de $NH_4OH$ concentrada (25 %)	5,0 ml

### A12.2. Procedimento de titulação potenciométrica

O procedimento para realização das análises de determinação dos teores de sulfetos dissolvidos por titulação potenciométrica consiste na realização das seguintes etapas em sequência, incluindo a padronização do titulante além da titulação em si:

- Lavar a bureta e verificar se as mangueiras estão corretamente posicionadas na bureta e na solução titulante;

- Conectar o eletrodo no suporte de titulação;
- Conectar um copo de titulação vazio no suporte de titulação;
- Iniciar o ciclo de titulação despejando a solução titulante no copo do titulador.

OBS: Essa etapa é importante para remover bolhas de ar da mangueira e para preencher a bureta completamente com o titulante. Apenas 1 ciclo é suficiente;

### **A12.3. Padronização do titulante (fatoração)**

- Verificar a data da última fatoração. A fatoração deve ser realizada sempre que for preparada uma nova solução titulante ou se a data da última fatoração for muito antiga;
- A fatoração deve ser realizada com três repetições;
- Adicionar 50,0 ml de água destilada em três copos de titulação;
- Acrescentar 1,0 ml da solução de padronização ( $\text{NaCl}$  0,1 M + 1 gota de  $\text{HNO}_3$  1:1) em cada copo;
- Conectar o copo contendo a solução no suporte de titulação;
- Realizar a fatoração;
- Lavar o eletrodo com um copo de titulação contendo água destilada;
- Conectar o copo contendo a solução da segunda repetição no suporte de titulação;
- Lavar o eletrodo com água destilada e repetir o procedimento com a terceira repetição;
- Aguardar o fim da titulação e verificar o fator obtido, o qual deverá ser muito próximo de 1.000;
- Lavar o eletrodo com água destilada e caso necessário, remover o excesso de precipitado branco com lenço de papel;

### **A12.4. Titulação da amostra**

- Adicionar 50,0 ml de  $\text{NaOH}$  1,0 M e 5,0 ml de solução concentrada de  $\text{NH}_4\text{OH}$  no copo de titulação em capela de exaustão;

- Conectar uma seringa no frasco do tipo antibiótico ou tubo tipo *Hungate* contendo a cultura microbiana ou amostra e aguardar alguns segundos para liberação do gás do *headspace*;
- Retirar 1,0 ml da amostra com seringa e adicionar no copo contendo a solução de NaOH + NH<sub>4</sub>OH;
- Conectar o copo contendo a amostra no suporte de titulação;
- Iniciar a Titulação;
- Após finalizar a análise, lavar o eletrodo com água destilada antes de conectar o copo de titulação da próxima repetição;
- Despejar a solução titulada em galão de descarte apropriado;
- Anotar as concentrações de sulfeto e mercaptanos;
- Após o término da titulação, lavar o eletrodo com água destilada, secar com lençol de papel e manter o eletrodo fechado e imerso em solução de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>).

OBS: quanto à manutenção do eletrodo, ele deve permanecer imerso em solução de KNO<sub>3</sub> 10 % em água destilada sempre que não estiver em uso, realizando a troca da solução sempre que ela estiver visualmente alterada. Para a limpeza do eletrodo, deve ser utilizada uma solução de tiosulfato 0,1 M em água destilada.

### A13. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os cupons coletados destinados às análises de MEV foram fixados, e desidratados conforme protocolo descrito abaixo e em seguida foram enviados para conclusão dos procedimentos de preparo e realização das análises no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV (CARMO, 2019; WANG et al., 2012):

- Lavar os cupons duas vezes por imersão em tampão PBS 1 X (NaCl 0,13 M; KCl 2,0 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,0 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 mM) em pH 7,2;
- Fixar os cupons em glutaraldeído para microscopia 2,5 % (v/v), preparado em tampão PBS 1 X, a temperatura ambiente por 2 h;
- Desidratar os cupons em gradiente de concentração crescente de etanol, de 30 a 100 % (v/v), sob temperatura ambiente por 10 min em cada concentração;
- Repetir a desidratação em etanol 100 % três vezes, a fim de se obter o máximo possível de remoção da água;

Após a última etapa de desidratação, os cupons foram encaminhados ao NMM da UFV e submetidos às seguintes etapas:

- Secagem em Ponto Crítico, *Critical Point Dryer* - CPD<sup>®</sup>, Balzers, modelo 030 **(Figura A6A)**;
- Fixação em porta-espécimes (*stubs*) com fita dupla face;
- Revestimento com carbono, com o Evaporador Quorum, modelo Q150T-E **(Figura A6B)**;
- E, por fim, foram examinados no Microscópio Eletrônico de Varredura, Leo 1430 VP, operando a 20 kV para a obtenção das imagens **(Figura A6C)**.

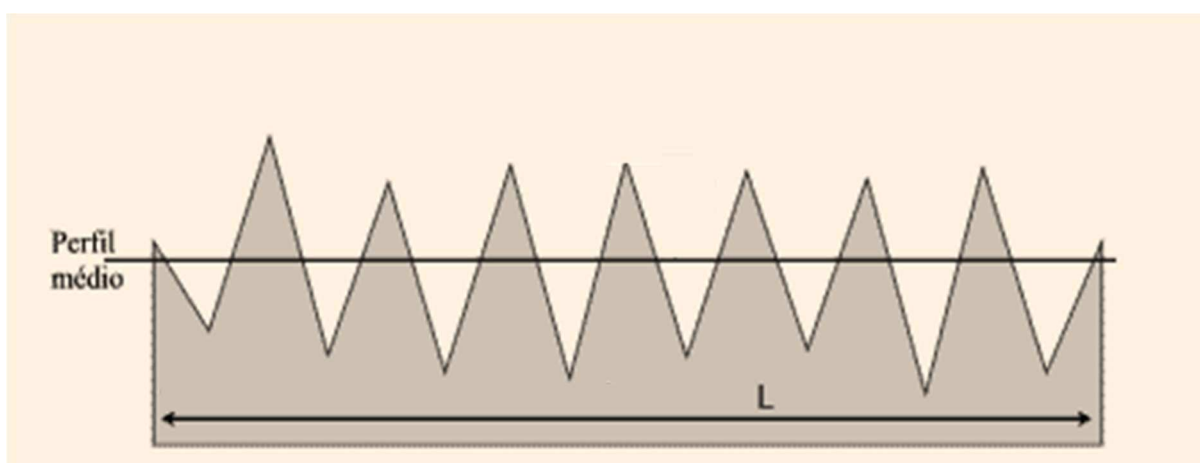


**Figura A6.** (A) Ponto Crítico, *Critical Point Dryer* - CPD<sup>®</sup>, Balzers, modelo 030; (B) Evaporador de carbono, Quorum, modelo Q150T-E; e, (C) Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Leo 1430 VP, do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

#### A14. PERFILOMETRIA ÓPTICA

A perfilometria óptica, é uma técnica utilizada para se obter a morfologia de uma superfície, através da medição de dados topográficos. A perfilometria, avalia a rugosidade na superfície do material, através da medição das alturas dos picos e das depressões da superfície em relação a um perfil médio, o que pode ser feito por uma sonda física ou por luz (LEE; CHO, 2012).

O perfil médio é a linha tal que, conforme ilustrado na **Figura A7**, no comprimento L, a soma das áreas cheias acima da linha horizontal é igual à soma das áreas vazias abaixo (BOUCHÉ; LEITNER; SANS, 1979).



**Figura A7.** Representação esquemática do perfil médio considerado na Perfilometria (BOUCHÉ; LEITNER; SANS, 1979).

As análises de perfilometria, foram realizadas no perfilômetro óptico modelo 3D *Contour Elite* (BRUKER, 2017), do Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física (DPF) da UFV (**Figura A8**).



**Figura A8.** Perfilômetro Óptico 3D *Contour Elite* (BRUKER, 2017) utilizado nas análises de perfilometria dos cupons metálicos.

A análise de perfilometria pode ser feita a partir de um único ponto, seguindo por uma varredura em linha do material, ou pode ser feita por uma varredura tridimensional completa da superfície do material, gerando um valor quantitativo denominado rugosidade média quadrática (*root mean square roughness*) –  $R_q$  ( $\mu\text{m}$ ).

No caso da avaliação de biofilmes em um cupom metálico, quanto maior for a  $R_q$  em comparação ao valor de um cupom sem biofilme, maior foi o crescimento do biofilme, portanto, alterações desse valor após um tratamento antimicrobiano, são um dos melhores indicativos do seu efeito na redução do biofilme.

## A15. PERDA DE MASSA E TAXAS DE CORROSÃO

Para a realização das análises de perda de massa e determinação das taxas de corrosão, os cupons metálicos devem ser previamente preparados e pesados conforme descrito no item A11, sendo que, para a avaliação da perda de massa, após a coleta, podem ser utilizados cupons dedicados, ou pode-se utilizar os mesmos cupons destinados às análises microbiológicas.

Nesse último caso, os cupons devem ser primeiramente processados para as análises microbiológicas e só depois, serem processados para a avaliação da perda de massa, tomando-se o cuidado de não expor os cupons ao ponto de causar oxidação adicional.

Após a coleta e conclusão das demais análises, os cupons devem ser decapados, raspados, secos e novamente pesados em balança analítica conforme procedimentos da Norma **ASTM G1-03: Standard Practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test Specimens** (ASTM INTERNATIONAL, 2017), para remoção de todos os resíduos e depósito de corrosão.

As etapas desse procedimento consistem em:

- Realizar a imersão dos cupons em uma das soluções ácidas descritas no Anexo 1 da referida norma, durante 5 a 20 segundos;
- Retirar os cupons da solução ácida e realizar a limpeza mecânica por escovação com escova de cerdas não metálicas;
- Lavar os cupons em água destilada;
- Repetir esse ciclo por no mínimo 5 vezes ou quantas vezes forem necessárias para a completa remoção dos depósitos de corrosão;
- Lavar os cupons novamente em água destilada;
- Lavar os cupons em álcool isopropílico (isopropanol) PA ( $\geq 99,5\%$ );
- Secar os cupons com soprador térmico (alternativamente pode ser utilizado um secador de cabelos);
- Deixar que os cupons esfriem em temperatura ambiente dentro de um dessecador;
- Após resfriados, pesar os cupons (na mesma balança analítica utilizada na pesagem inicial) e determinar as taxas de corrosão (TxCor).

A perda de massa é influenciada pela área superficial exposta e tempo de exposição. Essas variáveis são combinadas e expressas como a taxa de corrosão em mm/ano, calculadas conforme a equação abaixo, segundo a Norma **ASTM G31-21: Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals** (ASTM INTERNATIONAL, 2021).

$$\text{taxa de corrosão (TxCor)} = \frac{k \cdot \Delta m}{t \cdot A \cdot \rho}$$

Onde:

k = constante com valor de 87.600 para cálculo de taxa de corrosão em mm/ano;

$\Delta m$  = variação da massa em gramas (g);

t = tempo do ensaio em horas (h);

A = área da superfície exposta ao meio corrosivo em cm<sup>2</sup>;

$\rho$  = densidade do material em g/cm<sup>3</sup>.

Por sua vez, a corrosividade é classificada conforme a recomendação da Norma **NACE SP0775-2018-SG: Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations**, apresentada na **Tabela A13** abaixo (NACE INTERNATIONAL, 2018).

**Tabela A13.** Classificação da corrosividade segundo recomendação da Norma NACE SP0775-2018-SG (NACE INTERNATIONAL, 2018).

Taxa de Corrosão (mm/ano)	Corrosividade
$\geq 0,25$	Severa
0,13 a 0,25	Alta
0,025 a 0,12	Moderada
$\leq 0,025$	Baixa

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANKI, A.; FRETER, R. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. **The American journal of clinical nutrition**, v. 25, n. 12, p. 1329–1334, 1972.

ASTM INTERNATIONAL. **UOP 209-00 - Alkalinity, Sulfide and Mercaptide Analyses of Used Refinery Caustic Solutions**. West Conshohocken, PA, USA., 2002. Disponível em: <<https://www.astm.org/Standards/UOP209.htm>>

ASTM INTERNATIONAL. **UOP 163-10, Hydrogen Sulfide and Mercaptan Sulfur in Liquid Hydrocarbons by Potentiometric Titration**. West Conshohocken, PA, USA, 2010. Disponível em: <<https://www.astm.org/Standards/UOP163.htm>>

ASTM INTERNATIONAL. **G1-03: Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens**. West Conshohocken, PA, USA., 2017. Disponível em: <<https://www.astm.org/g0001-03r17e01.html>>

ASTM INTERNATIONAL. **G31-21: Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals**. West Conshohocken, PA, USA., 2021. Disponível em: <<https://www.astm.org/g0031-21.html>>

BD. **BBL Kligler Iron Agar Slants**. Becton Dickinson and Company, 2014.

BHAGOBATY, R. K. Culture dependent methods for enumeration of sulphate reducing bacteria (SRB) in the Oil and Gas industry. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 11–16, 2014.

BHATTACHARYA, S. K.; UBEROI, V.; DRONAMRAJU, M. M. Interaction Between Acetate Fed Sulfate Reducers and Methanogens. **Water Research**, v. 30, n. 10, p. 2239–2246, 1996.

BOUCHÉ, CH.; LEITNER, A.; SANS, F. D. **Rugosidade de Superfícies**. 1979. Disponível em: <<https://www.mspc.eng.br/dir70/rugosid1.php>>.

BRUKER. **3D Optical Profilometer Contour Elite**. 2017. Disponível em: <<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/test-and-measurement/3d-optical-profilers/contour-elite-x.html>>.

CARMO, A. J. Influência do fago vB\_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Brasil, p. 67, 2019.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-01620) - PREPARO DE SOLUÇÃO SALINA REDUTORA PARA PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS E UTILIZAÇÃO COMO DILUIÇÃO**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2017a.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-01590-A) - PREPARO DE MEIOS DE CULTURA POSTGATE “E” MODIFICADO PARA BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO MESÓFILAS (M-BRS)**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2017b.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-01643) - PREPARO DE MEIO DE CULTURA PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS FACULTATIVAS PRODUTORAS DE ÁCIDO (BPA) - MEIO TRÊS AÇÚCARES E FERRO (TSI)**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2017c.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-02561-0) - DETERMINAÇÃO DE SULFETOS E MERCAPTANOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA EM MEIOS DE CULTURA E ÁGUAS RESIDUAIS**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2017d.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-P&D-01581-A) - TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO TERMÓFILAS (BRS-t)**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2018a.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-01598-A) – TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS (BANHT)**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2018b.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-01595) – PROCEDIMENTO DE ESTERILIZAÇÃO DE CORPOS DE PROVA DE AÇO CARBONO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2018c.

CENPES/PETROBRAS. **Padrão de Execução (PE-2P&D-01570) - TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDOS (BPA)**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), 2021.

COCHRAN, W. G. Estimation of Bacterial Densities by Means of the “Most Probable Number”. **Biometrics**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 1950.

COCHRANE, W. J. et al. **Studies on the Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria From a Souring North Sea Oil Field**. European Petroleum Conference - Paper Number: SPE-18368-MS. **Anais**. London, UK: 1988.

CORNELL, R. G. Most Probable Number Counts. Em: KOTZ S, READ CB, BALAKRISHNAN N, V. B. (Ed.). **Encyclopedia of Statistical Sciences**. John Wiley and Sons Ltd, 2006.

CORNELL, R. G.; SPECKMAN, J. A. Estimation for a Simple Exponential Model. **Biometrics**, v. 23, n. 4, p. 717–737, 1967.

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

FEIO, M. J. et al. Isolation and characterisation of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* genus. **Anaerobe**, v. 4, n. 2, p. 117–130, 1998.

FICHTER, J. et al. **Direct Comparison of Microbial Population Analysis Using ATP Quantification, Culture Based Enumeration in Bug Bottles, Epifluorescence Microscopy and Shotgun Population Analysis by Sequencing 16S Amplicons**. CORROSION 2015 - Paper Number: NACE-2015-5555. **Anais**. Dallas, Texas, USA: 2015.

GONZÁLEZ, J. M. A general purpose program for obtaining most probable number tables. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 3, p. 215–218, 1996.

HAJNA, A. A. TRIPLE-SUGAR IRONAGAR MEDIUM FOR THE IDENTIFICATION OF THE INTESTINAL GROUP OF BACTERIA. **Bureau of Bacteriology, Maryland State Department of Health, Baltimore, Maryland**, p. 516–517, 1945.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3rd. ed. California, USA: Academic Press, 1998.

HUNGATE, R. E. Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. **Methods in Microbiology**, v. 3, n. PART B, p. 117–132, 1969.

JURELEVICIUS, D. et al. Long-term souring treatment using nitrate and biocides in high-temperature oil reservoirs. **Fuel**, v. 288, n. September, 2021.

KADOTA, H.; ISHIDA, Y. Production of Volatile Sulfur Compounds by Microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 127–138, out. 1972.

LABORCLIN. **TIOGLICOLATO COM INDICADOR**. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, 2019a.

LABORCLIN. **TSI - TRIPLE SUGAR IRON**. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, 2019b.

LEE, D. H.; CHO, N. G. Assessment of surface profile data acquired by a stylus profilometer. **Measurement Science and Technology**, v. 23, n. 10, 2012.

MAN, J. C. DE. MPN tables for more than one test. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p. 307–316, 1977.

MCCRADY, M. H. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. **The Journal of Infectious Diseases, Oxford University Press**, v. 17, n. 1, p. 183–212, 1915.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 985–987, 1974.

MOORE, W. E. C. Techniques for routine culture of fastidious anaerobes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 2, p. 173–190, 1966.

NACE INTERNATIONAL. **SP0775-2018-SG - “Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations”**. 2018. Disponível em: <<https://store.nace.org/sp0775-2013-formerly-rp0775-2>>.

NEVIUS, B. A.; BAGWELL, C. E.; BRIGMON, R. L. Characterization of Microbial Communities in TCE-Contaminated Seep Zone Sediments. **Journal of the South Carolina Academy of Science**, v. 2, p. 25–29, 2004.

OBLINGER, J. L.; KOBURGER, J. A. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique<sup>1</sup>. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 38, n. 9, p. 540–545, 1975.

POSTGATE, J. R. **The Sulphate Reducing Bacteria**. 2nd. ed. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1984.

SANDERS, P. F.; MOSLEY, M. J.; HOLT, D. M. Thermophilic Sulphide Generating Bacteria Causing Corrosion in High Temperature Oilfield Systems. **Biodeterioration** 7, p. 398–403, 1988.

SANTOS, V. V. C. M. DOS. **EFEITO DO NITRATO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA DE H<sub>2</sub>S EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO**. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ/Brasil, 2018.

SKOVHUS, T. L.; ECKERT, R. B.; RODRIGUES, E. Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—Overview and a North Sea case study. **Journal of Biotechnology**, v. 256, n. Mic, p. 31–45, 2017.

STROBEL, H. J. Chapter 16 - Basic Laboratory Culture Methods for Anaerobic Bacteria. Em: **Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 581 p. 247–261.

SURINACH, P. P. **A New Concept of Treating Surfaces Exposed to Oilfield Water Systems**. SPE International Symposium on Oilfield Chemistry - Paper Number: SPE-16262-MS. **Anais...**San Antonio, Texas: 1987.

WALDOW, V. DE A. **Relatório Técnico (RT BIO 017) - MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO E MÉTODOS MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CENPES/PETROBRAS - Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (Centro de Pesquisas Leopoldo Americo Miguez de Mello), nov. 2018.

WANG, R. et al. Inhibition of escherichia coli and proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 336–345, 2012.

WOODWARD, R. L. How Probable is the Most Probable Number? **Journal American Water Works Association**, v. 49, n. 8, p. 1060–1068, 1957.