

---

Copyright 2018, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2018, em São Paulo, no mês de maio de 2018.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

## **Avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura na geração biogênica de H<sub>2</sub>S em reservatórios de petróleo**

Vanessa Vólara Caminha Mota dos Santos<sup>a</sup>, Maíra Paula de Sousa<sup>b</sup>, Paula Fernandes de Aguiar<sup>c</sup>, Eliana Flávia Camporese Sérvulo<sup>d</sup>, Magali Christe Cammarota<sup>e</sup>

### **Abstract**

---

The biogenic generation of H<sub>2</sub>S (souring) in oil fields is generally due to the action of sulfate reducing prokaryotes microorganisms, which produce sulfide while oxidizing various electron donors. A more effective way of controlling souring is the addition of nitrate in the injection water during the oil recovery process to stimulate bacteria that reduce these compounds. The objective of the present work was to evaluate five nitrate concentrations (30, 50, 70, 90 and 110 mg/L) and three temperatures (30, 55 and 80 °C) and their interactions on H<sub>2</sub>S production. The experiments were conducted in hermetically sealed amber bottles, without agitation, with a contact medium that simulated the produced formation water in a oilfield and inoculum from the same reservoir. It was observed that the temperature had a considerable influence on the metabolism of the studied groups and that above 55 °C its growth was limited. There was a reduction in H<sub>2</sub>S contents at temperatures close to 30 °C with the dosage of 90 mg nitrate/L.

**Keywords:** biocompetitive exclusion, nitrate, souring, sulfate-reducing bacteria, biocorrosion.

### **Resumo**

---

A geração biogênica de H<sub>2</sub>S (*souring*) em campos de petróleo é, em geral, decorrente da ação de microrganismos procariotos redutores de sulfato, que produzem sulfeto enquanto oxidam diversos doadores de elétrons. Uma maneira mais efetiva de controle do *souring* é a adição de nitrato na água de injeção durante o processo de recuperação de petróleo para estimular bactérias que reduzem esses compostos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar cinco concentrações de nitrato (30, 50, 70, 90 e 110 mg/L) e três temperaturas (30, 55 e 80 °C) e suas interações sobre a produção de H<sub>2</sub>S. Os experimentos foram conduzidos em frascos âmbar hermeticamente fechados, sem agitação, com meio de contato que simulava a composição da água de formação de um campo de petróleo e inóculo oriundo do mesmo reservatório. Foi observado que a temperatura teve uma influência considerável no metabolismo dos grupos estudados e que acima de 55 °C o seu crescimento foi limitado. Verificou-se uma redução nos teores de H<sub>2</sub>S em temperaturas próximas a 30 °C com a dosagem de 90 mg/L de nitrato.

---

<sup>a</sup> Graduação-Bióloga - Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>b</sup> M.Sc-Bióloga - Petróleo Brasileiro S.A

<sup>c</sup> D.Sc-Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>d</sup> D.Sc-Engenheira Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>e</sup> D.Sc-Engenheira Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

**Palavras-chave:** exclusão biocompetitiva, nitrato, *souring*, bactérias redutoras de sulfato, biocorrosão.

## **Introdução**

---

A água do mar é normalmente injetada em poços de petróleo para aumentar a taxa de recuperação, porém os microrganismos presentes no sistema podem reduzir bioquimicamente os íons sulfato presentes na mesma, causando o *souring* (1). O controle da geração biogênica de H<sub>2</sub>S (*souring*) melhora a qualidade do óleo produzido e, conseqüentemente, diminui os custos de produção.

Sabe-se que a redução do sulfato pode estar associada ao metabolismo de microorganismo que degradam hidrocarbonetos mono-aromáticos como, por exemplo, benzeno, tolueno e etilbenzeno (2). A degradação microbiana desses compostos libera ácidos graxos voláteis (AGV), os quais podem ser usados como doadores de elétrons pelos organismos presentes no ambiente para a redução de compostos como, por exemplo, na redução do sulfato a sulfeto (3). Sendo assim, o controle do crescimento microbiano, em especial de microrganismos procariotos redutores de sulfato (PRS), assim como o controle da geração de H<sub>2</sub>S, é de grande importância para a indústria do petróleo. Um dos métodos utilizados para este controle é a adição de nitrato à água de injeção.

Ao introduzir o nitrato no sistema, o crescimento de bactérias redutoras de nitrato (BRN) é favorecido. Esse grupo de bactérias é bastante diverso metabolicamente, podendo prejudicar o crescimento dos PRS por exclusão biocompetitiva, já que disputam os mesmos recursos nutricionais ou pela produção de nitrito (como consequência da redução de nitrato), um inibidor dos PRS. Além disso, algumas BRN consomem sulfeto como fonte de energia e, desta forma, tendem a diminuir a concentração de H<sub>2</sub>S no meio. Uma outra forma da injeção de nitrato atuar no controle da geração de H<sub>2</sub>S é através da estimulação de espécies de PRS que alteram seu metabolismo para o consumo do nitrato, deixando de consumir o sulfato e, conseqüentemente, de produzir sulfeto de hidrogênio (4).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a concentração de nitrato mais eficaz, em função da temperatura, frente a microrganismos presentes em amostras de reservatórios que já empregam a injeção de nitrato como tratamento.

## **Metodologia**

---

Para a avaliação do efeito do nitrato em função da temperatura na geração biogênica de H<sub>2</sub>S foi definido um delineamento experimental (Doehlert), o que permitiu, dentre outras vantagens, a otimização do número de ensaios de modo a manter a representatividade dos resultados obtidos e a atenuação dos erros experimentais. Foram testadas diferentes concentrações de nitrato (30, 50, 70, 90 e 110 mg/L) e temperaturas (30, 55 e 80°C), totalizando 8 experimentos. O nitrato utilizado nos experimentos foi o nitrato de cálcio, o mesmo produto utilizado em campo por empresas do setor petrolífero, e os valores das concentrações de nitrato mencionados neste estudo referem-se às concentrações de nitrato de cálcio.

---

Para este estudo foram avaliadas as quantificações microbiológicas dos grupos das bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias redutoras de nitrato organotróficas (BRNorg) e bactérias redutoras de nitrato oxidantes de sulfeto (BRN-OS), mesofílicas e termofílicas, pelo método do Número Mais Provável (NMP) e o teor de geração de sulfeto em diferentes tempos (1, 3, 7, 14 e 28 dias).

O inóculo utilizado nos experimentos foi obtido a partir dos cultivos de uma amostra coletada em um poço produtor de um reservatório de petróleo de uma indústria petrolífera que faz uso de nitrato de cálcio visando a mitigação da geração de H<sub>2</sub>S biogênico. A temperatura inicial deste reservatório era de aproximadamente 80°C, salinidade aproximada de 35 g/L de NaCl (cloreto de sódio). A amostra foi cultivada sucessivamente em meios específicos para BRS, BRNorg e BRN-OS, em mesofilia e termofilia, ao longo de 6 meses.

Para as concentrações iniciais de BRS, BRN-OS e BRNorg, definiu-se a quantificação de massa de DNA total, já que pela técnica convencional utilizada para quantificação destas populações bacterianas (NMP) só se obtém os resultados após 28 dias de incubação, além da exposição dos meios à temperaturas acima da ambiente poder levar a resultados errôneos por requerer maiores tempos de incubação ou, inclusive, por propiciar modificações da composição química.

O meio de contato utilizado nos experimentos simulava a composição química da água produzida do reservatório do qual as amostras foram coletadas. O meio de cultura foi composto de água do mar natural, suplementada com sais essenciais e ácidos orgânicos de cadeia curta como fonte de carbono. A concentração dos ácidos orgânicos foi calculada de modo a estabelecer a relação carbono/sulfato do meio Postgate E modificado (5), mantendo-se a proporção dos ácidos orgânicos encontrada na caracterização química da água de produção coletada do reservatório de petróleo em questão, e adicionando-se solução de elementos-traço (6). O contato é o ensaio propriamente dito, onde o inóculo, as diferentes concentrações de nitrato e o meio de cultura específico são colocados em um mesmo frasco (contato), o qual é incubado de acordo com a temperatura definida para os experimentos.

Todos os ensaios foram realizados em frascos de vidro âmbar de 250 mL vedados com batoque e tampa de rosca para que não houvesse interferência do oxigênio, além de garantir que, caso houvesse geração de H<sub>2</sub>S, este não escapasse para o ambiente.

## **Resultados e discussão**

---

Conforme apresentado na Tabela 1, foi possível extrair DNA de todos os grupos microbianos e temperaturas avaliados. No entanto, verifica-se que a massa de DNA total obtida diminui consideravelmente à medida que se aumenta a temperatura dos cultivos. Também cabe salientar que o meio de cultivo para BRN-OS não propiciou um crescimento bacteriano similar ao obtido nos outros dois meios avaliados.

É importante ressaltar que o DNA total foi extraído dos cultivos realizados a partir das amostras originais. No caso dos inóculos a 80°C, estes foram obtidos a partir dos cultivos já incubados à temperatura de 55 °C ao longo do tempo. Portanto, é possível que durante esse período tenham sido perdidas algumas espécies somente capazes de sobreviver ou desenvolver em condições extremas de temperatura.

**Tabela 1 - Quantificação em massa de DNA Total (ng/μL)**

	30°C	55°C	80°C
BRS	845,0	54,6	23,3
BRNorg	626,6	144,6	24,4
BRN-OS	72,0	40,0	10,0

Cabe salientar também que, com exceção do meio de cultura para BRS termofílicas, os demais meios de cultura utilizados no preparo dos inóculos foram desenvolvidos para cultivos a 30 °C. Essa característica dos meios também pode reduzir as chances de recuperar grupos bacterianos termófilos e hipertermófilos.

As arqueias possuem estruturas de parede celular e de membrana que permitem que elas sobrevivam em ambientes extremos, como aqueles com temperaturas elevadas (7). O cultivo de arqueias anaeróbias é dificultado pelo fato de serem extremamente sensíveis ao oxigênio (8). Como as amostras originais, quando coletadas no reservatório, não ficaram totalmente isentas de oxigênio, é possível que tenham sido perdidos muitos grupos de arqueias. Além disso, o processo de cultivo e incubação das amostras não foi feito em meios específicos para arqueias, mas sim em meios conhecidos para bactérias, o que pode ter diminuído ainda mais a sobrevivência daqueles grupos.

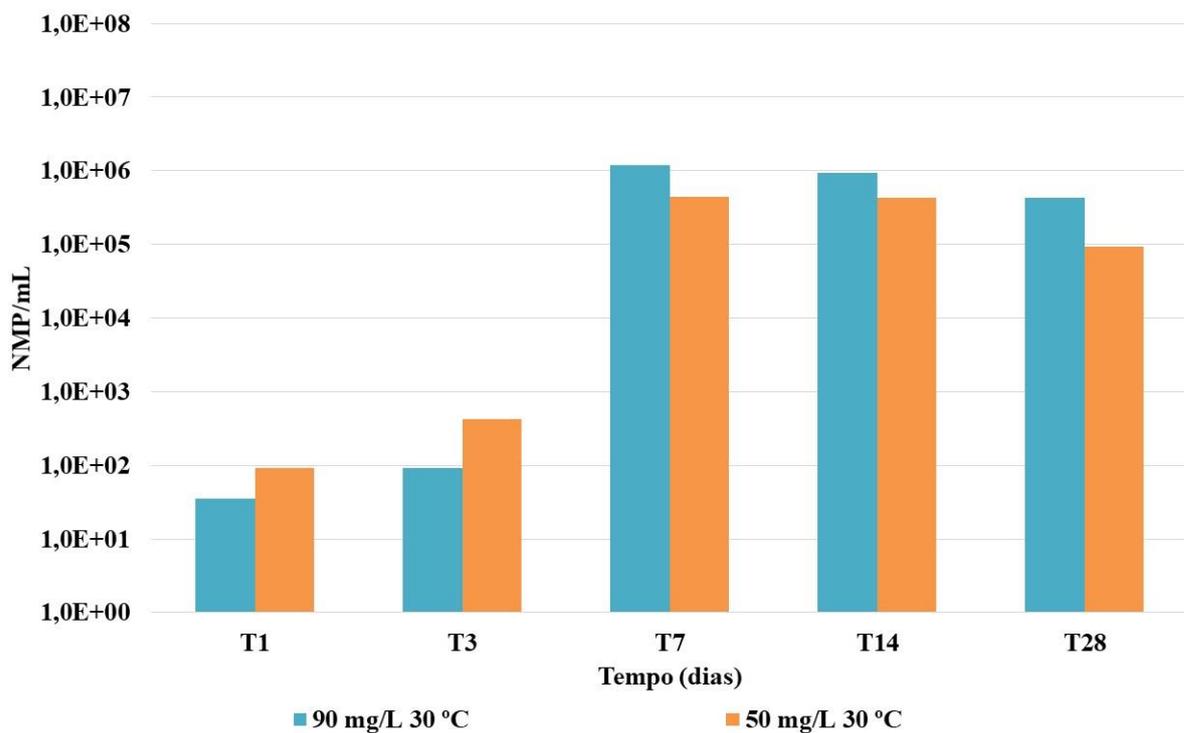
#### a) Análise dos resultados microbiológicos

As Figuras 1, 2 e 3 demonstram o comportamento dos grupos microbianos BRS, BRNorg e BRN-OS, respectivamente, ao longo do tempo, nos 8 ensaios do planejamento experimental definido para este trabalho.

É possível observar que a 30°C as BRS cresceram aproximadamente 4 ordens de grandeza, a partir do 7º dia, mantendo-se nas concentrações atingidas até o último dia do ensaio (28º dia), independentemente da concentração de nitrato. Já as temperaturas mais elevadas inibiram o crescimento deste grupo, que foi praticamente zero nestas condições (Figura 1).

O ligeiro aumento de BRS evidenciado no início do ensaio pode estar relacionado à atividade de algumas espécies de BRS que são capazes de crescer utilizando nitrato como aceptor final de elétrons (9,10). *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 é um exemplo de BRS capaz de utilizar a redução dissimilativa do nitrato, na ausência de sulfato (11).

Como previsível, tanto as BRNorg quanto as BRN-OS (Figuras 2 e 3) apresentaram comportamento bem distinto ao das BRS (Figura 1), uma vez que a presença de nitrato estimula a competição entre elas pelas fontes de carbono disponíveis (12). Evidencia-se uma elevada concentração de bactérias redutoras de nitrato desde o primeiro dia do ensaio; valor que se manteve até o 14º dia, com considerável decaimento no 28º dia.



**Figura 1 - Avaliação do efeito do nitrato x temperatura ao longo do tempo para as BRS.**

Como citado anteriormente, o metabolismo dos microrganismos redutores de nitrato, por ser mais acelerado do que o das BRS, consome o nitrato disponível nos primeiros dias de ensaio. Assim, as BRS conseguem crescer notadamente somente após a supressão do nitrato (Figura 1). Também foi observado por SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO (2010) que à medida que o nitrato é consumido e não é feita uma nova aplicação, as BRS voltam a consumir o sulfato disponível no meio, retomando seu crescimento. Daí a importância da adição periódica de nitrato como controle da biogênese de sulfeto em reservatórios.

Em relação à temperatura é possível observar uma maior influência no controle microbiano nos grupos avaliados a partir de 55 °C. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que pode ter havido perdas nas comunidades termófilas quando os inóculos, ao longo dos meses prévios ao experimento, foram cultivados em meios de cultivos não específicos para temperaturas mais altas (exceto no caso das BRS termofílicas que foram cultivadas em meios específicos a 55 °C).

É importante salientar que neste estudo estão sendo avaliados os resultados encontrados a partir da quantificação microbiológica baseada em cultivo e que organismos de ambientes mais extremos são mais difíceis de serem cultivados e que técnicas moleculares podem ser mais aplicáveis neste caso.

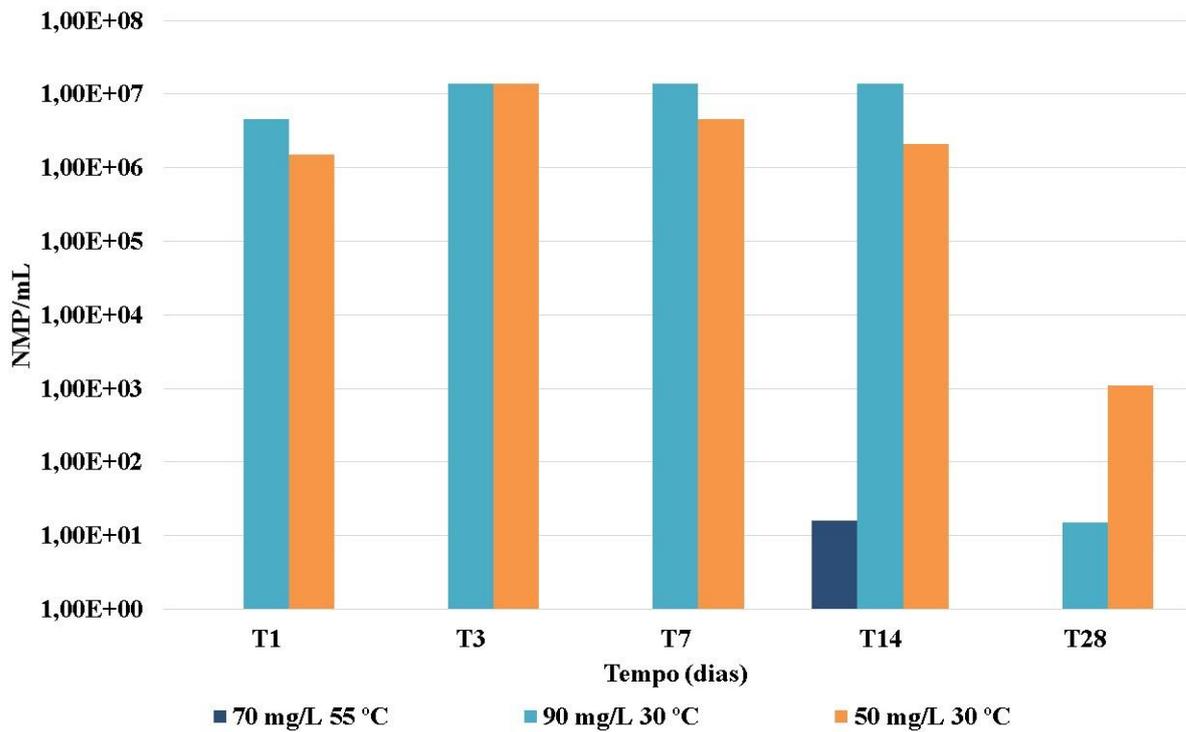


Figura 2 - Avaliação do efeito do nitrato x temperatura ao longo do tempo para as BRNorg.

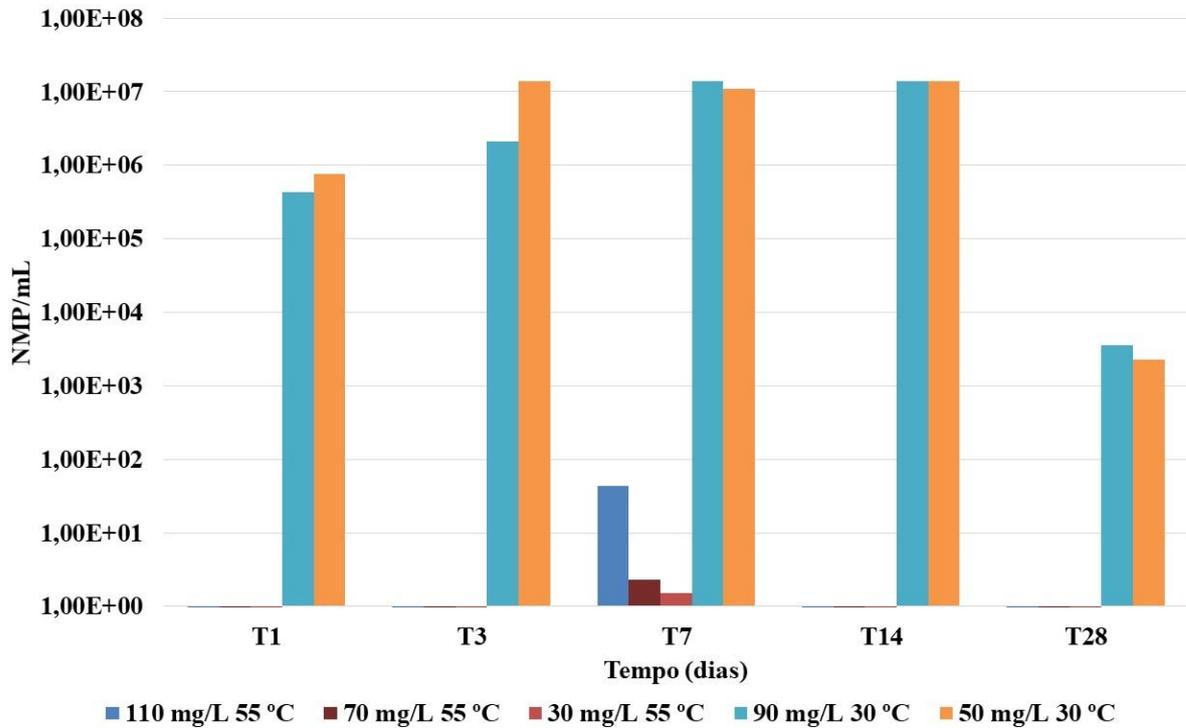
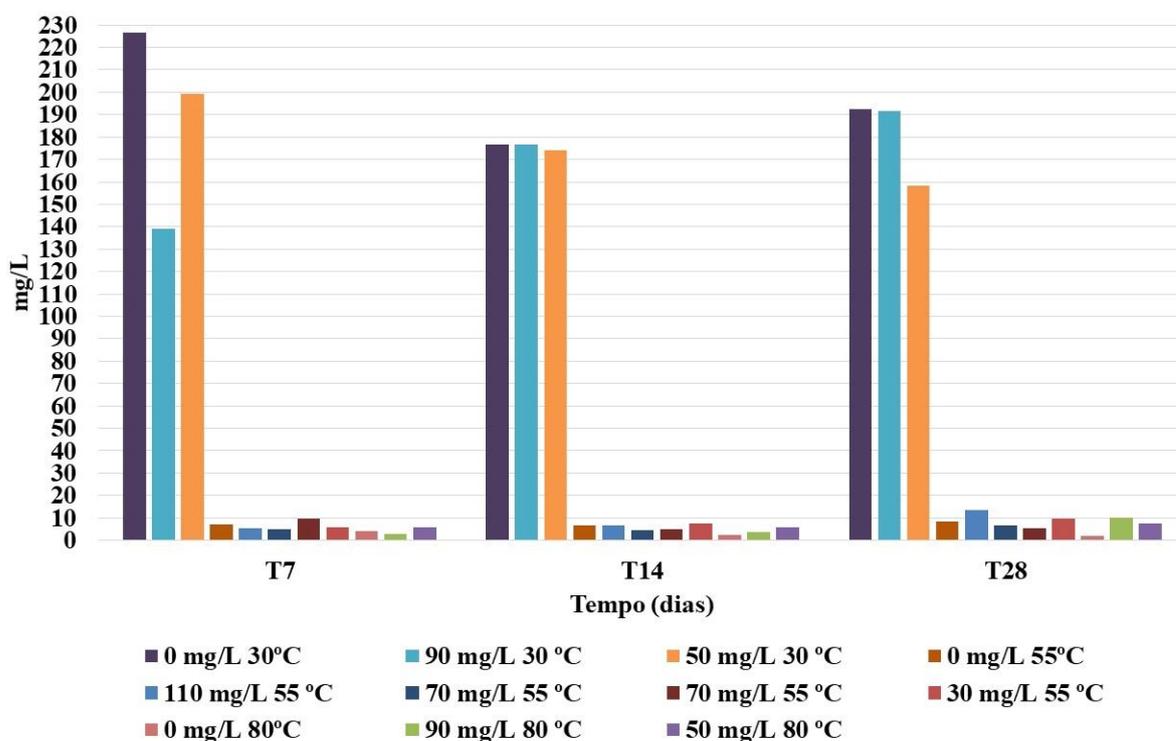


Figura 3 - Avaliação do efeito do nitrato x temperatura ao longo do tempo para as BRN-OS.

## b) Análise de Sulfeto

A Figura 4 apresenta os resultados obtidos para a quantificação do sulfeto gerado, em mg/L, ao longo dos 5 tempos avaliados nos 8 ensaios do planejamento experimental. Não foi realizada a quantificação inicial do sulfeto por não haver tempo para a geração deste composto. Os ensaios descritos como 0 mg/L são ensaios que receberam inóculo, mas não tiveram dosagem de nitrato.

Os teores de sulfeto gerados nos tempos 1 e 3 dias foram muito baixos, sendo apresentados na Figura 4 somente os resultados a partir de 7 dias, tempo em que se observou um alto crescimento das BRS mesofílicas. As diferenças encontradas entre os diferentes tratamentos estabelecidos pelo planejamento experimental foram muito tênues. É possível que o tempo de incubação dos ensaios tenha influenciado os resultados, visto que o metabolismo do sulfato é bastante lento. O mesmo pode ser dito em relação à temperatura.



**Figura 4 - Avaliação do efeito do nitrato x temperatura ao longo do tempo para o teor de Sulfeto Total.**

Foi possível observar uma alta geração de sulfeto somente nos ensaios com temperatura de 30°C e 90 ou 50 mg/L de nitrato. Comparados ao ensaio em que não ocorreu dosagem de nitrato, no tempo 7 dias, houve uma redução da concentração de sulfeto de aproximadamente 40% para a dosagem de 90 mg/L de nitrato, enquanto que para a dosagem de 50 mg/L de nitrato ocorreu uma redução de aproximadamente 13% de sulfeto. Não foi observada uma geração significativa de sulfeto (aproximadamente 10 mg/L) nas temperaturas de 55 e 80 °C.

Já para o tempo de 14 dias não foi observada geração de H<sub>2</sub>S nas temperaturas de 55 e 80 °C, e nas temperaturas de 30 °C não foram observadas reduções na concentração de sulfeto, que se manteve em aproximadamente 180 mg/L de H<sub>2</sub>S.

No tempo de 28 dias, há um aumento da geração de H<sub>2</sub>S nas temperaturas de 55 °C e concentrações de nitrato de 110 mg/L e 70 mg/L, enquanto na temperatura de 80 °C foi observado um ligeiro aumento do sulfeto biogênico na dosagem de 90 mg/L de nitrato. Já na temperatura de 30 °C a geração de sulfeto torna a aumentar. Confrontando com os resultados microbiológicos, também foi observado um decréscimo nas populações de bactérias redutoras de nitrato, tanto as BRNorg quanto as BRN-OS. É possível que após esse período o nitrato dosado tenha sido totalmente consumido pelos microrganismos redutores de nitrato. Com isso, as BRS devem voltar a consumir o sulfato disponível e, conseqüentemente, retomar o metabolismo de geração de H<sub>2</sub>S.

## Conclusões

---

A biocompetição estimulada pela presença do nitrato foi confirmada, incentivando o aumento na concentração dos grupos de BRNorg e BRN-OS, em detrimento do grupo das BRS. Apesar das BRS ainda estarem presentes no meio reacional, verificou-se que sua atividade (produção de H<sub>2</sub>S) estava reduzida. No entanto, com a supressão do nitrato, as BRS voltaram a consumir o sulfato disponível e a gerar o H<sub>2</sub>S, o que endossa a conclusão de que o nitrato exerce efeito inibidor sobre o metabolismo de redução de sulfato.

Temperaturas acima de 55 °C limitaram o crescimento dos grupos microbianos avaliados. Portanto, a eficácia do nitrato para controlar o metabolismo dos microrganismos estudados deve ser maior em reservatórios com altas temperaturas.

Apesar de ter sido observado que a temperatura teve uma influência considerável no metabolismo dos grupos estudados, recomenda-se que essa variável seja reavaliada utilizando inóculos que tenham sido obtidos através de cultivos incubados sob as mesmas temperaturas selecionadas para os ensaios.

A mitigação da geração biológica de sulfeto foi constatada a 90 mg/L de nitrato, na temperatura de 30 °C em 7 dias.

## Referências bibliográficas

---

- (1) TANJI, Y., TOYAMA, K., HASEGAWA, R., MIYANAGA, K. Biological souring of crude oil under anaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 114–120, 2014.
- (2) WEIJMA, J., BOTS, E. A. A., TANDLINGER, G., STAMS, A. J. M., POL, L. W. H. LETTINGA, G. Optimisation of sulphate reduction in a methanol-fed thermophilic bioreactor. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 1825–1833, 2002.
- (3) HANDA, T., LIM, C. P., TAKASE, Y., MIYANAGA, K., TOMOE, Y., TANJI, Y. Microbial and chemical characterizations of oil field water through artificial souring experiment. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 43, n. 9, p. 792–797, 2010.
- (4) HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2644–2652, 2007.
- (5) POSTGATE, J.R. **The sulphate-reducing bacteria**. New York: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1984.
- (6) EDEN, B., LAYCOCK, P. J., FIELDER, M. **Oilfield Reservoir Souring**. 1993.

- 
- (7) MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. S., STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. Person Education, 2016.
  - (8) ROTHE, O.; THOMM, M. A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic Archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 4, p. 247–252, 2000.
  - (9) SÁNCHEZ-ANDREA, I., STAMS, A. J. M., HEDRICH, S., ÑANCUCHEO, I., JOHNSON, D. B. Desulfosporosinus acididurans sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 39–47, 2015.
  - (10) MARIETOU, A. Nitrate reduction in sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 15, p. 2016–2019, 2016.
  - (11) MARIETOU, A., GRIFFITHS, L., COLE, J. Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by a nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 882–889, 2009.
  - (12) MYHR, S., LILLEBØ, B. L., SUNDE, E., BEEDER, J., TORSVIK, T. Inhibition of microbial H<sub>2</sub>S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 400–408, 2002.
  - (13) SOUSA, K., CAMMAROTA, M. C., SÉRVULO, E. F. C. Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 273–278, 2010.