

PEDRO DE SÁ TEIXEIRA

**CONTROLE E MONITORAMENTO DE CORROSÃO
MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO: UMA REVISÃO
DA LITERATURA**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do diploma de Engenharia de Petróleo.**

SANTOS

2021

PEDRO DE SÁ TEIXEIRA

**CONTROLE E MONITORAMENTO DE CORROSÃO
MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO: UMA REVISÃO
DA LITERATURA**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do diploma de Engenharia de Petróleo.**

**Área de concentração: Corrosão
microbiológica**

Orientador: Jean Vicente Ferrari

SANTOS

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Pedro de Sá
CONTROLE E MONITORAMENTO DE CORROSÃO
MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO: UMA
REVISÃO DA LITERATURA / P. S. Teixeira -- São Paulo, 2021.
50 p.

Trabalho de Formatura - Escola Politécnica da Universidade de
São Paulo. Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo.

1. Corrosão microbiológica, Métodos moleculares
microbiológicos, Biofilme I. Universidade de São Paulo. Escola
Politécnica. Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo
II.t.

RESUMO

A corrosão microbiológica é responsável por parte das falhas de dutos no setor de petróleo e gás. Este tipo de corrosão está associado com as mais diversas culturas microbianas, tendo ênfase principalmente nas bactérias sulfato redutoras. Colônias complexas de microrganismos, chamadas biofilme, após se depositarem e aderirem a uma superfície de contato, mantidos pela secreção gelatinosa protetora, ou lodo, iniciam seu crescimento nos dutos. Esta é uma etapa crucial dos processos de corrosão microbiológica e as formações e estruturas dos biofilmes indicam que cada colônia é totalmente única. Com o intuito de mitigar a corrosão microbiológica no setor petrolífero, deve-se primeiramente avaliar com precisão e rapidez a colônia microbiana estudada. Para isso, os métodos moleculares microbiológicos estão se aprimorando com novas tecnologias com o objetivo de detectar e analisar os genes permitindo uma caracterização detalhada e precisa dos microrganismos. Com o uso dos métodos de sequenciamento genético, torna-se possível compreender a formação do biofilme e investir pontualmente no mecanismo de mitigação de corrosão adequado.

Palavras-chave: Corrosão microbiológica, Métodos moleculares microbiológicos, Biofilme.

ABSTRACT

Microbiologically influenced corrosion accounts for nearly half of the pipeline failures in the oil and gas industry. This type of corrosion is associated with a wide variety of microbial cultures, emphasizing on sulfate-reducing bacteria. Complex colonies of microorganisms called biofilms begin their growth in pipes after deposition and attachment to a contact surface maintained by a protective gelatinous secretion or slime. This is a crucial step in microbiologically influenced corrosion processes and the formations and structures of biofilms show that each community is unique. The microbial colonies under study must be first accurately and rapidly assessed to contain microbiological corrosion in the oil sector. To this end, microbiological molecular methods are being improved with new technologies to detect and analyze genes that allow detailed and precise characterization of microorganisms. Using genetic sequencing methods makes it possible to understand the formation of biofilms and invest in the appropriate mechanism for corrosion control on time.

Keywords: microbiologically influenced corrosion, Molecular Microbiological Methods, Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da metodologia do trabalho. Fonte: do próprio autor	16
Figura 2 - Morfologia típica de corrosão microbiológica devido à SRB. Fonte: ISLAM <i>et al.</i> , (2016)	19
Figura 3 – Reações de degradação do aço carbono pelas SRB. Fonte: Adaptado de Emmanuel e Shaapere (2018).....	23
Figura 4 - Benefícios de aplicação dos MMM para controle de MIC. Fonte: Adaptado de Skovhus; Eckert (2014).....	30
Figura 5 - Fluxograma dos MMM em testes de laboratório. Fonte: Adaptado Sharma <i>et al.</i> (2019)	31
Figura 6 - Esquematização da técnica de bioprophyling. Fonte: Adaptado de Geurkink <i>et al.</i> (2016)	34
Figura 7 - Monitoramento de mitigação. Fonte: Adaptado de Hofmann; van Strien (2019)	39
Figura 8 - Comparação de técnicas usadas para análise microbiológica no setor petrolífero. Fonte: Adaptada de Bennet (2016)	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de técnicas de monitoramento de corrosão microbiológica. Fonte: Adaptado de Moore <i>et al.</i> (2019).....	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Teste de adenosina trifosfato
Biofilme	Comunidades biológicas estruturadas com elevado grau de organização
<i>Bioprofiling</i>	Perfil da microbiologia
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridisation</i>
MIC	Corrosão microbiológica
MMM	Métodos moleculares microbiológicos
MPN	<i>Most probably number</i>
NGS	Sequenciamento de próxima geração
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Pigging</i>	O ato de forçar um dispositivo denominado <i>pig</i> através de um duto para os meios de deslocamento ou separação de fluidos e limpar ou inspecionar a linha
<i>Primer</i>	Pedaços curtos de DNA de fita simples e são projetados de modo que englobem a região de interesse
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SRA	Arqueia redutora de sulfato
SRB	Bactéria redutora de sulfato

SUMÁRIO

1.1 INTRODUÇÃO	8
1.2 OBJETIVO	13
1.3 JUSTIFICATIVA	14
2 METODOLOGIA	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Corrosão microbiológica	17
3.2 Métodos convencionais para detectar os microrganismos	24
3.2.1 Most probably number (MPN)	24
3.2.2 Teste de adenosina trifosfato (ATP).....	25
3.3 Métodos moleculares microbiológicos (MMM) para identificar e/ou quantificar os microrganismos	26
3.3.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e sequenciamento de próxima geração (NGS)	32
3.4 Controle e monitoramento	35
4 ANÁLISE E DISCUSSÃO	40
4.1 Métodos moleculares microbiológicos (MMM)	40
4.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	41
4.3 Sequenciamento de próxima geração (NGS)	43
5 CONCLUSÃO	45
5.1 CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO	47
5.2 TRABALHOS FUTUROS	48
REFERÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1.1 INTRODUÇÃO

A corrosão em dutos de óleo e gás tem sido um problema severo, causando os principais mecanismos de falha no setor. Pode ser ocasionada por diferentes aspectos entre eles físicos, químicos e biológicos e estima-se que em 2013, os custos globais com falhas causadas por qualquer tipo de corrosão atingiram aproximadamente 2.5 trilhões de dólares (Mand *et al.*, 2019).

A corrosão microbiológica (*microbiologically influenced corrosion*, MIC) é responsável por 40% das falhas de dutos no setor petrolífero e associa todas as formas de corrosão que podem ser ocasionadas por microrganismos, como bactérias sulfato redutoras, bactérias acetogênicas e metanogênicas. Sua grande porcentagem de falha no setor ocorre devido à particularidade dos oleodutos e sua maior susceptibilidade à formação de biofilme, comunidades estruturadas com elevado grau de organização (Zhong *et al.*, 2019).

A presença e atividade microbiana frequentemente resultam em consequências econômicas significativas devido à deterioração do produto, corrosão do metal, incrustação biológica, acidificação e obstrução. Fatores importantes que encorajam o crescimento e a atividade microbiana não benéfica em sistemas industriais incluem a presença de interfaces água / metal / rocha / óleo, a presença de nutrientes orgânicos e inorgânicos, aceptores de elétrons, temperaturas propícias, pH e condições redox. Quando existem condições adequadas, microrganismos podem florescer e consequências prejudiciais significativas podem ocorrer rapidamente. Isso é particularmente verdadeiro na indústria de petróleo e gás, onde os microrganismos frequentemente causam efeitos como MIC, acidificação pela presença de sulfeto e incrustação biológica em sistemas de superfície e de fundo de poço (Poulsen *et al.*, 2016).

Sistemas complexos de dutos, tubos e vasos, com curvas, *dead-legs* e válvulas são particularmente propensos a problemas microbianos. Portanto, as indústrias de petróleo e gás normalmente aplicam programas estritos de biocidas químicos e limpeza física para mitigar e controlar essas consequências. MIC é a consequência mais difundida, importante e bem conhecida da atividade microbiana, devido à sua corrosão localizada, intensa e rápida de materiais do campo petrolífero

(frequentemente medido na faixa de mm por ano), levando ao risco de falhas de oleodutos, com consequências tanto econômicas quanto ambientais (Poulsen *et al.*, 2016).

Os custos devido ao MIC são frequentemente significativos. Relatórios recentes estimam que um custo anual de manutenção relacionada à corrosão de dutos pode ser em média de aproximadamente US\$ 15.000 por milha de duto. Quando a MIC não é controlada, pode resultar em paradas inesperadas da produção, impacto ambiental devido a vazamentos, grandes reparos não planejados e aumento dos custos de tratamento químico. Em casos graves de MIC, o sistema pode até precisar ser substituído, às vezes por ligas resistentes à corrosão, o que geralmente é uma proposição antieconômica (Poulsen *et al.*, 2016).

A formação do biofilme, por ser uma estrutura organizada, pode depender de diversos fatores: tipo de microrganismo envolvido, condições ambientais e características do metal em questão. As bactérias redutoras de sulfato (*sulphate reducing bacteria*, SRB) são uma das mais comumente encontradas nas instalações petrolíferas e estão diretamente envolvidas com os ataques corrosivos. A formação do biofilme ocasionada por esse tipo de bactéria, influencia as reação catódicas e anódicas do metal, acelerando os processos corrosivos, a partir da redução do sulfato a sulfeto (Sørensen *et al.*, 2012).

O crescimento do biofilme nos metais é um processo dinâmico e complexo, dependente de diferentes fatores, como estado da superfície metálica, limitação de difusão e tensão de cisalhamento aplicada pelo líquido em movimento (Liu *et al.*, 2017). O escoamento do líquido que transita os oleodutos é uma grandeza que influencia o fator de tensão de cisalhamento e a velocidade de escoamento do líquido pode causar o desprendimento do biofilme formado (Liu *et al.* 2017).

Como tentativa de impedir o crescimento do biofilme e conseqüentemente da corrosão em dutos, foram criados métodos de monitoramento e controle capazes de analisar o desenvolvimento da cultura de microrganismos a fim de intervir em casos de necessidade. Tais métodos podem variar entre técnicas eletroquímicas, como espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizada como avaliador do processo corrosivo, até estudos envolvendo testes baseados na reação em cadeia de

polimerase (*polymerase chain reaction, PCR*), utilizados como monitoramento contínuo feito em tempo real (Liu *et al.* 2017).

Os testes conhecidos como métodos moleculares microbiológicos (MMM), do qual o teste PCR faz parte, são usados rotineiramente a fim de avaliar se há a necessidade de intervenção e tomar medidas restritivas, para que não chegue à condição de abandono do poço. Segundo a literatura, o modelo de testes de reação em cadeia de polimerase foi desenvolvido com objetivo de contribuir na obtenção de dados nos sistemas petrolíferos estimando o grau de corrosão e o tempo antes do início da corrosão. São testes relativamente baratos e simples, porém não são capazes de distinguir células vivas de células mortas, o que pode acarretar em uma aproximação de organismos vivos superestimada (Larsen *et al.*, 2013).

Para suprir as condições mais elaboradas do poço, o método de PCR de transcrição reversa foi desenvolvido e pode prover um modelo mais detalhado em se tratando dos riscos de MIC nos oleodutos (Larsen *et al.*, 2013). Essa operação, denominada de modelamento de segundo nível, é mais custosa e relativamente mais complicada que a primeira, porém está habilitada a identificar os tipos de microrganismos envolvidos na corrosão.

Durante a avaliação da ameaça de corrosão, a probabilidade de cada mecanismo corrosivo em potencial é avaliada em cada sistema e circuito. Nesta etapa, os engenheiros responsáveis pela avaliação da corrosão revisam os dados de projeto, processo, operação, tratamento químico, monitoramento de corrosão e inspeção para ajudar a identificar as prováveis ameaças de corrosão que afetam diferentes locais do sistema. Dutos e circuitos podem ser subdivididos em segmentos nos quais diferentes condições de operação ou composição do fluido alteram a gravidade das ameaças de corrosão aplicáveis. Ao avaliar o potencial de MIC, é importante estabelecer uma relação clara entre o biofilme e a corrosão localizada. Os MMMs podem ser usados nesta etapa para caracterizar as condições microbiológicas de linha de base, para procurar associações entre presença de biofilme, composição do biofilme e corrosão e para relacionar as características do biofilme com as condições operacionais (Skovhus; Eckert, 2014).

Deve-se considerar também, a interação entre duas ameaças de corrosão, como por exemplo, o aumento da formação e estabelecimento do biofilme ligado a corrosão sob depósito promovida por depósitos sólidos. Quando os dados adequados estão disponíveis, a integração e análise programática podem ajudar a verificar as ameaças de corrosão previstas. A investigação de danos ou falhas de corrosão usando procedimentos de análise de laboratório e de campo formalizados também pode ser usada para verificar os mecanismos de corrosão em uma tubulação (Skovhus; Eckert, 2014).

A próxima etapa de avaliação consiste em selecionar as barreiras preventivas e mitigativas necessárias para administrar as ameaças apontadas. Ao avaliar as opções de mitigação antes da implementação completa, os MMMs são benéficos para examinar o efeito dos tratamentos candidatos sobre a corrosão e o biofilme e para monitorar as mudanças nos tipos ou números de microrganismos após a aplicação do tratamento. Os dados fornecidos pelos MMM também são úteis para determinar a abordagem ideal para a mitigação de MIC e para selecionar os biocidas ou produtos químicos antimicrobianos apropriados (Skovhus; Eckert, 2014).

A terceira e última etapa serve para mensurar as barreiras empregadas para reduzir a probabilidade ou a gravidade das ameaças de corrosão. O monitoramento de corrosão normalmente fornece informações sobre a taxa de perda de metal devido à corrosão e não o mecanismo de corrosão. Contudo, a revisão e a integração de dados de condição operacional, monitoramento de dados, sondas e inspeção, resultados de análise de depósito e fluido químico ou microbiológico e saída de regime de fluxo e modelos de corrosão podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos de corrosão que conduzem os danos associados. A análise laboratorial estendida pode fornecer evidências diretas dos mecanismos de corrosão ativos no sistema (Skovhus; Eckert, 2014).

Os métodos usados para monitorar a MIC devem demonstrar que os microrganismos e suas atividades fornecem a influência predominante sobre o mecanismo de corrosão, ao contrário de outros mecanismos abióticos que podem estar presentes. Geralmente, isso significa que o monitoramento deve integrar as medições das características da superfície / biofilme com a corrosão localizada. Nesse sentido, os MMMs são valiosos para monitorar os efeitos de mitigação de longo e curto prazo e

mudanças na eficácia do tratamento químico em relação às características do biofilme (Skovhus; Eckert, 2014).

1.2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo elucidar a utilização dos métodos moleculares microbiológicos para o controle e monitoramento da corrosão microbiana no setor de óleo e gás por meio de uma revisão de literatura. Serão apresentadas as vantagens e limitações dos testes desta natureza e as tendências de sua utilização e aplicações.

1.3 JUSTIFICATIVA

Existem diversos trabalhos da literatura a respeito de corrosão microbiológica e dos métodos mais utilizados a fim de monitorar e mitigar o problema em questão. Neste sentido, o trabalho pretende agrupar informações acerca de diversos microrganismos com intuito de melhor compreender como empregar tais métodos.

Com isso, o trabalho visa englobar as mais diferentes técnicas de monitoramento microbiológico existentes e ao apontar suas vantagens e desvantagens, servindo de auxílio para melhor entendimento de como ocorre o problema de corrosão microbiológica, que afeta drasticamente o setor de óleo e gás, e expor mecanismos de monitoramento e controle da mesma.

2 METODOLOGIA

A área de concentração da pesquisa consiste em agregar os principais artigos sobre corrosão microbiológica encontrados majoritariamente no site de buscas da *OnePetro®* e avaliar métodos possíveis de monitoramento e controle deste tipo de corrosão associados à indústria de petróleo. Dessa forma, as palavras-chave da pesquisa em inglês foram: *microbiologically influenced corrosion*, *molecular microbiological methods*, *polymerase chain reaction* e *quantitative polymerase chain reaction* e *next generation sequencing*.

Inicialmente a pesquisa teve como intuito o melhor entendimento da corrosão microbiológica, como ela está atrelada à formação de biofilme nos dutos de petróleo e quais tipos de microrganismos podem formar os biofilmes e como eles se relacionam entre si.

Posteriormente, para ser possível realizar o monitoramento e controle eficaz de um sistema, precisa-se de uma boa comparação entre os métodos de identificação microbiológicos, como o PCR, qPCR e NGS aplicáveis e o bom entendimento do melhor cenário de aplicação de cada um.

Tendo essas informações em vista, pode ser criado um cenário de controle e mitigação de corrosão microbiológica.

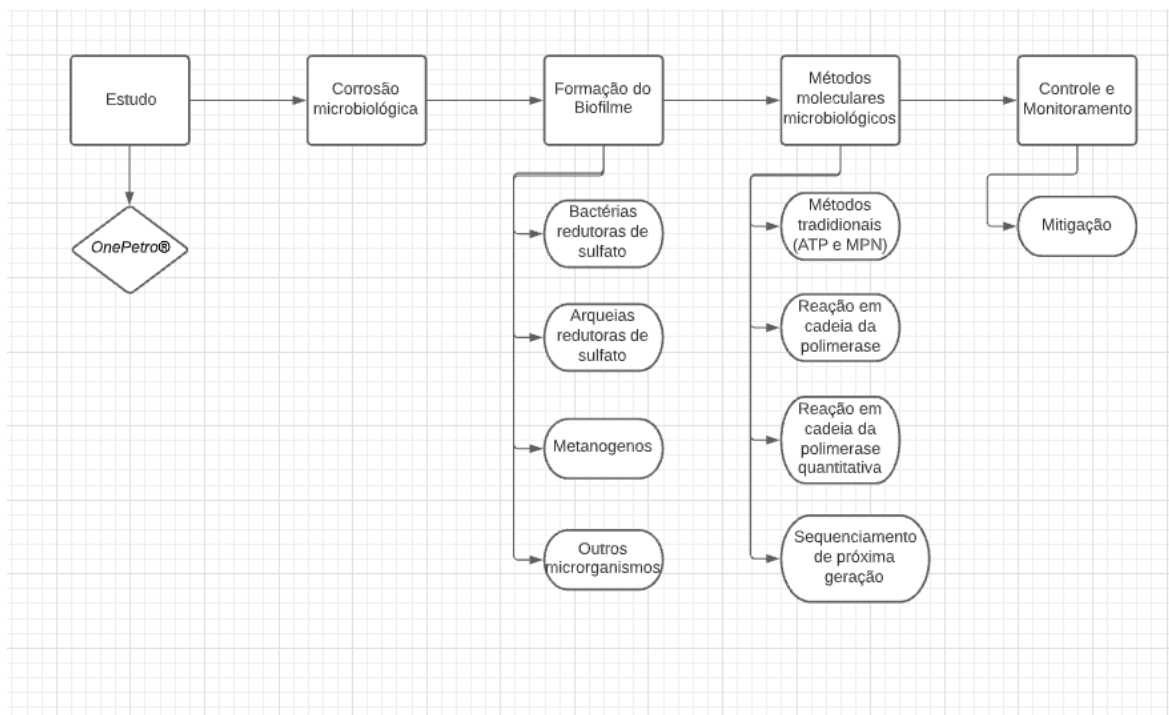


Figura 1 - Fluxograma da metodologia do trabalho. Fonte: do próprio autor

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corrosão microbiológica

A corrosão microbiológica tem sido um dos maiores problemas que preocupa a indústria de petróleo. Normalmente, ela é causada por organismos capazes de produzir sulfetos usando os íons sulfato como aceitadores de elétrons, a partir da degradação de compostos orgânicos em meio anaeróbio. Durante a MIC, é formado biofilme na superfície metálica dos dutos o que influencia as reações anódicas e catódicas, levando à aceleração da corrosão (Liu *et al.*, 2017).

A corrosão interna por pite e a perda de espessura da parede metálica foram observadas em oleodutos de petróleo bruto, apesar de terem sedimentos básicos e conteúdo de água muito baixos (inferiores a 0,5%) em locais onde os sedimentos tendem a se acumular (Haile *et al.*, 2017). Os sedimentos chamados de lama ou lodo são compostos pelos mais diversos tipos de hidrocarbonetos, subprodutos da corrosão, microrganismos, água e outros. As lamas criam condições propícias para a formação de colônias de microrganismos por conta de acumularem e concentrarem água do óleo e criar uma interface entre o metal e a água, criando as condições necessárias para a corrosão microbiológica (Haile *et al.*, 2017).

A corrosão microbiológica se manifesta em áreas onde a tensão de cisalhamento de fluido na parede do tubo, a força responsável pela mobilização de tais sólidos, é reduzida. O lodo pode auxiliar a proliferação e cultivo das colônias bacterianas como SRB, SRA (*sulphate reducing archaea*), bactérias metanogênicas, bactérias acetogênicas, fermentadores, bactérias redutoras de ferro, arqueias redutoras de ferro, bactérias oxidantes de ferro, bactérias oxidantes de manganês, bactérias produtoras de ácido e formadores de limo, entre outros. É importante ressaltar que a MIC pode ocorrer sob diversos ambientes nos dutos e sob condições adversas de operação, desde que o crescimento microbiano seja garantido pelo sistema (Haile *et al.*, 2017).

A corrosão é um processo interfacial cuja cinética é determinada pelo ambiente físico e químico de sua interface. Isso inclui a concentração de oxigênio dissolvido,

variações de pH, condutividade, presença de sais e outros. Tais parâmetros podem ser influenciados por microrganismos que se desenvolvem na interface dos dutos formando biofilmes após embeber-se em lodo, também conhecido como substância polimérica extracelular (*extracellular polymeric substance*, EPS). A EPS pode ser responsável pela maioria do carbono orgânico dos biofilmes, sendo considerada material da matriz primária do biofilme e é geralmente compostos de polissacarídeos (Haile *et al.*, 2017).

Embora a MIC seja um mecanismo pesquisado durante décadas, diagnosticar uma falha específica causada por ela ainda pode ser um desafio. A maior dificuldade consiste em diferenciar com precisão as falhas, devido a suas similaridades morfológicas quando comparados a outros tipos de mecanismos de danos, como por exemplo a corrosão por pite devido ao cloreto. Além disso, a confusão na identificação da falha causada pela MIC pode ser agravada pelo fato de que a presença de bactérias em um sistema não garante necessariamente que a MIC seja culpada (Al Muaisub, 2020).

A morfologia típica do ataque MIC em aço inoxidável é um ataque localizado, de abertura estreita, com uma grande cavidade subsuperficial. A corrosão por pite pode ser explicada simplesmente pelo ataque localizado das espécies de ânions agressivos na camada de óxido passivo, levando a uma ruptura. Por outro lado, tentar explicar os mecanismos da MIC, principalmente para o manejo, é bastante desafiador, principalmente devido às diversas cepas bacterianas e seu envolvimento no processo de corrosão. Isso se tornará ainda mais crítico quando a equipe de investigação não tiver experiência com o tratamento com biocidas e testes de bactérias (Al Muaisub, 2020).

A morfologia do dano de corrosão localizada devido ao MIC mostra algumas características, dependendo do tipo de ambiente e das espécies de bactérias sésseis. É relatado na literatura que o dano de corrosão no caso de SRB se manifesta como cavidades largas com características em terraço. Além disso, os ataques localizados produzidos por SRB podem corresponder a taxas de corrosão localizada de 2 a 3 mm por ano (Islam *et al.*, 2016).

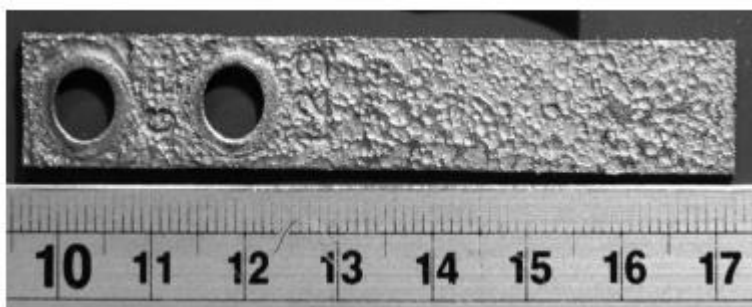


Figura 2 - Morfologia típica de corrosão microbiológica devido à SRB. Fonte: ISLAM *et al.*, (2016)

A injeção de água do mar é um procedimento crucial em diversas instalações *offshore*. Essa água passa por diversos tratamentos e diferentes ambientes. É clorada, filtrada, desoxigenada e tratada com biocida e outros produtos químicos. Ela é então, injetada nos reservatórios sob altas pressões para eventualmente entrar no sistema de produção, onde será submetida a condições ambientes totalmente diferentes. Os organismos reagem rapidamente às mudanças de seu ambiente e devido a seu curto tempo de geração, os efeitos sobre a população podem ser notados. (Hoffmann; Spark, 2012).

Diferentes organismos são capazes de crescer dentro de tais sistemas de injeção de água, especialmente os procariontes redutores de sulfato (*sulfate reducing prokaryotes*, SRP), que prosperam com o alto teor de sulfato da água do mar. (Hoffmann; Spark, 2012)

Teoricamente, a disponibilidade de nutrientes, além do sulfato, na água do mar pode parecer limitante para o crescimento de altos níveis de micróbios planctônicos (por exemplo, em água do mar aberta). No entanto, quando a água do mar é introduzida no sistema de injeção de água contida, as condições podem começar a se tornar mais favoráveis para os microrganismos crescerem e formarem biofilmes (Hoffmann; Spark, 2021).

Os biofilmes são caracterizados por uma grande heterogeneidade e podem variar sua espessura de monocamadas moleculares. Eles podem promover reações físico-químicas na interface não favorecidas em condições abióticas. Isso pode ocorrer devido à atividade metabólica dos indivíduos capaz de alterar o pH do local. Sendo assim, na interface onde o processo de corrosão está acontecendo, os valores de pH podem ser muito diferentes daqueles do fluido que percorre o duto (Haile *et al.*, 2017).

Como tentativa de avaliar a susceptibilidade da MIC e entender os mecanismos, a coleta de lodo em operação de *pigging* (O ato de forçar um dispositivo denominado *pig* através de um duto para os meios de deslocamento ou separação de fluidos e limpar ou inspecionar a linha) se tornou uma prática comum na indústria. Utilizando diferentes métodos de caracterização, programas de coleta de dados sobre o lodo são usados para prever e corrigir problemas relacionados à corrosão atrelada a bactérias e microrganismos (Haile *et al.*, 2017).

A MIC não é um processo simples, mediado apenas por SRB, mas é frequentemente causado por uma comunidade complexa de diferentes micróbios apoiando uns aos outros. Além disso, essa complexidade microbiana explica por que a MIC pode ser rápida e localizada: onde a comunidade microbiana se torna estabelecida e estável, a MIC pode ser grave; onde uma comunidade microbiana menos diversa está presente, o risco de MIC pode ser menor. A ligação entre a diversidade microbiana e a MIC explica por que a avaliação precisa da MIC em sistemas industriais era muito difícil no passado: os métodos de cultivo tradicionais não detectam ou quantificam facilmente muitos dos principais grupos microbianos. Métodos recentes de não cultivo (baseados na reação em cadeia da polimerase e em técnicas de sequenciamento de DNA, como por exemplo os MMM, reação em cadeia da polimerase quantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), e sequenciamento de próxima geração (*next-generation sequencing*, NGS) , entretanto, foram desenvolvidos e aplicados para obter dados confiáveis, precisos e úteis sobre comunidades microbianas a partir de amostras de sistemas tradicionais. As tecnologias de não cultivo são ferramentas muito poderosas no gerenciamento de MIC (Poulsen *et al.*, 2016).

A formação do biofilme na superfície do metal é a etapa crucial dos processos de MIC. Seu crescimento é influenciado por condições ambientais e a tensão de cisalhamento aplicada pelo líquido em movimento. É possível diminuir a taxa de corrosão ao impedir a fixação das células à superfície metálica, etapa conhecida como primeiro estágio da formação de biofilme. Porém, nenhum estudo teve êxito em relacionar a taxa de corrosão com o número de SRB apegados à superfície (Zhong *et al.*, 2019).

O biofilme é uma comunidade complexa de microrganismos ligados à superfície mantidos juntos pela EPS. A EPS é uma mistura complexa de água, carboidratos, proteínas, DNA e outras moléculas que se gelificam para dar ao biofilme uma

sensação e aparência viscosa. É esta estrutura que protege a comunidade bacteriana do ambiente externo hostil enquanto, ao mesmo tempo, extrai nutrientes essenciais do habitat circundante (Denvir *et al.*, 2019).

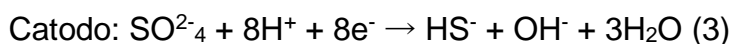
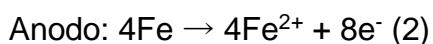
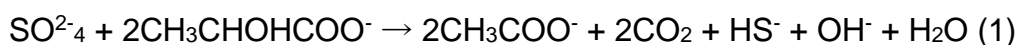
A pesquisa sobre a formação e as estruturas de biofilmes multiespécies sugere fortemente que cada biofilme é totalmente único e é um produto do ambiente circundante naquele tempo e lugar precisos. É a natureza simbiótica do biofilme que os microrganismos e o substrato no qual o biofilme é formado que torna a MIC uma das formas mais nefastas de corrosão. A natureza dinâmica do biofilme pode resultar em múltiplos mecanismos de corrosão (geração localizada de substâncias corrosivas, formação de células de concentração diferencial, inativação de inibidores de corrosão), ocorrendo na superfície simultaneamente, tornando difícil remediar ou prevenir com uma única abordagem ou tratamento (Denvir *et al.*, 2019).

Na última década, houve um surgimento de métodos moleculares, como PCR em tempo real, chips de genes *microArray*, análise de T-RFLP e pirosequenciamento (método baseado no sequenciamento e síntese de DNA) que foram usados para obter uma visão sem precedentes sobre a natureza dos biofilmes coletados de locais que experimentam MIC. No entanto, um dos fatores que está limitando a adoção em larga escala de tal abordagem é o custo associado à identificação da existência de problemas de MIC do biofilme e coleta de amostra de forma reproduzível e repetível (Denvir *et al.*, 2019).

Dutos de transporte de petróleo bruto e tanques de armazenamento são particularmente suscetíveis à MIC, pois fornecem o ambiente ideal rico em nutrientes para o crescimento de bactérias redutoras de sulfato. A maioria dos dutos de transporte de petróleo bruto são tratados com sequestrantes de oxigênio para diminuir a concentração de oxigênio dissolvido a um nível aceitável (abaixo de 10ppb) para mitigar o ataque localizado devido ao oxigênio in-situ. No entanto, a injeção de eliminadores de oxigênio introduz nutrientes para o crescimento das SRB, além de criar um ambiente anaeróbico que apoia o seu crescimento. Da mesma forma, a maioria dos tanques de armazenamento de petróleo bruto tem sistema de cobertura que limita a entrada de oxigênio, criando o ambiente anaeróbico para o crescimento das SRB e MIC localizado em dutos de carbono e aços de baixa liga (Emmanuel; Shaapere, 2018).

O controle de SRB envolve o desenvolvimento de um programa de tratamento químico robusto, implementando a mitigação de medidas e monitoramento para avaliar a eficácia do tratamento e conformidade com os regulamentos da empresa e locais. No entanto, a caracterização precisa e a classificação de risco da ameaça SRB ainda são um desafio. Os biofilmes SRB podem se desenvolver dentro do sistema sem serem a principal causa de danos. Com isso, faz-se necessária aplicar uma abordagem baseada no risco para a caracterização e classificação do risco SRB (Emmanuel; Shaapere, 2018).

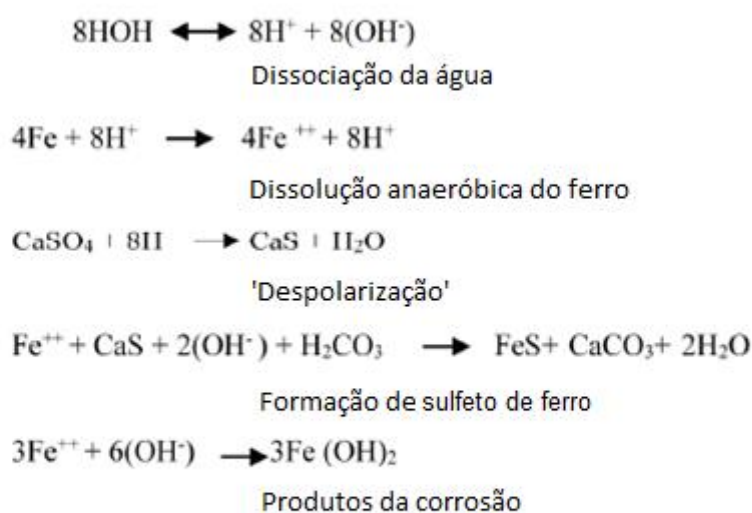
As bactérias redutoras de sulfato são as mais comumente encontradas na produção de óleo e gás e, além daquelas capazes de reduzir sulfato através de carbono orgânico, foram encontrados novos tipos de SRB aptas a usar o ferro metálico como único doador de elétron (Zhong et al., 2019). Embora cada uma delas provoque uma reação complexa diferente, o efeito geral pode ser resumido nas reações básicas do processo de dissolução do ferro pelas bactérias, assim como exemplificado pelas reações (2) e (3). Um estudo feito a partir do baixo fornecimento de carbono realizados em um tipo SRB organotrófico comum a curto e longo prazo mostrou que a falta de carbono pode aumentar a corrosão por pite sugerindo uma absorção direta dos elétrons pelo metal juntamente com a redução de sulfato pelas SRB (Zhong *et al.*, 2019).



A equação (1) toma o lactato como exemplo na redução do sulfato pelas SRB, normalmente se referindo à redução do sulfato à oxidação do carbono orgânico.

Van Wolzogen Kuhr e Van Der Vlugt (1934), em seu estudo da corrosão anaeróbica de tubos de aço em solo úmido devido às SRB, teorizaram que o SRB remove o hidrogênio catódico da superfície do metal. Bryant (1991) afirmou que a reação é catalisada pela enzima hidrogenase presente no SRB. Smith (1975) e Jack e Westlake (1995) com base no trabalho de pesquisadores anteriores propuseram que o produto de corrosão FeS poderia ter contribuído para acelerar a taxa de corrosão, apoiando

uma transferência de elétrons mais rápida da superfície do ferro para o SRB. Van Wolzogen Kuhr e Van Der Vlugt (1934) creditaram o nascimento da MIC em 1934 com sua publicação "A grafitação do ferro fundido como um processo eletroquímico em solos anaeróbicos" atribuiu a aceleração da corrosão ao consumo de hidrogênio catódico por bactérias redutoras de sulfato (SRB), na presença de íon sulfato. As reações descritas na figura 2 exemplifica este efeito:



O resumo das reações acima é como descrito abaixo:



Figura 3 – Reações de degradação do aço carbono pelas SRB. Fonte: Adaptado de Emmanuel e Shaapere (2018).

Starkey (1985) em seus estudos com solo aceitou a teoria atrativa de Van Wolzogen Kuhr e Van Der Vlugt (1934), no entanto, opinou que aparecem discrepâncias, o que sugere que há outros fatores que provavelmente estariam envolvidos na despolarização do aço por bactérias, além da remoção do hidrogênio catódico. Ele citou a evidência para apoiar sua preposição de que a aeração diferencial das células de concentração de oxigênio desempenha um papel importante na corrosão anaeróbica, com base em observações de campo de baixas taxas de corrosão em ambiente anaeróbico contendo grande quantidade de sulfeto e atividade SRB e altas taxas de corrosão quando o oxigênio está presente em parte do tempo (Emmanuel; Shaapere, 2018).

3.2 Métodos convencionais para detectar os microrganismos

3.2.1 Most probably number (MPN)

Por várias décadas, os operadores de campos petrolíferos observaram e mitigaram os efeitos prejudiciais das atividades microbianas em seus campos e instalações. Vários testes de campo e de laboratório foram desenvolvidos para detectar e / ou quantificar os microrganismos. Um dos métodos mais amplamente usados é MPN (*most probably number*). Este é um método de cultura baseado no princípio da diluição em série. Durante a amostragem MPN, uma amostra de 1ml de água é coletada de um poço, vaso ou duto e colocada em um frasco de 10ml contendo meio específico (nutrientes). Após agitar este frasco, uma sonda de 1ml é retirada do primeiro frasco de diluição e colocada em um segundo frasco de 10ml; criando assim uma diluição de 10 vezes. A diluição é repetida várias vezes. Após um tempo de incubação de 21 a 28 dias, os frascos podem apresentar alteração de cor devido aos produtos metabólicos gerados pelos micróbios que consumiram os nutrientes dos frascos. Ao observar em que diluição isso não ocorre mais, pode-se estabelecer um "número mais provável" de células presentes na amostra de água original (Hofmann; van Strien, 2019).

Existem composições de mídia específicas para enumerar grupos específicos de microrganismos como os SRB, bactérias produtoras de ácido e bactérias redutoras de ferro. Para avaliar toda a biodiversidade de um sistema (sem qualquer conhecimento prévio das condições específicas de salinidade ou temperatura), seria necessário usar muitos kits diferentes. Mesmo assim, não será possível enumerar ou detectar cada espécie ou grupo, pois é muito difícil imitar as condições específicas de crescimento em reservatórios, dutos e poços dentro de pequenos frascos de mídia no laboratório. Algumas espécies podem crescer nos frascos de mídia ou podem ter morrido durante a amostragem e transporte para o laboratório e, portanto, não são detectadas. Além disso, esta técnica MPN enumerará apenas os micróbios viáveis (vivos). Embora isso possa ser benéfico em alguns casos, muito pode ser aprendido com os microrganismos mortos no sistema, já que eles podem ter formado uma comunidade viável mais abaixo (Hofmann; van Strien, 2019).

3.2.2 Teste de adenosina trifosfato (ATP)

Além do MPN, outras técnicas de cultivo ao vivo foram desenvolvidas que funcionam mais rapidamente para detectar SRB e podem ser empregadas no local. Também é possível enumerar toda a comunidade microbiana viável via ATP no local, mas isso não permite que se identifiquem diferentes grupos de microrganismos (Hofmann; van Strien, 2019).

Há kits comerciais de teste de ATP que podem ser facilmente adquiridos em fornecedores de laboratórios. Esses kits de teste foram projetados para serem portáteis para que a análise da amostra possa ser realizada no local. Portanto, uma indicação de atividade microbiológica (a ATP está presente em todas as células vivas) pode ser quantificada. Esta é uma ferramenta particularmente eficiente quando a indicação básica da atividade microbiológica é necessária em um prazo muito curto. O método é baseado na medição de ATP, que é um indicador direto e livre de interferências da biomassa viva total. O ATP está presente em todas as células vivas, estando envolvido no metabolismo energético. Ele desaparece rapidamente com a morte da célula e pode, portanto, ser usado como um indicador da quantidade de organismos vivos presentes em uma amostra. O ATP é medido usando o ensaio do vagalume luciferase, onde uma amostra contendo ATP é introduzida em uma solução contendo a enzima luciferase, que ocorre naturalmente nas caudas dos vagalumes, para produzir luz. A luz é detectada em um fotomultiplicador, sendo a saída proporcional à quantidade de ATP, as unidades são geralmente registradas como Unidades de Luz Relativa (Bennet, 2016).

Embora esses kits de teste sejam convenientes e rápidos, deve-se observar que há algumas desvantagens nesse método; não há diferenciação entre os vários tipos de microrganismos em uma amostra, pois todas as células vivas contêm ATP. O conteúdo de ATP de uma célula depende do volume da célula, portanto, células bacterianas maiores retornarão um número maior de ATP do que o número equivalente de células menores. O método também pode encontrar interferência de produtos químicos, como biocidas e alto teor de sulfureto (Bennet, 2016).

3.3 Métodos moleculares microbiológicos (MMM) para identificar e/ou quantificar os microrganismos

Os MMM têm sido utilizados como forma de identificar e quantificar os microrganismos presentes nos sistemas de petróleo e têm colaborado com grande auxílio nas etapas de mitigação e monitoramento da MIC. Neste item, são citados os métodos PCR (*polymerase chain reaction*), DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) e FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) apresentados no trabalho de Bennet (2016), com intuito de reunir informações pertinentes que sejam capaz de agregar valor ao estudo.

O objetivo da tecnologia de PCR é aumentar especificamente um alvo a partir de uma quantidade indetectável de material de partida em uma amostra. Como acontece com a maioria dos métodos moleculares baseados em DNA, a primeira etapa requer a extração do DNA da amostra. O próximo passo é amplificar a quantidade de DNA por meio de PCR com um *primer* (pedaços curtos de DNA de fita simples e são projetados de modo que englobem a região de interesse) que possui uma etiqueta fluorescente. Durante a termociclagem, o marcador fluorescente se acumula, que pode ser usado para quantificar o número inicial do alvo. O alvo copiado durante o processo depende do *primer* usado e pode ser adaptado para quantificar especificamente certos grupos microbianos. A molécula alvo mais comum usada para identificar microrganismos é o 16S rRNA ou o próprio gene (o DNA). O 16S rRNA provou ser uma molécula confiável para identificar microrganismos devido à sua distribuição universal (ribossomos estão presentes em todas as células vivas) e conteúdo de informação (rRNA é uma molécula altamente conservada). *Primers* específicos foram projetados para detectar uma variedade do gênero mais comumente encontrado de SRB. Os *primers* têm sido usados para demonstrar a presença de SRB em uma ampla gama de habitats diversos (Bennet, 2016).

Onde contagens viáveis das populações SRB fornecem uma estimativa do tamanho total da população, a aplicação de *primers* permite que a diversidade da população SRB seja avaliada. Isso ajuda a diferenciar entre os diferentes tipos de SRB e destaca aqueles que são capazes de sobreviver em ambientes específicos, por exemplo, apenas SRB especializado pode sobreviver após a aplicação de uma dose de biocida ou dentro de um recipiente extremamente quente (80° C). Assim que esta informação

for conhecida pelo usuário, tratamentos específicos podem ser ajustados para o sistema de processo a fim de obter o controle microbiológico. Porém, devido à natureza específica da técnica, o usuário deve saber qual destino está procurando. Isso também significa que os resultados podem retornar resultados insignificantes se o alvo não for detectado na análise, se o *primer* não encontrar um alvo (Bennet, 2016).

A DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) é outra técnica que utiliza DNA e a tecnologia de PCR para diferenciar as espécies presentes em uma comunidade a partir de uma única amostra. Os fragmentos de DNA são então transferidos para um gel gradiente desnaturante, separados com base em sua sequência de DNA. O DNA migra através do gel e as diferentes fitas de DNA presentes na amostra serão depositadas em intervalos diferentes no gel. O DNA contém quatro bases de nucleotídeos (Guanina, Citosina, Adenina e Timina) que formam pares nas duas fitas da molécula de dupla hélice. O grau de desnaturação da fita de DNA depende de sua composição de sequência de nucleotídeos (os pares de bases G-C são mais fortes do que o par A-T) e a desnaturação parcial resulta em uma diminuição da mobilidade através do gel com a formação de uma banda de DNA. A quantidade de bandas que se formam em intervalos diferentes no gel indica os diferentes DNAs presentes na amostra, o que representa a comunidade presente dentro de uma amostra (Bennet, 2016).

Um gel com poucas bandas, e uma única banda espessa, indica uma comunidade dominada por uma única espécie, e um gel com muitas bandas de intensidade semelhante indica uma comunidade diversa dentro de uma espécie. A comparação das comunidades em diferentes amostras, de diferentes locais ao longo de um sistema de processo, fornece informações valiosas sobre os ambientes ao longo do processo e como isso afeta as populações microbianas. O emparelhamento dessas informações com dados e informações operacionais ajudará a entender o que afeta as populações microbianas. Esta técnica por si só não fornece informações sobre as espécies de microrganismos contidos nas amostras (Bennet, 2016).

No entanto, como a DGGE separa os produtos por diferenças de sequência de DNA, o grau de desnaturação da fita de DNA depende de sua composição de sequência de nucleotídeos. Portanto, durante a DGGE os produtos com diferentes composições, embora com números semelhantes de pares de bases, irão migrar diferentes

distâncias através do gel quando expostos a um gradiente de condições desnaturantes. Diferentes sequências do DNA irão desnaturar em diferentes concentrações e resultar em uma impressão digital de "comunidade" distinta com bandas em diferentes posições no gel. Cada banda representa teoricamente uma população bacteriana diferente presente na comunidade. Uma vez geradas, as impressões digitais podem ser carregadas em bancos de dados nos quais a similaridade das impressões digitais pode ser avaliada para determinar as diferenças estruturais da comunidade entre locais, nichos ambientais ou antes e depois dos tratamentos (Hoffmann *et al.*, 2008).

A FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) é outra técnica microbiológica molecular que pode ser usada para identificar e quantificar microrganismos em uma amostra. A técnica requer a fixação das amostras no local, o que essencialmente preserva as informações dos microrganismos, como uma etapa de fixação é necessária, o DNA pode ser danificado, portanto, a molécula mais robusta de rRNA é o alvo desta técnica. A segunda etapa da técnica é a hibridização, onde uma sonda de DNA artificialmente marcada com uma etiqueta fluorescente é introduzida no rRNA alvo dentro de uma célula, que se ligará um ao outro se a combinação for perfeita. Isso resulta em células microbianas hibridizadas que fluorescem sob a luz ultravioleta. A técnica é muito específica, pois há uma etapa de lavagem que remove todas as sondas de DNA artificial não ligadas, que não ficarão na amostra quando colocadas sob a luz ultravioleta (Bennet, 2016).

Usando sondas marcadas com manchas de cores diferentes, é possível diferenciar entre diferentes tipos de células de bactérias na mesma amostra. A molécula alvo, rRNA, se degrada horas após a morte celular e, portanto, presume-se que apenas as células que estavam vivas no momento em que a amostra foi coletada serão enumeradas. Após a amostragem, o rRNA deve ser preservado, exigindo cuidadosa desidratação, fixação e resfriamento antes e durante o transporte para o laboratório (Hoffmann *et al.*, 2008).

Como as sondas de DNA são fabricadas artificialmente, com diferentes marcadores fluorescentes coloridos, podem ser introduzidas na amostra para detectar o alvo correspondente e quantificadas por microscopia fluorescente especializada. No entanto, devido à natureza específica das sondas artificiais de DNA, o usuário deve

saber qual o alvo que está procurando. Isso também significa que os resultados podem retornar resultados insignificantes se o alvo não for detectado na análise, se a sonda não encontrar um alvo (Bennet, 2016).

Diversos fatores afetam as taxas de corrosão microbiológica em dutos de aço carbono, por exemplo os biofilmes embebidos em lodo nos dutos que podem produzir produtos químicos que atacam os metais alterando a acidez local ou criando aeração diferencial e células galvânicas (Haile *et al.*, 2017).

Os métodos microbiológicos moleculares podem ser incorporados aos processos de avaliação das ameaças de corrosão identificando barreiras preventivas e mitigativas e monitorando a eficácia destas barreiras. Com isso, existe uma melhora da capacidade operadora de gerenciar as ameaças de MIC (Skovhus; Eckert, 2014).

Como etapa de avaliação de ameaça de corrosão cada mecanismo de potencial corrosão é avaliado separadamente em cada sistema. Nessa etapa são revisados os dados do projeto, processo, operação, tratamento químico, monitoramento de corrosão e inspeção a fim de identificar as ameaças que afetam os diferentes locais do sistema. As tubulações e circuitos são subdivididos de forma a facilitar o entendimento dos locais com diferentes condições de operações que possuem maior ou menor riscos (Skovhus; Eckert, 2014).

Os MMM são um importante método para estabelecer uma relação entre a corrosão localizada e a formação de biofilme. São usados para procurar associações entre biofilme ou sua composição com corrosão e relacionar as características do biofilme com as condições de operação. A interação entre várias ameaças de corrosão também deve ser considerada, por exemplo, o estabelecimento de biofilme pode ser aprimorado por depósitos sólidos que promovem a corrosão por subdeposição (Skovhus; Eckert, 2014).

A investigação de danos ou falhas provenientes de corrosão a partir de procedimentos laboratoriais ou análise de campo são usadas em conjunto com os MMM e quando agregam os valores corretos, a análise pragmática e integração dos dados ajudam a entender as ameaças previstas (Skovhus; Eckert, 2014).

Método (MMM)	Método baseado em	Células vivas contadas?	Células mortas contadas?	Método quantitativo?	Informação produzida
FISH	Microscopia	SIM	NÃO	SIM	Número total de bactérias vivas Número total de arqueias vivas Número total de SRB vivas Número total de SRA vivas
DGGE	PCR	SIM	SIM	NÃO	Comparação de populações Identificação de abundância Microorganismos
qPCR	PCR	SIM	SIM	SIM	Números de bactéria total Números de arqueia total Números de SRB Números de SRA Números de três grupos de metanogenos

Figura 4 - Benefícios de aplicação dos MMM para controle de MIC. Fonte: Adaptado de Skovhus; Eckert (2014)

A figura 3 ilustra a importância dos MMM para controle e investigação de MIC. Os métodos geram informações específicas acerca da quantidade de microrganismos presentes e a combinação deles é de suma importância ao identificar a comunidade de células vivas e mortas e o número total de microrganismos presentes.

Reconhecendo a limitação fundamental dos testes baseados em cultura de microrganismos, os MMM têm a vantagem de não exigir cultura e, portanto, são capazes de analisar diretamente para populações microbianas inteiras, independentemente de sua condição (Sharma *et al.*, 2019).

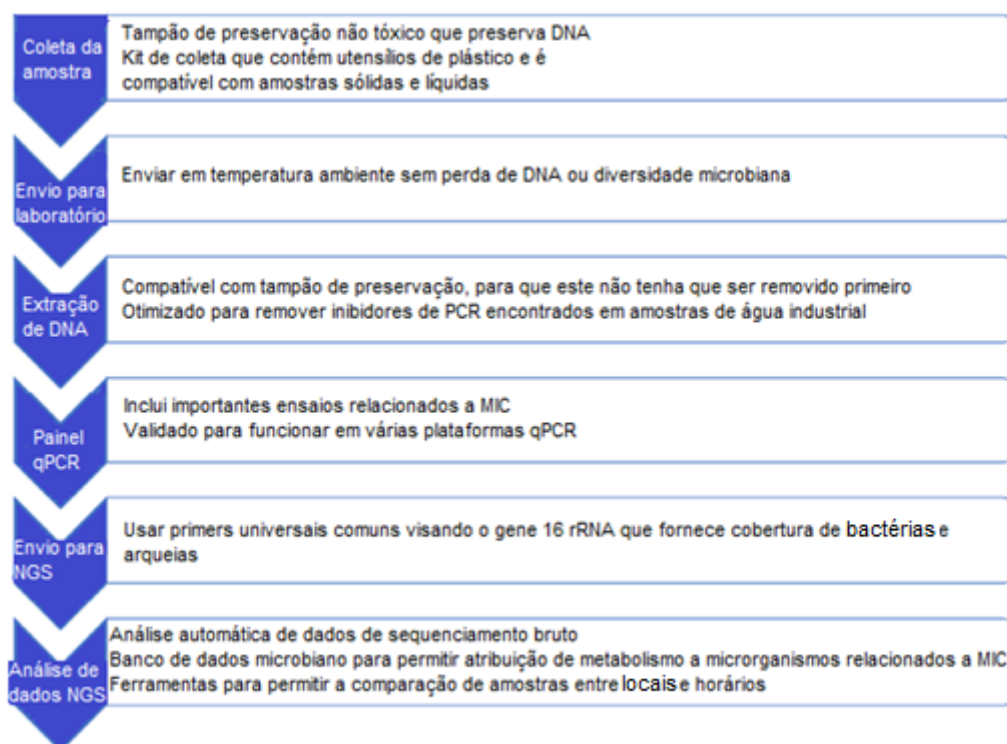


Figura 5 - Fluxograma dos MMM em testes de laboratório. Fonte: Adaptado Sharma *et al.* (2019)

A figura 4 é um fluxograma que abrange o conceito de design inicial e os requisitos de desenvolvimento do fluxo de trabalho dos laboratórios dos MMM. O fluxograma inicia a partir da coleta de dados e preservação dos mesmos até o envio deles aos laboratórios. Nos laboratórios, a informação coletada é analisada a partir da extração do DNA presente e essa informação auxilia no entendimento da MIC atuante. Posteriormente, as amostras são enviadas ao provedor de serviços de sequenciamento de próxima geração e estes usam *primers* universais visando o gene 16 rRNA que fornece cobertura de bactérias e arqueias. As informações trazidas pelo NGS são: análise online automática de dados de sequenciamento bruto, banco de dados microbiano para permitir a avaliação do metabolismo para organismos específicos relacionados à MIC e ferramentas para permitir a comparação de amostras entre locais e tempo (Sharma *et al.*, 2019).

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e sequenciamento de próxima geração (NGS)

Os testes MMM incluem vários métodos, mas os dois mais importantes hoje para o monitoramento de rotina da MIC são a reação em cadeia da polimerase quantitativa e o sequenciamento de próxima geração (NGS). O qPCR é baseado na detecção de pedaços específicos de DNA microbiano e oferece a capacidade de detectar e quantificar microrganismos chave de interesse ou grupos de microrganismos em questão de horas. A análise metagenômica baseada no gene 16s rRNA é o método NGS mais comumente usado na análise MIC. Este método NGS pode ser usado para determinar a identidade e proporção relativa de quase 100% dos microrganismos presentes em uma amostra por sequenciamento de regiões específicas do gene 16 rRNA (encontrado em todas as bactérias e arqueias) e, em seguida, comparando as seqüências de DNA encontradas com um banco de dados conhecido. Juntos, esses dois MMM podem fornecer uma visão incomparável da microbiologia dentro de um sistema, capacitando o usuário a tomar as medidas adequadas (Sharma *et al.*, 2019).

Apesar das várias vantagens dos MMM sobre outros métodos, no entanto, seu uso ainda é altamente limitado na indústria hoje devido aos altos custos de teste, dificuldades no transporte de amostras e acesso a apenas um número relativamente pequeno de laboratórios comerciais ou internos sofisticados da empresa e pessoal com recursos de teste de MMM. Sendo assim, tornar os MMM mais acessíveis à indústria é crucial para melhorar a luta global contra as MIC (Sharma *et al.*, 2019).

Os MMM podem fornecer dados altamente acionáveis. O tempo e a geografia, no entanto, frequentemente impedem que as amostras sejam processadas e testadas diretamente no campo, apesar da disponibilidade de ferramentas de análise em campo. A prática atual da indústria continua a ser o envio da maioria das amostras para análise de MMM a um laboratório externo para teste, que em alguns casos pode ser em outro país. Idealmente, essas amostras são armazenadas e enviadas em gelo em menos de 24 ou 48 horas, mas essas recomendações podem ser difíceis de seguir na prática. Isso pode resultar em problemas significativos com a qualidade dos dados, pois a população de microrganismos dentro de uma amostra pode rapidamente começar a mudar durante o transporte ou armazenamento, resultando potencialmente

em resultados de MMM que não são precisamente representativos da amostra real (Sharma *et al.*, 2019).

Identificar as espécies microbianas em um defeito de MIC é possível nos dias de hoje usando a ferramenta molecular de última geração NGS. Em combinação com a análise de dados correta, ela fornece informações sobre todas as espécies conhecidas na amostra. Com o conhecimento especializado correto sobre as espécies, isso fornece um *bioprofiling* (perfil da microbiologia). Uma desvantagem da técnica de *bioprofiling* é que ela é relativamente demorada, cara e retorna listas extensas de espécies, incluindo espécies não cultivadas. Uma segunda desvantagem é que a metodologia NGS por si só introduz um viés devido às muitas etapas de processamento. Portanto, o método NGS não é um método quantitativo confiável. Consequentemente, como ferramenta de monitoramento repetitiva, a *bioprofiling* não é adequada. (Geurkink *et al.*, 2016).

De maneira oposta, a qPCR é um método quantitativo rápido e confiável para detectar a quantidade de bactérias específicas em uma população, no entanto, a maioria das análises de qPCR são baseadas em alvos predefinidos. A seguir é mostrada a aplicação de uma nova metodologia na qual a informação recuperada do método NGS é usada para projetar *primers* de PCR específicos para desenvolver a análise qPCR quantitativa. A Figura 5 ilustra o fluxo esquemático de como uma análise MIC específica do ambiente feita sob medida pode ser desenvolvida usando *bioprofiling* e qPCR. Esse pacote de MIC feito sob medida será fundamental para monitorar o desenvolvimento de biofilmes em superfícies de metal ao longo do tempo e usar essas informações para uma avaliação adequada da ameaça de MIC (Geurkink *et al.*, 2016).

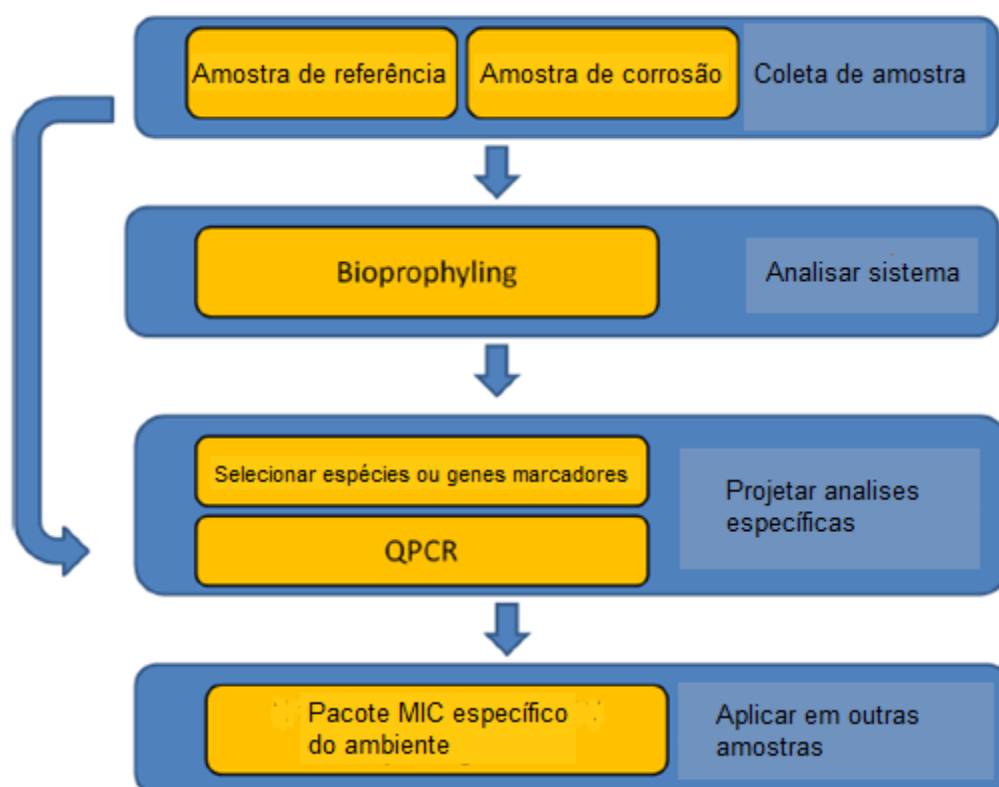


Figura 6 - Esquematização da técnica de bioprofiling. Fonte: Adaptado de Geurkink *et al.* (2016)

O uso da metodologia NGS em amostras ambientais retornará inerentemente não apenas nomes de espécies conhecidas, mas também bactérias não cultivadas, que representam a coleção de bactérias que foram detectadas em uma amostra particular por isolamento e sequenciamento de material de DNA. As bactérias não cultivadas não são caracterizadas e sua função em um ambiente pode ser extrapolada de seus parentes mais próximos. Usando o conhecimento dos parentes mais próximos conhecidos, é desenvolvido um *bioprofiling* que inclui o possível comportamento da comunidade microbiana em um ambiente. No entanto, dados quantitativos são necessários para construir uma previsão precisa da contribuição de cada uma das espécies identificadas em um ambiente. A análise qPCR pode ser desenvolvida não apenas nas espécies exatas no sistema, mas também em grupos maiores de espécies, ou nas próprias espécies não cultivadas. Isso permite detectar grupos de espécies que não são encontradas com base em análises específicas para espécies conhecidas específicas, mas com base no conhecimento sobre as espécies conhecidas e cultivadas relacionadas mais próximas (Geurkink *et al.*, 2016).

Desta forma, os alvos podem ser selecionados que são suspeitos de estarem envolvidos na MIC no ambiente específico. Comparar a amostra de controle do ambiente circundante com a população microbiana nos defeitos de corrosão torna possível selecionar aquelas espécies que estão presentes em alta abundância e provavelmente têm crescido especificamente no defeito de corrosão e, portanto, estão provavelmente envolvidas na MIC (Geurkink *et al.*, 2016).

3.4 Controle e monitoramento

A utilização dos métodos moleculares microbiológicos como uma etapa do processo de gerenciamento de MIC envolve benefícios diretos nas fases de avaliação de ameaças, seleção de medidas de mitigação e no monitoramento das barreiras mitigativas escolhidas. Para as fases de avaliação de ameaças os testes caracterizam as condições microbiológicas de linha de base, encontram associações entre o biofilme, sua formação e corrosão e ainda relacionam as características do biofilme com as condições operacionais. Como seleção de medidas de mitigação, os métodos avaliam o efeito das medidas de mitigação candidatas sobre corrosão e biofilme e auxiliam na seleção de biocidas ou produtos químicos que possam ser empregados. Além disso, os testes MMM auxiliam no monitoramento dos efeitos de curto e longo prazo da mitigação do biofilme, das mudanças na eficácia química e das mudanças nas populações microbiológicas presentes (Skovhus; Eckert, 2014).

Separar as contribuições das características abióticas e bióticas ambientais e de superfície em relação à corrosão é talvez o aspecto mais desafiador do gerenciamento de MIC, uma vez que não existe um método único que pode fornecer informações adequadas para discernir completamente o mecanismo de corrosão predominante. Normalmente, é necessária a integração de dados de monitoramento microbiológico e de corrosão (Skovhus; Eckert, 2014).

Com a introdução de métodos de microbiologia molecular independente de cultura, tornou-se possível monitorar adequadamente os números microbianos e a atividade microbiana em dutos e fluxos de processo. A aplicação de MMM permite a otimização aprimorada de estratégias de mitigação de MIC (por exemplo, tratamentos com biocidas) e monitoramento de MIC (Larsen *et al.*, 2010).

Avanços recentes nas técnicas de medição microbiológica possibilitaram determinar o número de diferentes microrganismos relacionados à MIC nas superfícies metálicas com boa precisão. A produção de modelos qualitativos para avaliar o risco de MIC com base no número de procaríotos redutores de sulfato (SRP) através de programas de vigilância permite aos operadores transformar os números em uma avaliação de risco objetiva e direta (Sørensen *et al.*, 2012).

Testes modernos como qPCR são capazes de medir a quantidade de diferentes grupos de microrganismos com tamanha precisão e combinando esses números com conhecimento de taxas metabólicas específicas da célula, pode-se calcular quanto de ferro a atividade microbiana é capaz de remover (Sørensen *et al.*, 2012).

A vantagem entre os testes de qPCR sobre o teste PCR tradicional é que ele oferece maior precisão e reprodutibilidade dos microrganismos e determina a abundância destes em diferentes amostras complexas. O qPCR quantifica os produtos na fase logarítmica das reações e oferece uma faixa de detecção de 6 ordens de magnitude, além de não precisar de manipulação pós PCR, garantindo um alto rendimento de análise (Zhu *et al.*, 2005).

A realização de atividades de medição suplementares por transcrição reversa de PCR pode aprimorar os resultados da modelagem e obter informações mais detalhadas sobre os riscos associados à MIC. Porém, os métodos de avaliação por transcrição reversa de PCR são mais caros e requerem maior atenção nos protocolos de amostragem, o que pode limitar seu uso nas rotinas de vigilância (Larsen *et al.*, 2013).

No trabalho proposto Larsen *et al.*, (2013) é apresentado um caso em que a enumeração de células realizadas durante um monitoramento de rotina indicou que dois oleodutos apontavam riscos de MIC. Medições subsequentes confirmaram os riscos para um dos dutos, mas não para o outro. Isso indica que o monitoramento pode ser realizado a um custo mínimo, mostrando os possíveis riscos da MIC e possibilitando medidas prévias para evitar danos maiores.

A análise NGS provê informações compreensivas a respeito da estrutura da comunidade microbiológica em questão e deste modo, um conjunto de dados mais completo pode ser produzido a fim de elucidar vias microbiológicas para corrosão. Portanto, desenvolvimento e aplicação de NGS determinam o quão robusto o método

é e assim se beneficiar da informação coletada para um melhor entendimento de como mitigar ameaças microbiológicas na produção de petróleo (Thomsen; Oehler, 2018).

A primeira etapa em qualquer programa de avaliação de MIC é conduzir um estudo de linha de base inicial para criar um mapa da distribuição microbiana e indicar possíveis "pontos quentes" de MIC. Uma combinação de métodos microbiológicos moleculares quantitativos e qualitativos é normalmente usada neste exercício de mapeamento, a fim de obter uma boa compreensão da estrutura da comunidade microbiana, os organismos dominantes, suas atividades e taxas de crescimento (Poulsen *et al.*, 2016).

O principal objetivo desse mapeamento é estabelecer um programa de monitoramento microbiológico adequado e apropriado. As vantagens críticas de usar MMM para um exercício de mapeamento são que a amostragem é um processo fácil, nenhuma análise é necessária no local e as amostras podem ser simplesmente preservadas no local. A análise pode ser realizada no laboratório a qualquer momento desde então, uma vez que o DNA é relativamente estável nas condições certas, permitindo o armazenamento de amostras por longos períodos (Poulsen *et al.*, 2016).

Os resultados do mapeamento microbiano inicial são usados para projetar um programa de monitoramento abrangente, com locais, frequências, tipos de amostra e métodos de análise especificados. Materiais de superfícies, que estão sujeitos à colonização e formação de biofilme (como cupons de corrosão, superfícies de parede de tubos e detritos de *pigging*) são as amostras mais apropriadas para avaliação MIC. No entanto, quando essas amostras de biofilme não estão disponíveis, a análise de outras matrizes (como água e petróleo bruto) pode ser usada, tornando esta abordagem de MMM muito flexível. As amostras de água podem, por exemplo, ser usadas para obter informações claras sobre os processos de MIC e, portanto, podem ser utilizadas para identificar áreas com uma alta ameaça de MIC para que os esforços de mitigação possam ser direcionados (Poulsen *et al.*, 2016).

Quando uma análise microbiana adequada é conduzida do sistema, o nível de ameaça do MIC pode ser avaliado de forma confiável através do desenvolvimento e aplicação de um banco de dados empírico, complementado por um modelo mecanístico de organismos corrosivos. O banco de dados avalia o número de

microrganismos em relação a sistemas semelhantes (de preferência, usando dados históricos do sistema de estudo), fornecendo uma relação empírica entre os dados do sistema e a ameaça do MIC (Poulsen *et al.*, 2016).

Com base nesta ferramenta, é possível fornecer uma avaliação "semáforo" (vermelho / amarelo / verde) da ameaça, por comparação das amostras com os dados de muitos sistemas semelhantes. Além disso, um modelo mecanístico que traduz a números em um fator de risco pode ser aplicado. Com base em um modelo de metabolismo microbiano, transporte de elétrons de superfícies metálicas e um cálculo do processo de corrosão motriz, este modelo também pode produzir uma taxa de corrosão estimada e uma indicação do tempo calculado antes da corrosão. No geral, essas ferramentas de avaliação tornam possível traduzir o número de organismos indicadores chave em um mapa de ameaças de um determinado sistema, indicando especificamente onde o risco e a ameaça MIC são maiores (Poulsen *et al.*, 2016).

Uma vez que a ameaça do MIC é conhecida, as medidas de mitigação do MIC podem ser justificadas, direcionadas, selecionadas, otimizadas e validadas para áreas críticas e de alto risco. As medidas de mitigação são muito específicas do sistema e podem incluir a aplicação de biocidas químicos, o que requer testes para seleção química e definição da melhor taxa de dose, tempo de contato e frequência. Os regimes de dosagem especial também podem ser avaliados durante esse programa, como dosagem contínua, lote estendido, alta concentração e tratamento por pulso. Além do tratamento biocida, limpeza física, revestimento interno in-situ, modificação do fluxo do processo ou, em casos extremos, pode ser apropriado considerar a troca de materiais por ligas resistentes à corrosão (Poulsen *et al.*, 2016).

Finalmente, qualquer programa de mitigação de MIC precisa ser testado em campo de forma eficaz e monitorado de perto, para determinar como o fator de risco de MIC muda e para otimizar o programa de controle de MIC. Os MMM são ideais para a otimização de laboratório e campo de medidas de mitigação de MIC, uma vez que geram dados precisos e rápidos. Para muitos sistemas, a MIC é uma ameaça significativa e a integração do monitoramento e das avaliações de ameaças da MIC nos sistemas de gerenciamento de corrosão existentes é desejável. Isso garante que estratégias eficazes de mitigação de MIC possam ser justificadas e implementadas, particularmente no que diz respeito à necessidade de introduzir boas alternativas às

práticas atuais, como revestimento, limpeza e novas tecnologias de tratamento químico (Poulsen *et al.*, 2016).

A figura 6 representa um sistema de monitoramento das técnicas de mitigação e remediação usando os métodos qPCR, ATP e MPN. Pode-se perceber que a utilização de diversos métodos integrados é a maneira mais eficaz de se estabelecer o risco causado pelos microrganismos.

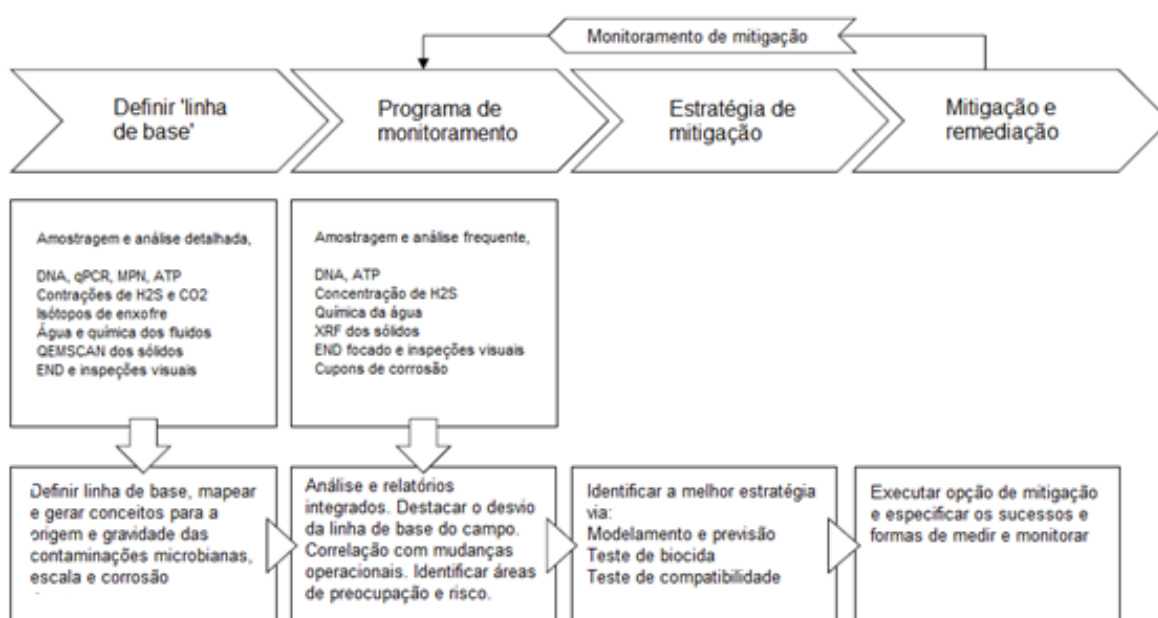


Figura 7 - Monitoramento de mitigação. Fonte: Adaptado de Hofmann; van Strien (2019)

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO

Com base nas informações coletadas a respeito dos diversos métodos estudados, foi elaborada uma discussão que avalia e compara as principais vantagens e desvantagens dos métodos.

4.1 Métodos moleculares microbiológicos (MMM)

No passado, a ênfase estava na enumeração de certos grupos microbianos, que se acreditava serem as principais espécies responsáveis pela MIC (normalmente SRB). Em muitos sistemas corroídos, as SRB foram encontradas, mas também foram observados em áreas não corrosivas ou às vezes nem detectados, enquanto as características de corrosão estavam claramente relacionadas à MIC. A ênfase na enumeração desses SRB foi parcialmente devido ao fato de que MPN foi, por muitos anos, o único método microbiano disponível para monitorar a MIC e métodos para detectar todas as espécies não estavam disponíveis ou eram economicamente inviáveis (Hofmann; van Strien, 2019).

Com o advento dos MMM, tornou-se possível escanear uma amostra e identificar todas as espécies presentes (vivas ou mortas) em um tempo razoável e a um custo plausível. Não é mais necessário tentar manter os micróbios vivos para realizar testes de cultura viva para estabelecer suas características. Isso costumava ser difícil, considerando que algumas espécies sobrevivem apenas nas condições mais exóticas nas profundezas do solo (em altas temperaturas e pressões, privado de oxigênio, em uma ampla faixa de salinidades e pH) (Hofmann; van Strien, 2019).

Os MMM já reformularam nossa compreensão dos processos microbianos na indústria de óleo e gás. Agora sabemos que muitas outras espécies estão envolvidas na MIC, que elas podem causar danos em uma gama muito mais ampla de condições (temperaturas, salinidades, composições de fluidos) e que a biodiversidade em reservatórios e biofilmes é muito maior do que se pensava originalmente (Hofmann; van Strien, 2019).

Nos últimos anos, houve avanços tremendos nos métodos de análise de DNA. Vários MMM como DGGE, qPCR e NGS foram desenvolvidos. Atualmente, o NGS está se tornando o método de análise de DNA mais versátil e amplamente usado (Hofmann; van Strien, 2019).

4.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A partir da análise dos dados contidos na figura 7, percebe-se que qPCR é atualmente o método mais confiável para detectar e quantificar microrganismos de interesse em um curto período. Quando comparado com os testes ATP e MPN, é o único teste capaz de fornecer dados a respeito de diferenciação e enumeração de bactérias e arqueias, enquanto os outros dois testes trazem apenas informações a respeito de atividade microbiológica e enumeração de células vivas, respectivamente. Porém, em termos monetários, qPCR representa gastos até dez vezes em relação ao MPN e cinco vezes maiores em comparação ao ATP.

O método qPCR também leva vantagem quando comparado com DGGE, uma vez que provém dados avançados em relação à identificação dos microrganismos presentes e é realizado em um período muito mais curto e quando comparado com a técnica FISH, observa-se menor custo, um prazo maior e não necessita de provas selecionadas para identificação dos microrganismos.

Técnica	Custo estimado por amostra (USD)	Habilidade desejada (1-3, baixo a altamente treinado)		Tempo de resposta	Retorno de dados
		Amostragem	Análise		
<i>Adenosine Triphosphate (ATP)</i>	\$100	1	2	10 minutos	Atividade microbiológica
<i>Most Probable Number (MPN)</i>	\$50	1	2	28 dias	Enumeração de células vivas
<i>qPCR</i>	\$500	1	3	10 dias	Diferenciação e enumeração de bactérias e arqueias
<i>DGGE</i>	\$500	1	3	2 meses	Representação de comunidade de microrganismos
<i>FISH</i>	\$800	2	3	5 dias	Diferenciação de bactérias e arqueias de provas selecionadas e enumeração

Figura 8 - Comparação de técnicas usadas para análise microbiológica no setor petrolífero. Fonte: Adaptada de Bennet (2016)

A tabela 1 traz informações a respeito das vantagens e desvantagens na utilização dos métodos ATP, MPN e qPCR e uma breve descrição de como são realizados. A partir de sua análise, pode-se perceber que mesmo sendo mais caros, os testes qPCR em comparação com os outros dois, é significativamente mais eficaz devido ao fato de não somente detectar microrganismos não cultiváveis, como também quantificá-los e identificá-los.

Tabela 1 – Comparação de técnicas de monitoramento de corrosão microbiológica. Fonte: Adaptado de Moore *et al.* (2019)

Método	Descrição	Vantagens	Desvantagens
ATP	Ensaio de luminescência projetado para detectar o nível do metabólito ATP em uma amostra	<ul style="list-style-type: none"> Resultados rápidos Cada vez mais comum no setor Pode detectar microrganismos não cultiváveis Leitura simples 	<ul style="list-style-type: none"> Leituras de alto ATP não se correlacionam necessariamente com organismos problemáticos Difícil diferenciar entre alta população e metabolismo ativo Propriedades químicas ou físicas

			<p>da amostra podem interferir com o ensaio</p> <ul style="list-style-type: none"> Alta probabilidade de falsos positivos de organismos problemáticos
MPN	Técnica baseada em cultura de alto rendimento usando placas de microtitulação e mídia altamente rica em nutrientes	<ul style="list-style-type: none"> Pode ser empregado em quase todas amostras A facilidade de replicação permite uma quantificação mais precisa 	<ul style="list-style-type: none"> Pode não cultivar organismos problemáticos Ensaio de microtitulação difícil de realizar no campo
qPCR	Replicação e medição de DNA para quantificação de organismo	<ul style="list-style-type: none"> Pode detectar microrganismos não cultiváveis Pode ser customizado para identificar organismos específicos ou processos metabólicos 	<ul style="list-style-type: none"> Caro Requer treinamento e equipamentos especializados Requer controle de qualidade extenso Atualmente difícil de executar no campo

4.3 Sequenciamento de próxima geração (NGS)

Os NGS, com sua abordagem não direcionada, flexibilidade e tempo de resposta rápido fornece atualmente a ferramenta mais econômica para monitorar as culturas microbianas no reservatório e nas instalações. (Hofmann; van Strien, 2019).

Com a utilização de MMM como NGS, podemos agora identificar quantas espécies diferentes estão presentes na água que viaja através do sistema e se essas espécies

específicas são susceptíveis de formar as vias metabólicas simbióticas presentes em um biofilme bem desenvolvido. (Hofmann; van Strien, 2019).

Uma desvantagem desta abordagem "não direcionada" de NGS é a de que, quando o DNA de certos micróbios alvo apenas forma uma pequena parte do *pool* de DNA microbiano total, esses micróbios podem ser negligenciados (ou seja, não copiados o suficiente pelo método de PCR). Por esta razão, *primers* especiais foram desenvolvidos que focam o sequenciamento NGS em grupos específicos de micróbios, como os SRB. (Hofmann; van Strien, 2019).

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista o grande impacto econômico que a corrosão microbiológica traz para a indústria de petróleo, faz-se necessária a utilização de métodos de monitoramento e controle, com o objetivo de mitigar seus danos. Por ser um processo complexo, mediado por diversos tipos de microrganismos diferentes, devem ser analisados não somente os tipos de microrganismos presentes, como também a estrutura do biofilme formado, pois acredita-se que cada estrutura é totalmente única.

Para melhor entendimento sobre a MIC, deve-se estudar primeiramente a comunidade microbiana em questão, levando em consideração que são culturas extremamente complexas, que quando submetidas ao ambiente propício, caso dos sistemas de petróleo fornecedores de nutrientes e condições apropriadas, são capazes de se desenvolver na interface dos dutos formando biofilmes após embeber-se em lodo.

Com foco na investigação dos microrganismos presentes, os métodos moleculares microbiológicos (MMM) abrangem diversas aplicações, com o intuito de estabelecer a relação entre corrosão e biofilme, entender e mensurar as ameaças previstas, fornecer uma visão da microbiologia do sistema, capacitando a tomada de decisão mais adequada.

Novos métodos, mais abrangentes, precisos e rápidos vem sendo desenvolvidos para quantificar e estudar a MIC e estão mostrando seu potencial de gerar informações valiosas a respeito das operações em sistemas petrolíferos. Os MMM são ideais para fases de investigação de MIC e suas principais vantagens são: detectar uma vasta gama de microrganismos, protocolos relativamente simples, com amostras estáveis e adequadas para qualquer etapa de investigação de MIC.

Portanto, o passo crucial para criar um sistema de monitoramento e controle da corrosão microbiológica é a aplicação dos MMM visando compreender qual ou quais microrganismos estão sendo responsáveis por esta corrosão e, a partir dessa informação, identificar a melhor estratégia de mitigação.

Necessita-se definir uma linha de base, mapear o local de risco, conhecer a origem e a gravidade do risco envolvendo corrosão. Com auxílio dos testes anteriormente

citados, cria-se uma análise integrada em correlação com possíveis mudanças operacionais e são identificadas as áreas de risco.

O último passo é definir uma estratégia e executar as opções de mitigação viáveis como: teste de biocida, teste de compatibilidade, modelamento e previsão. Por fim, é de suma importância que os mecanismos de mitigação que obtiveram sucesso sejam especificados, assim como as melhores formas de monitorar e medir.

5.1 CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO

Este trabalho apresentou dados obtidos por meio de uma revisão da literatura acerca dos principais métodos de avaliação de risco e investigação de MIC na indústria de óleo e gás. Os métodos estudados são capazes de identificar e quantificar os microrganismos de maneira que seja possível a partir desta informação, utilizar e monitorar as melhores barreiras mitigativas empregadas.

Visto que a corrosão microbiológica gera um grande impacto econômico na indústria de petróleo e gás, estudos para melhorias e aprimoramento de métodos moleculares microbiológicos implica em um conhecimento que pode ser utilizado diretamente na área, facilitando as possíveis previsões e realizando estimativas para os casos reais.

5.2 TRABALHOS FUTUROS

Por serem as técnicas mais recentes e com maior destaque na área de sequenciamento genético, os métodos qPCR e NGS atingiriam melhores resultados caso obtivessem maiores informações de seus usos em campo.

Como trabalhos futuros, sugere-se estudar a implementação do NGS em avaliações/análises de risco MIC quantitativas além de aprimorar estudos sobre o comportamento integrado dos MMM e como isso pode ser benéfico para um sistema de avaliação de risco de MIC.

REFERÊNCIAS

AL MUAISUB, Mohammed. Is it MIC or Pitting Corrosion? An Insight in a Common Overlapping. *In: 2020, Anais [...]. . In: CORROSION 2020. : OnePetro, 2020. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR20/All-CORR20/NACE-2020-14719/446034>. Acesso em: 6 jan. 2022.*

BENNET, Douglas G. Oilfield Microbiology: Detection Techniques Used in Monitoring Problematic Microorganisms Such as Sulphate-Reducing Bacteria SRB. *In: 2016, Anais [...]. . In: OFFSHORE TECHNOLOGY CONFERENCE ASIA. : OnePetro, 2016. DOI: 10.4043/26788-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/OTCASIA/proceedings/16OTCA/1-16OTCA/D011S004R003/85537>. Acesso em: 24 nov. 2021.*

DENVIR, Adrian; VELA, David; DELEGARD, Angela. Biofilms in Industrial Water Systems: Metagenomic Insight on Biofilm Populations from a New Real-Time Biomonitoring System. *In: 2019, Anais [...]. . In: CORROSION 2019. : OnePetro, 2019. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR19/All-CORR19/NACE-2019-13504/127546>. Acesso em: 18 nov. 2021.*

EMMANUEL, J. I.; SHAPER, T. T. Sulphate Reducing Bacteria SRB Control and Risk Based SRB Severity Ranking. *In: DAY 4 THU, NOVEMBER 15, 2018 2018, Abu Dhabi, UAE. Anais [...]. . In: ABU DHABI INTERNATIONAL PETROLEUM EXHIBITION & CONFERENCE. Abu Dhabi, UAE: SPE, 2018. p. D041S096R004. DOI: 10.2118/192938-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/SPEADIP/proceedings/18ADIP/4-18ADIP/Abu%20Dhabi,%20UAE/213396>. Acesso em: 11 nov. 2021.*

GEURKINK, Bert; DODDEMA, Sabine; DE VRIES, Herman; EUVERINK, Gert Jan; CROESE, Elsemiek. Value of Next Generation Sequencing as Monitoring Tool For Microbial Corrosion - A Practical Case from Bioprophyling to Tailor made MMM Analysis. *In: 2016, Anais [...]. . In: CORROSION 2016. : OnePetro, 2016. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR16/All-CORR16/NACE-2016-7764/123795>. Acesso em: 22 set. 2021.*

HAILE, Tesfaalem; KIESMAN, Danielle; CROSBY, Tamer; PLACE, Trevor; SARGENT, Jennifer; WOŁODKO, John. Assessment of Microbially Influenced Corrosion Threats using Molecular Microbiological Methods. *In: 2017, Anais [...]. . In: CORROSION 2017. : OnePetro, 2017. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR17/All-CORR17/NACE-2017-9384/125589>. Acesso em: 25 jul. 2021.*

HOFFMANN, Heike; DEVINE, Carol; MAXWELL, Stephen. Application Of Dgge And Fish Analyses In Seawater Injection Systems. *In: 2008, Anais [...]. . In: CORROSION 2008. : OnePetro, 2008. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR08/All-CORR08/NACE-08513/119068>. Acesso em: 26 nov. 2021.*

HOFFMANN, Heike; SPARK, Iain. Injection Seawater versus Produced Water SRB and Archaea Populations in Oilfield Systems. *In: ALL DAYS 2012, Aberdeen, UK.*

Anais [...]. . *In*: SPE INTERNATIONAL CONFERENCE & WORKSHOP ON OILFIELD CORROSION. Aberdeen, UK: SPE, 2012. p. SPE-155101-MS. DOI: 10.2118/155101-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/SPEOFCS/proceedings/12OFCS/All-12OFCS/Aberdeen,%20UK/158220>. Acesso em: 10 nov. 2021.

HOFMANN, Andreas; VAN STRIEN, Willem J. MAINTAINING WELL & FACILITY HEALTH – THE APPLICATION OF DNA ANALYSIS TO CORROSION AND BIO-FOULING PREVENTION. [S. l.], p. 13, [s.d.].

ISLAM, Moavin; AL-SHAMARI, Abdul Razzaq; AL-SULAIMAN, Saleh; PRAKAS, Surya; JARAGH, Amer; ABRAHAM, Shibu. Characteristic Corrosion Morphological Features Associated with Different Strains of Bacteria Species in Oilfield Waters. *In*: 2016, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2016. : OnePetro, 2016. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR16/All-CORR16/NACE-2016-7365/123632>. Acesso em: 6 jan. 2022.

LARSEN, Jan; RASMUSSEN, Kim; PEDERSEN, Heidi; SØRENSEN, Ketil; LUNDGAARD, Thomas; SKOVHUS, Torben Lund. Consortia Of Mic Bacteria And Archaea Causing Pitting Corrosion In Top Side Oil Production Facilities. *In*: 2010, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2010. : OnePetro, 2010. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR10/All-CORR10/NACE-10252/126870>. Acesso em: 22 set. 2021.

LARSEN, Jan; SØRENSE, Ketil Bernt; JUHLER, Susanne; PEDERSEN, Dorthe Skou. The Application of Molecular Microbiological Methods for early Warning of MIC in Pipelines. *In*: 2013, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2013. : OnePetro, 2013. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR13/All-CORR13/NACE-2013-2029/121267>. Acesso em: 26 jul. 2021.

LIU, Tao; CHENG, Y. Frank; SHARMA, Mohita; VOORDOUW, Gerrit. Effect of fluid flow on biofilm formation and microbiologically influenced corrosion of pipelines in oilfield produced water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [S. l.], v. 156, p. 451–459, 2017. DOI: 10.1016/j.petrol.2017.06.026.

MAND, Jaspreet; LONGWELL, John; ENNING, Dennis. Observations on the Effect of Simulated Pigging and Corrosion Inhibitor Exposure on Microbiologically Influenced Corrosion of Carbon Steel. *In*: 2019, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2019. : OnePetro, 2019. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR19/All-CORR19/NACE-2019-13103/127278>. Acesso em: 22 set. 2021.

MOORE, Joseph; MASSIE-SCHUH, Ella; WUNCH, Kenneth; MANNA, Kathleen; DALY, Rebecca; WILKINS, Michael; WRIGHTON, Kelly. Insights into Effective Microbial Control Through a Comprehensive Microbiological Audit of Hydraulic Fracturing Operations. *In*: 2019, **Anais** [...]. . *In*: SPE INTERNATIONAL CONFERENCE ON OILFIELD CHEMISTRY. : OnePetro, 2019. DOI: 10.2118/193606-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/SPEOCC/proceedings/19OCC/2-19OCC/D021S009R001/219203>. Acesso em: 24 nov. 2021.

POULSEN, Morten; SANDERS, Peter Frank; THOMSEN, Uffe Sognstrup; LUNDGAARD, Thomas. Use of Advanced Molecular Microbiology Methods to Manage Microbial Corrosion Issues in Topsides Facilities. *In*: DAY 3 WED, NOVEMBER 09,

2016 2016, Abu Dhabi, UAE. **Anais** [...]. . *In*: ABU DHABI INTERNATIONAL PETROLEUM EXHIBITION & CONFERENCE. Abu Dhabi, UAE: SPE, 2016. p. D031S081R003. DOI: 10.2118/183526-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/SPEADIP/proceedings/16ADIP/3-16ADIP/Abu%20Dhabi,%20UAE/186152>. Acesso em: 21 nov. 2021.

SHARMA, Neil; TECHNOLOGIES, LuminUltra. Expanding Industry Access to Molecular Microbiological Methods: Development of an Off-the-Shelf Laboratory Workflow for qPCR and NGS Analysis. [*S. l.*], p. 15, [s.d.].

SKOVHUS, Torben Lund; ECKERT, Richard Bruce. Practical Aspects of MIC Detection, Monitoring and Management in the Oil and Gas Industry. *In*: 2014, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2014. : OnePetro, 2014. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR14/All-CORR14/NACE-2014-3920/122998>. Acesso em: 26 jul. 2021.

SØRENSEN, Ketil Bernt; THOMSEN, Uffe Sognstrup; JUHLER, Susanne; LARSEN, Jan. Cost Efficient MIC Management System Based On Molecular Microbiological Methods. *In*: 2012, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2012. : OnePetro, 2012. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR12/All-CORR12/NACE-2012-1111/119789>. Acesso em: 22 set. 2021.

THOMSEN, Uffe Sognstrup; OEHLER, Mike Christian. A Combination of qPCR, RT-qPCR and NGS Provides a New Tool for Analyzing MIC Risk in Pipelines. *In*: 2018, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2018. : OnePetro, 2018. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR18/All-CORR18/NACE-2018-11103/126043>. Acesso em: 21 nov. 2021.

ZHONG, Huiyun; SHI, Zhiming; JIANG, Guangming; SONG, Yarong; YUAN, Zhiguo. Development of microbially influenced corrosion on carbon steel in a simulated water injection system. **Materials and Corrosion**, [*S. l.*], v. 70, n. 10, p. 1826–1836, 2019. DOI: 10.1002/maco.201910873.

ZHU, Xiangyang; KILBANE, John; AYALA, Alvin; MODI, Hetal. Application of Quantitative, Real-Time PCR in Monitoring Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) in Gas Pipelines. *In*: 2005, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2005. : OnePetro, 2005. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR05/All-CORR05/NACE-05493/115402>. Acesso em: 25 jul. 2021.

Universidade de São Paulo

Engenharia de Petróleo – Escola Politécnica

Número: 9853144 USP

Data: 26/11/2021



CONTROLE E MONITORAMENTO DE CORROSÃO MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO: UMA REVISÃO DA LITERATURA

Pedro de Sá Teixeira

Orientador: Prof. Jean Vicente Ferrari

Artigo Sumário referente à disciplina PMI3349 – Trabalho de Conclusão de Curso II

Este artigo foi preparado como requisito para completar o curso de Engenharia de Petróleo na Escola Politécnica da USP. Template versão 2021v01.

Resumo

A corrosão microbiológica é responsável por parte das falhas de dutos no setor de petróleo e gás. Este tipo de corrosão está associado com as mais diversas culturas microbianas, tendo ênfase principalmente nas bactérias sulfato redutoras. Colônias complexas de microrganismos, chamadas biofilme, após se depositarem e aderirem a uma superfície de contato, mantidos pela secreção gelatinosa protetora, ou lodo, iniciam seu crescimento nos dutos. Esta é uma etapa crucial dos processos de corrosão microbiológica e as formações e estruturas dos biofilmes indicam que cada colônia é totalmente única. Com o intuito de mitigar a corrosão microbiológica no setor petrolífero, deve-se primeiramente avaliar com precisão e rapidez a colônia microbiana estudada. Para isso, os métodos moleculares microbiológicos estão se aprimorando com novas tecnologias com o objetivo de detectar e analisar os genes permitindo uma caracterização detalhada e precisa dos microrganismos. Com o uso dos métodos de sequenciamento genético, torna-se possível compreender a formação do biofilme e investir pontualmente no mecanismo de mitigação de corrosão adequado.

Palavras-chave: Corrosão microbiológica, Métodos moleculares microbiológicos, Biofilme.

Abstract

Microbiologically influenced corrosion accounts for nearly half of the pipeline failures in the oil and gas industry. This type of corrosion is associated with a wide variety of microbial cultures, emphasizing on sulfate-reducing bacteria. Complex colonies of microorganisms called biofilms begin their growth in pipes after deposition and attachment to a contact surface maintained by a protective gelatinous secretion or slime. This is a crucial step in microbiologically influenced corrosion processes and the formations and structures of biofilms show that each community is unique. The microbial colonies under study must be first accurately and rapidly assessed to contain microbiological corrosion in the oil sector. To this end, microbiological molecular methods are being improved with new technologies to detect and analyze genes that allow detailed and precise characterization of microorganisms. Using genetic sequencing methods makes it possible to understand the formation of biofilms and invest in the appropriate mechanism for corrosion control on time.

Keywords: microbiologically influenced corrosion, Molecular Microbiological Methods, Biofilm.

1. Introdução

A corrosão microbiológica (MIC) tem sido um dos grandes responsáveis por falhas nos dutos do setor de óleo e gás e associa todas as formas de corrosão que podem ser ocasionadas por microorganismos (Zhong *et al.*, 2019). A presença e atividade microbiana é responsável direta por problemas econômicos severos, atrelados à deterioração do produto, corrosão do metal, incrustação biológica, acidificação e obstrução. A MIC é a consequência da atividade microbiana mais difundida, devido a seu potencial de corrosão rápido e localizado sendo encarregada de prejuízos tanto econômicos quanto ambientais e quando não é controlada, pode resultar em paradas inesperadas da produção, impacto ambiental devido a vazamentos, grandes reparos não planejados e aumento dos custos de tratamento químico (Poulsen *et al.*, 2016).

A formação do biofilme depende de diversos fatores como: tipo de microorganismos envolvido, características específicas dos dutos e condições ambientais favoráveis. As bactérias redutoras de sulfato (SRB) são as mais comumente atreladas aos danos causados no setor de óleo e gás e são responsáveis por acelerar os processos corrosivos a partir da redução do sulfato (Sørensen *et al.*, 2012).

Como tentativa de impedir o crescimento do biofilme e conseqüentemente da corrosão em dutos, foram criados métodos de monitoramento e controle capazes de analisar o desenvolvimento da cultura de microorganismos a fim de intervir em casos de necessidade (Liu *et al.* 2017).

Durante a avaliação da ameaça de corrosão, a probabilidade de cada mecanismo corrosivo em potencial é avaliada em cada sistema e circuito. Nesta etapa, os engenheiros responsáveis pela avaliação da corrosão revisam os dados de projeto, processo, operação, tratamento químico, monitoramento de corrosão e inspeção para ajudar a identificar as prováveis ameaças de corrosão que afetam diferentes locais do sistema (Skovhus; Eckert, 2014).

A próxima etapa de avaliação consiste em selecionar as barreiras preventivas e mitigativas necessárias para administrar as ameaças apontadas. Ao avaliar as opções de mitigação antes da implementação completa, os métodos moleculares microbiológicos (MMM) são benéficos para examinar o efeito dos tratamentos candidatos sobre a corrosão e o biofilme e para monitorar as mudanças nos tipos ou números de microorganismos após a aplicação do tratamento (Skovhus; Eckert, 2014).

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo elucidar a utilização dos métodos moleculares microbiológicos para o controle e monitoramento da corrosão microbiológica no setor de óleo e gás por meio de uma revisão de literatura. Serão apresentadas as vantagens e limitações dos testes desta natureza e as tendências de sua utilização e aplicações.

3. Metodologia

A área de concentração da pesquisa consiste em agregar os principais artigos sobre corrosão microbiológica encontrados no site de buscas da one petro e avaliar métodos possíveis de monitoramento e controle deste tipo de corrosão associados à indústria de petróleo. Dessa forma, as palavras chave da pesquisa em inglês foram: corrosão microbiológica, métodos moleculares microbiológicos, reação em cadeia da polimerase e reação em cadeia de polimerase quantitativa e sequenciamento de próxima geração.

Inicialmente a pesquisa teve como intuito o melhor entendimento da corrosão microbiológica, como ela está atrelada à formação de biofilme nos dutos de petróleo e quais tipos de microorganismos podem formar os biofilmes e como eles se relacionam entre si.

Posteriormente, para ser possível realizar o monitoramento e controle eficaz de um sistema, precisa-se de uma boa comparação entre os métodos de identificação microbiológicos aplicáveis e o bom entendimento do melhor cenário de aplicação de cada um.

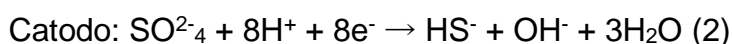
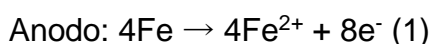
Tendo essas informações em vista, pode ser criado um cenário de controle e mitigação de corrosão microbiológica.

4. Revisão bibliográfica

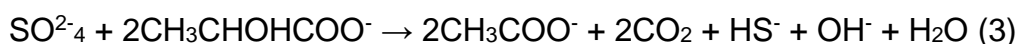
4.1. Corrosão microbiológica

A corrosão microbiológica se manifesta em áreas onde a tensão de cisalhamento de fluido na parede do tubo, a força responsável pela mobilização de tais sólidos, é reduzida. O lodo pode auxiliar a proliferação e cultivo das colônias bacterianas como SRB, arqueias redutoras de sulfato, metanógenos entre outros. É um processo interfacial cuja cinética é determinada pelo ambiente físico e químico de sua interface. Isso inclui a concentração de oxigênio dissolvido, variações de pH, condutividade, presença de sais e outros (Haile *et al.*, 2017).

As bactérias redutoras de sulfato são as mais comumente encontradas na produção de óleo e gás e, além daquelas capazes de reduzir sulfato através de carbono orgânico, foram encontrados novos tipos de SRB aptas a usar o ferro metálico como único doador de elétron. Embora cada uma delas provoque uma reação complexa diferente, o efeito geral pode ser resumido nas reações básicas do processo de dissolução do ferro pelas bactérias, assim como exemplificado pelas reações (1) e (2) (Zhong *et al.*, 2019).



A equação (3) toma o lactato como exemplo na redução do sulfato pelas SRB, normalmente se referindo à redução do sulfato à oxidação do carbono orgânico.



Na última década, houve um surgimento de métodos moleculares, que foram usados para obter uma visão sem precedentes sobre a natureza dos biofilmes coletados de locais que experimentam MIC. No entanto, um dos fatores que está limitando a adoção em larga escala de tal abordagem é o custo associado à identificação da existência de problemas de MIC do biofilme e coleta de amostra de forma reproduzível e repetível (Denvir *et al.*, 2019).

4.2. Métodos convencionais para detectar os microrganismos

4.2.1. *Most probably number (MPN)*

Por várias décadas, os operadores de campos petrolíferos observaram e derrotaram os efeitos prejudiciais das atividades microbianas em seus campos e instalações. Vários testes de campo e de laboratório foram desenvolvidos para detectar e / ou quantificar os microrganismos. Um dos métodos mais amplamente usados é MPN (*most probably number*). Este é um método de cultura baseado no princípio da diluição em série (Hofmann; van Strien, 2019).

4.2.2. *Teste de adenosina trifosfato (ATP)*

Além do MPN, outras técnicas de cultivo ao vivo foram desenvolvidas que funcionam mais rapidamente para detectar SRB e podem ser empregadas no local. Também é possível enumerar toda a comunidade microbiana viável via ATP no local, mas isso não permite que se identifiquem diferentes grupos de microrganismos (Hofmann; van Strien, 2019).

4.3. Métodos moleculares microbiológicos (MMM) para identificar e/ou quantificar os microrganismos

Além desses métodos, outras técnicas foram se desenvolvendo ao longo do tempo, como: reação em cadeia da polimerase (PCR), DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) e FISH (*fluorescence in situ hybridisation*). Esses métodos são capazes de prover informações tanto sobre as células vivas quanto a respeito de células mortas e trazem o benefício de produzir informações que técnicas anteriores não continham, como a enumeração total de microrganismos vivos e comparações entre as populações estudadas.

Os métodos microbiológicos moleculares podem ser incorporados aos processos de avaliação das ameaças de corrosão identificando barreiras preventivas e mitigativas e monitorando a eficácia destas barreiras. Com isso, existe uma melhora da capacidade operadora de gerenciar as ameaças de MIC. Como etapa de avaliação de ameaça de corrosão cada mecanismo de potencial corrosão é avaliado separadamente em cada sistema. Nessa etapa são revisados os dados do projeto, processo, operação, tratamento químico, monitoramento de corrosão e inspeção a fim de identificar as ameaças que afetam os diferentes locais do sistema (Skovhus; Eckert, 2014).

4.3.1. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e sequenciamento de próxima geração (NGS)

Os MMM são um importante método para estabelecer uma relação entre a corrosão localizada e a formação de biofilme. São usados para procurar associações entre biofilme ou sua composição com corrosão e relacionar as características do biofilme com as condições de operação (Skovhus; Eckert, 2014).

A investigação de danos ou falhas provenientes de corrosão a partir de procedimentos laboratoriais ou análise de campo são usadas em conjunto com os MMM e quando agregam os valores corretos, a análise pragmática e integração dos dados ajudam a entender as ameaças previstas (Skovhus; Eckert, 2014).

A análise qPCR pode ser desenvolvida não apenas nas espécies exatas no sistema, mas também em grupos maiores de espécies, ou nas próprias espécies não cultivadas. Isso permite detectar grupos de espécies que não são encontradas com base em análises específicas para espécies conhecidas específicas, mas com base no conhecimento sobre as espécies conhecidas e cultivadas relacionadas mais próximas (Geurkink *et al.*, 2016).

O uso da metodologia NGS em amostras ambientais retornará inerentemente não apenas nomes de espécies conhecidas, mas também bactérias não cultivadas, que representam a coleção de bactérias que foram detectadas em uma amostra particular por isolamento e sequenciamento de material de DNA (Geurkink *et al.*, 2016).

4.4. Controle e monitoramento

A utilização dos métodos moleculares microbiológicos como uma etapa do processo de gerenciamento de MIC envolve benefícios diretos nas fases de avaliação de ameaças, seleção de medidas de mitigação e no monitoramento das barreiras mitigativas escolhidas. Para as fases de avaliação de ameaças os testes caracterizam as condições microbiológicas de linha de base, encontram associações entre o biofilme, sua formação e corrosão e ainda relacionam as características do biofilme com as condições operacionais. Como seleção de medidas de

mitigação eles avaliam o efeito das medidas de mitigação candidatas sobre corrosão e biofilme e auxiliam na seleção de biocidas ou produtos químicos que possam ser empregados. Além disso, os testes MMM auxiliam no monitoramento dos efeitos de curto e longo prazo da mitigação do biofilme, das mudanças na eficácia química e das mudanças nas populações microbiológicas presentes. (Skovhus; Eckert, 2014).

Com a introdução de métodos de microbiologia molecular independente de cultura, tornou-se possível monitorar adequadamente os números microbianos e a atividade microbiana em dutos e fluxos de processo. A aplicação de MMM permite a otimização aprimorada de estratégias de mitigação de MIC (por exemplo, tratamentos com biocidas) e monitoramento de MIC (Larsen *et al.*, 2010).

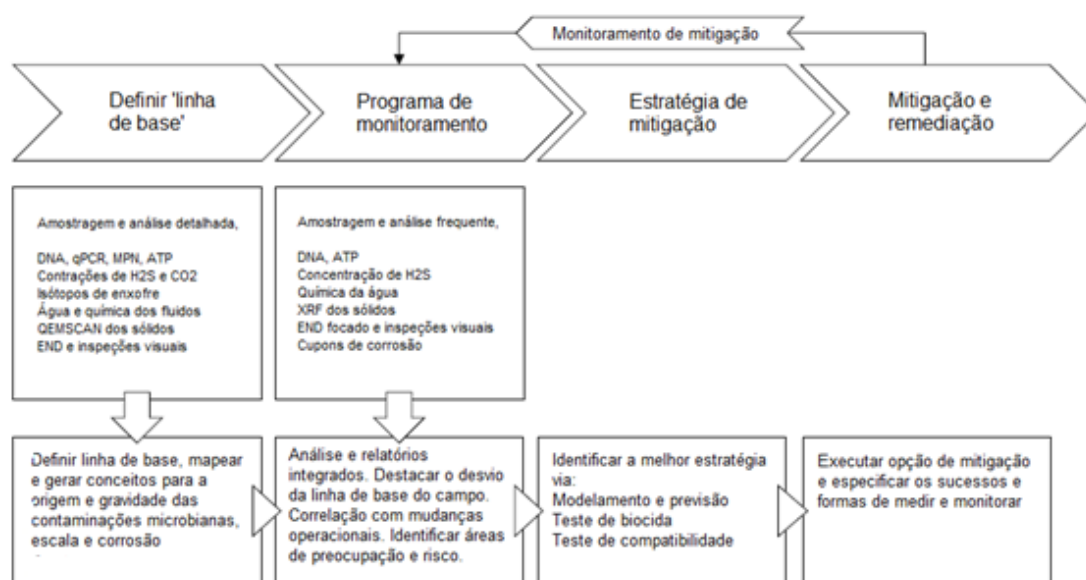


Figura 9 - Monitoramento de mitigação. Fonte: Adaptado de Hofmann; van Strien (2019)

5. Análise e discussão

Com base nas informações coletadas a respeito dos diversos métodos estudados, foi elaborada uma discussão que avalia e compara as principais vantagens e desvantagens dos métodos.

5.1. Métodos moleculares microbiológicos (MMM)

No passado, a ênfase estava na enumeração de certos grupos microbianos, que se acreditava serem as principais espécies responsáveis pela MIC. Com o advento dos MMM, tornou-se possível escanear uma amostra e identificar todas as espécies presentes (vivas ou mortas) em um tempo razoável e a um custo plausível. Não é mais necessário tentar manter os micróbios vivos para realizar testes de cultura viva para estabelecer suas características. Isso costumava ser difícil, considerando que algumas espécies sobrevivem apenas nas condições mais exóticas nas profundezas do solo (Hofmann; van Strien, 2019).

Os MMM são apenas um desenvolvimento recente, mas já reformularam nossa compreensão dos processos microbianos na indústria de petróleo e gás. Nos últimos anos, houve avanços tremendos nos métodos de análise de DNA. Vários MMM como DGGE, reação em cadeia da polymerase quantitativa (qPCR) e sequenciamento de próxima geração (NGS) foram desenvolvidos. Atualmente, o NGS está se tornando o método de análise de DNA mais versátil e amplamente usado (Hofmann; van Strien, 2019).

5.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A partir da análise dos dados contidos na figura 2, percebe-se que qPCR é atualmente o método mais confiável para detectar e quantificar microrganismos de interesse em um curto período de tempo. Quando comparado com os testes ATP e MPN, ele é o único teste capaz de fornecer dados a respeito de diferenciação e enumeração de bactérias e arqueias, enquanto os outros dois testes trazem apenas informações a respeito de atividade microbológica e enumeração de células vivas, respectivamente. Porém, em termos monetários, qPCR representa gastos até dez vezes em relação ao MPN e cinco vezes maiores em comparação ao ATP.

O método qPCR também leva vantagem quando comparado com DGGE, uma vez que provém dados avançados em relação à identificação dos microrganismos presentes e é realizado em um período muito mais curto e quando comparado com a técnica FISH, observa-se menor custo, um prazo maior e não necessita de provas selecionadas para identificação dos microrganismos.

Técnica	Custo estimado por amostra (USD)	Habilidade desejada (1-3, baixo a altamente treinado)		Tempo de resposta	Retorno de dados
		Amostragem	Análise		
<i>Adenosine Triphosphate (ATP)</i>	\$100	1	2	10 minutos	Atividade microbológica
<i>Most Probable Number (MPN)</i>	\$50	1	2	28 dias	Enumeração de células vivas
<i>qPCR</i>	\$500	1	3	10 dias	Diferenciação e enumeração de bactérias e arqueias
<i>DGGE</i>	\$500	1	3	2 meses	Representação de comunidade de microrganismos
<i>FISH</i>	\$800	2	3	5 dias	Diferenciação de bactérias e arqueias de provas selecionadas e enumeração

Figura 10- Comparação de técnicas usadas para análise microbológica no setor petrolífero. Fonte: Adaptada de Bennet (2016)

5.3. Sequenciamento de próxima geração (NGS)

Os NGS, com sua abordagem não direcionada, flexibilidade e tempo de resposta rápido fornece atualmente a ferramenta mais econômica para monitorar as culturas microbianas no reservatório e nas instalações (Hofmann; van Strien, 2019).

Com a utilização de MMM como NGS, podemos agora identificar quantas espécies diferentes estão presentes na água que viaja através do sistema e se essas espécies específicas

são susceptíveis de formar as vias metabólicas simbióticas presentes em um biofilme bem desenvolvido (Hofmann; van Strien, 2019).

Uma desvantagem desta abordagem "não direcionada" de NGS é a de que, quando o DNA de certos micróbios alvo apenas forma uma pequena parte do pool de DNA microbiano total, esses micróbios podem ser negligenciados (ou seja, não copiados o suficiente pelo método de PCR). Por esta razão, primers especiais foram desenvolvidos que focam o sequenciamento NGS em grupos específicos de micróbios, como os SRB (Hofmann; van Strien, 2019).

6. Conclusão

Tendo em vista o grande impacto econômico que a corrosão microbiológica traz para a indústria de petróleo, faz-se necessária a utilização de métodos de monitoramento e controle, com o objetivo de mitigar seus danos. Por ser um processo complexo, mediado por diversos tipos de microrganismos diferentes, devem ser analisados não somente os tipos de microrganismos presentes, como também a estrutura do biofilme formado, pois acredita-se que cada estrutura é totalmente única.

Com base no foco de investigar os microrganismos presentes, os métodos moleculares microbiológicos abrangem diversas aplicações, com o intuito de estabelecer a relação entre corrosão e biofilme, entender e mensurar as ameaças previstas, fornecer uma visão da microbiologia do sistema, capacitando a tomada de decisão mais adequada.

Novos métodos, mais abrangentes, precisos e rápidos vem sendo desenvolvidos para quantificar e estudar a MIC e estão mostrando seu potencial de gerar informações valiosas a respeito das operações em sistemas petrolíferos. Os MMM são ideais para fases de investigação de MIC e suas principais vantagens são: detectar uma vasta gama de microrganismos, protocolos relativamente simples, com amostras estáveis e adequadas para qualquer etapa de investigação de MIC.

7. Referências

BENNET, Douglas G. Oilfield Microbiology: Detection Techniques Used in Monitoring Problematic Microorganisms Such as Sulphate-Reducing Bacteria SRB. *In: 2016, Anais [...]. . In: OFFSHORE TECHNOLOGY CONFERENCE ASIA. : OnePetro, 2016. DOI: 10.4043/26788-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/OTCASIA/proceedings/16OTCA/1-16OTCA/D011S004R003/85537>. Acesso em: 24 nov. 2021.*

DENVIR, Adrian; VELA, David; DELEGARD, Angela. Biofilms in Industrial Water Systems: Metagenomic Insight on Biofilm Populations from a New Real-Time Biomonitoring System. *In: 2019, Anais [...]. . In: CORROSION 2019. : OnePetro, 2019. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR19/All-CORR19/NACE-2019-13504/127546>. Acesso em: 18 nov. 2021.*

GEURKINK, Bert; DODDEMA, Sabine; DE VRIES, Herman; EUVERINK, Gert Jan; CROESE, Elsemiek. Value of Next Generation Sequencing as Monitoring Tool For Microbial Corrosion - A Practical Case from Bioprofiling to Tailor made MMM

Analysis. *In*: 2016, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2016. : OnePetro, 2016. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR16/All-CORR16/NACE-2016-7764/123795>. Acesso em: 22 set. 2021.

HAILE, Tesfaalem; KIESMAN, Danielle; CROSBY, Tamer; PLACE, Trevor; SARGENT, Jennifer; WOLODKO, John. Assessment of Microbially Influenced Corrosion Threats using Molecular Microbiological Methods. *In*: 2017, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2017. : OnePetro, 2017. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR17/All-CORR17/NACE-2017-9384/125589>. Acesso em: 25 jul. 2021.

HOFMANN, Andreas; VAN STRIEN, Willem J. MAINTAINING WELL & FACILITY HEALTH – THE APPLICATION OF DNA ANALYSIS TO CORROSION AND BIO-FOULING PREVENTION. *[S. l.]*, p. 13, [s.d.].

LARSEN, Jan; RASMUSSEN, Kim; PEDERSEN, Heidi; SØRENSEN, Ketil; LUNDGAARD, Thomas; SKOVHUS, Torben Lund. Consortia Of Mic Bacteria And Archaea Causing Pitting Corrosion In Top Side Oil Production Facilities. *In*: 2010, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2010. : OnePetro, 2010. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR10/All-CORR10/NACE-10252/126870>. Acesso em: 22 set. 2021.

LIU, Tao; CHENG, Y. Frank; SHARMA, Mohita; VOORDOUW, Gerrit. Effect of fluid flow on biofilm formation and microbiologically influenced corrosion of pipelines in oilfield produced water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, *[S. l.]*, v. 156, p. 451–459, 2017. DOI: 10.1016/j.petrol.2017.06.026.

POULSEN, Morten; SANDERS, Peter Frank; THOMSEN, Uffe Sognstrup; LUNDGAARD, Thomas. Use of Advanced Molecular Microbiology Methods to Manage Microbial Corrosion Issues in Topsides Facilities. *In*: DAY 3 WED, NOVEMBER 09, 2016 2016, Abu Dhabi, UAE. **Anais** [...]. . *In*: ABU DHABI INTERNATIONAL PETROLEUM EXHIBITION & CONFERENCE. Abu Dhabi, UAE: SPE, 2016. p. D031S081R003. DOI: 10.2118/183526-MS. Disponível em: <https://onepetro.org/SPEADIP/proceedings/16ADIP/3-16ADIP/Abu%20Dhabi,%20UAE/186152>. Acesso em: 21 nov. 2021.

SKOVHUS, Torben Lund; ECKERT, Richard Bruce. Practical Aspects of MIC Detection, Monitoring and Management in the Oil and Gas Industry. *In*: 2014, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2014. : OnePetro, 2014. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR14/All-CORR14/NACE-2014-3920/122998>. Acesso em: 26 jul. 2021.

SØRENSEN, Ketil Bernt; THOMSEN, Uffe Sognstrup; JUHLER, Susanne; LARSEN, Jan. Cost Efficient MIC Management System Based On Molecular Microbiological Methods. *In*: 2012, **Anais** [...]. . *In*: CORROSION 2012. : OnePetro, 2012. Disponível em: <https://onepetro.org/NACECORR/proceedings/CORR12/All-CORR12/NACE-2012-1111/119789>. Acesso em: 22 set. 2021.

ZHONG, Huiyun; SHI, Zhiming; JIANG, Guangming; SONG, Yarong; YUAN, Zhiguo. Development of microbially influenced corrosion on carbon steel in a simulated water injection system. **Materials and Corrosion**, [S. l.], v. 70, n. 10, p. 1826–1836, 2019. DOI: 10.1002/maco.201910873.