ÍNDICE DE REVISÕES

REV.	DESCRIÇÃO E/OU FOLHAS ATINGIDAS
0	Revisão Original
A	Inclusão do item 2.4.
B	Correção da composição da solução no item 2.4.
C	Revisão do texto do item 1, ajustes na descrição das condições do teste de corrosividade (item 2.3), inserido tabela e figura no item 2.4 (teste de espuma), ajuste do texto do critério de aprovação (item 3) e atualização do formulário da ET segundo norma PETROBRAS N-0381 rev. M.
D	Inclusão do item 3 sobre apresentação dos resultados. Detalhamento do teste de CMI. Simplificação do teste de eficiência biocida, considerando obrigatória apenas a realização da etapa com o biofilme pré-formado. Inclusão de item com detalhamento do teste de solubilidade. Melhorias no item de critérios de aprovação. Inclusão dos Anexos A, B e seus subanexos, contendo os procedimentos detalhados dos ensaios microbiológicos.

	REV. 0	REV. A	REV. B	REV. C	REV. D	REV. E
DATA	31/07/2019	10/12/2019	13/12/2019	17/01/2023	18/04/2024	
EXECUÇÃO	Jussara de Mello	B97J	B97J	BE3W	CQ28, M3OO	
VERIFICAÇÃO	Mariana Figueiredo	EK6A	EK6A	EK6A	BE3W	
APROVAÇÃO	Débora Gemelli	CJCL	CJCL	CJCL	EK6A	

DE ACORDO COM A DI-1PBR-00337, AS INFORMAÇÕES DESTE DOCUMENTO SÃO PROPRIEDADE DA PETROBRAS, SENDO PROIBIDA A UTILIZAÇÃO FORA DA SUA FINALIDADE.

FORMULÁRIO PADRONIZADO PELA NORMA PETROBRAS N-381-REV.M.

Sumário

1. Introdução 3
2. Protocolo de teste 3
2.1. Informações mínimas sobre o produto 3
2.2. Avaliação da ação antimicrobiana 3
2.2.1. Cultura microbiana de BRS-m 4
2.2.2. Concentração mínima inibitória (CMI) 4
2.2.3. Eficiência biocida 4
2.3. Ensaios de compatibilidade 5
2.3.1. Avaliação da corrosividade 5
2.3.2. Ensaio de tendência à formação de espuma 5
2.3.3. Ensaio de solubilidade 6
3. Apresentação dos resultados 6
3.1. Informações mínimas sobre o produto 6
3.2. Avaliação da ação antimicrobiana 7
3.2.1. Concentração mínima inibitória (CMI) 7
3.2.2. Eficiência biocida 7
3.3. Ensaios de compatibilidade 9
3.3.1. Avaliação da corrosividade 9
3.3.2. Ensaio de tendência à formação de espuma 9
3.3.3. Ensaio de solubilidade 10
4. Critérios de aprovação 10
4.1. Avaliação da ação antimicrobiana 10
4.1.1. Eficiência biocida 10
4.2. Ensaios de compatibilidade 10
4.2.1. Avaliação da corrosividade 10
4.2.2. Ensaio de tendência à formação de espuma 11
4.2.3. Ensaio de solubilidade 11
ANEXO A - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) 12
ANEXO B - Avaliação da eficiência biocida 15
ANEXO B.1 - Preparo de cupons metálicos 16
ANEXO B.2 - Crescimento do biofilme pré-formado sobre os cupons metálicos 17
ANEXO B.3 - Meio Postgate C modificado 18
ANEXO B.4 - Meio Postgate E modificado 20
ANEXO B.5 - Solução de tioglicolato de sódio 21
ANEXO B.6 - Técnica do número mais provável (NMP) 21
ANEXO B.7 - Determinação da atividade de BRS-m 23
ANEXO B.8 - Solução salina redutora 24
ANEXO B.9 - Meio de cultura para BANHT 25

1. INTRODUÇÃO

Este documento define os requisitos de qualificação de BIOCIDA para aplicação em tanques de plataformas de petróleo com o objetivo de controlar a geração biogênica de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e a biocorrosão, com ênfase nos microrganismos genericamente conhecidos por bactérias redutoras de sulfato (BRS).

O fornecedor deve apresentar relatório de testes com o biocida de acordo com a metodologia descrita a seguir. Além dessas informações, o relatório deve conter, no mínimo:

- Identificação e qualificação do responsável técnico pela realização dos ensaios;
- Dados do laboratório e instituição responsável pela execução dos ensaios;
- Data de realização dos ensaios e emissão do relatório;
- Identificação do produto Biocida para Tanques de plataformas avaliado.

2. PROTOCOLO DE TESTE

2.1. Informações mínimas sobre o produto

O fornecedor deve informar, no mínimo, os seguintes aspectos do produto:

- Molécula ou família química do(s) princípio(s) ativo(s) do produto;
- Mecanismo(s) de ação do(s) princípio(s) ativo(s) na célula microbiana;
- Concentração (ou faixa de concentração com variação máxima de 10 %) do(s) princípio(s) ativo(s) no produto;
- Solubilidade em água destilada;
- Solubilidade em salmoura (água do mar sintética);
- Dosagem recomendada para a aplicação em campo.

Reportar as informações conforme indicado no item 3.1.

2.2. Avaliação da ação antimicrobiana

O fornecedor deve realizar testes de determinação da concentração mínima inibitória - CMI (*minimum inhibitory concentration* – MIC) e de avaliação da eficiência biocida utilizando culturas mistas representativas de bactérias redutoras de sulfato mesófilas (BRS-m), conforme descrito nos itens a seguir.
O biocida padrão THPS (tetrakis hidroximetil fosfônio) 75 % deverá ser utilizado como controle positivo em ambos os testes.
Os laudos analíticos indicando o percentual do(s) princípio(s) ativo(s) biocida(s) presente(s) em cada produto, tanto no biocida em teste, quanto no THPS utilizado, deverão ser anexados ao relatório do fornecedor.

2.2.1. Cultura microbiana de BRS-m

Caso necessário, e sendo de interesse do fornecedor, a PETROBRAS poderá fornecer uma cultura mista de BRS-m representativa de tanques de plataformas que conste na Coleção de Microrganismos da Indústria do Petróleo (CMIP) existente no Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES).
Essa cultura será disponibilizada em duplicata, por repique, em frascos de penicilina de 50 mL, contendo meio Postgate C modificado conforme Anexo B.3.
A cultura deverá ser retirada pelo fornecedor nas dependências do CENPES e tratada de acordo com boas práticas de laboratório em microbiologia e em biossegurança, atendendo à legislação vigente, em especial, àquela relativa ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN (lei nº 13.123 de 20 de maio de 2015).
O responsável técnico do fornecedor deverá assinar, previamente, declaração de responsabilidade, quanto à manipulação do material biológico, de acordo com a referida legislação e de utilização da cultura, para fins destinados exclusivamente, aos ensaios relacionados a esta especificação técnica, cuja execução deverá se restringir ao território nacional, de modo que, em nenhuma hipótese, o material biológico poderá ser remetido ao exterior e/ou transferido para terceiros.

2.2.2. Concentração mínima inibitória (CMI)

O fornecedor deverá realizar testes para determinação da CMI, conforme o procedimento descrito no Anexo A, utilizando no mínimo uma cultura mista de BRS-m representativas de água de produção da indústria do petróleo, anaeróbia, mesófila, cultivada em salinidade de água do mar.

As condições de teste e os resultados deverão ser reportados conforme indicado no item 3.2.1.

2.2.3. Eficiência biocida

Os ensaios do teste de eficiência biocida deverão ser realizados obrigatoriamente apenas quanto à remoção do biofilme pré-formado, ou seja, sobre as bactérias sésseis, fortemente aderidas a um cupom de aço carbono C1020, conforme procedimentos descritos no Anexo B. Para tal, os ensaios deverão atender às seguintes considerações:

- Utilizar a mesma cultura mista de BRS-m representativa de água de produção do petróleo utilizada no teste de CMI;
- Obter um biofilme pré-formado com no mínimo 10^5 NMP/cm^2. Realizar os ensaios com no mínimo 3 concentrações do produto biocida em avaliação, incluindo o resultado da CMI e a dosagem de campo recomendada;
- Realizar um controle biológico (sem a dosagem de biocida);
- Utilizar o biocida THPS 75 %, na dosagem de 200 ppm, como controle positivo;
- Realizar os ensaios nos tempos de contato de 4 e 24 h;
- Determinar o desempenho quantitativo do produto a partir da quantificação das BRS-m através da técnica de quantificação por NMP.

As condições de teste e os resultados obtidos deverão ser reportados conforme indicado no item 3.2.2. Considerar os critérios de aprovação conforme item 4.1.1.

2.3. Ensaios de compatibilidade

2.3.1. Avaliação da corrosividade

A avaliação da corrosividade dever realizada segundo a norma ASTM G31-72 nas seguintes condições:

- Fluido de teste: produto puro;
- Temperatura: 60 °C;
- Frasco fechado sem agitação;
- Pressão do teste: atmosférica (pressão de vapor do produto na temperatura de teste);
- Não é necessário injeção de gás;
- Os cupons devem ser totalmente imersos no fluido de teste;
- Metalurgia dos cupons: aço carbono API 5L Gr B ou aço carbono C1018;
- Duração do teste: 7 dias.

Fotografar o(s) frasco(s) logo após a imersão do(s) cupom(ns) metálico(s) no fluido de teste (início do ensaio) e após decorridos os 7 dias (final do ensaio). Incluir as fotografias no relatório de análises dos resultados.

Reportar as condições de teste e o resultado conforme indicado no item 3.3.1. Considerar os critérios de aprovação conforme item 4.2.1.

2.3.2. Ensaio de tendência à formação de espuma

Colocar em uma proveta de 250 mL (diâmetro externo de 45 mm e altura da parte graduada de 225 mm), 100 mL de uma solução com 50.000 mg/L de NaCl, e com três dosagens do produto: 5 vezes, 10 vezes e 20 vezes superior à dosagem recomendada para aplicação no campo do item 2.2.1.

Instalar um borbulhador de gás (tubo de vidro com um cilindro de vidro sinterizado de porosidade média – P160), que deve ser inserido no centro da proveta e ficar imerso numa profundidade de 50 mL a partir da interface da salmoura com o ar. Borbulhar N_2 ou ar comprimido na proveta controlando a vazão através de um rotâmetro em 50 L/h durante 2 minutos.

Medir o volume de espuma que se forma e o tempo de quebra. Fotografar o aspecto da solução antes do teste iniciar, após 1 min de borbulhamento e ao fim de 2 minutos, conforme Figura 1. Incluir as fotografias no relatório de análises dos resultados das três dosagens avaliadas, com comentários e observações ocorridas no ensaio (tamanho de bolhas, características da espuma, formação de borra etc.).

Reportar os resultados conforme indicado no item 3.3.2. Considerar os critérios de aprovação conforme item 4.2.2.

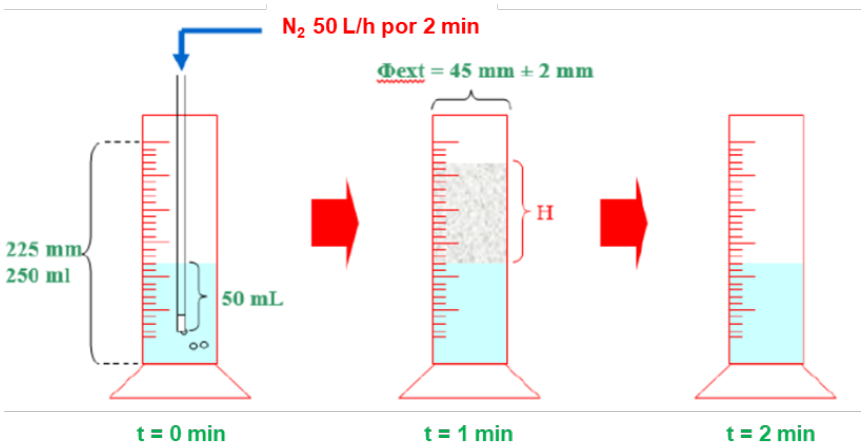

Figura 1. Desenho esquemático do aparato do teste de formação de espuma. H = altura da espuma.

2.3.3. Ensaio de solubilidade

Esse ensaio deve ser realizado em água destilada e em salmoura contendo 35 g/L de NaCl (salinidade equivalente à da água do mar) como solventes. Adicionar em 2 frascos de vidro transparentes, tipo tubo de ensaio, 5 mL de biocida. Adicionar em cada frasco 5 mL de cada solvente, agitando o tubo levemente. Avaliar a solubilidade do biocida, fazendo registro fotográfico e classificando o produto como "totalmente solúvel" (não há separação de fases), "parcialmente solúvel" (há separação de fases, sem turvação ou formação de depósitos) ou "insolúvel" (há separação de fases, com turvação e/ou formação de depósitos) em cada solvente avaliado.

Reportar os resultados conforme indicado no item 3.3.3. Considerar os critérios de aprovação conforme item 4.2.3.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Embora seja esperado um relatório analítico convencional com informações detalhadas na forma de textos, solicita-se a ênfase de determinados dados, de acordo com as formas de apresentação demonstradas nos itens a seguir.

3.1. Informações mínimas sobre o produto

Devem ser apresentadas em formato de tabela, conforme modelo da Tabela I.

Tabela I – Resumo das informações mínimas sobre o produto.

INFORMAÇÕES MÍNIMAS SOBRE O PRODUTO	
Molécula ou família química do(s) princípio(s) ativo(s) do produto	
Mecanismo(s) de ação do(s) princípio(s) ativo(s) na célula microbiana	
Concentração (ou faixa de concentração com variação máxima de 10 %) do(s) princípio(s) ativo(s) no produto	
Solubilidade em água destilada	
Solubilidade em água do mar sintética	
Dosagem recomendada para a aplicação em campo	

3.2. Avaliação da ação antimicrobiana

3.2.1. Concentração mínima inibitória (CMI)

Devem ser apresentadas as principais condições de teste em formato de tabela, conforme modelo da Tabela II e os resultados dos ensaios, conforme modelos da Tabela III e foto da Figura 2.

Tabela II – Condições de teste e resultado da CMI para BRS-m.

CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	
Procedência da cultura de BRS-m	
Meio de cultura anaeróbio utilizado (anexar a composição e o procedimento de preparo)	
Temperatura de incubação do teste (º C)	
Concentração da cultura microbiana inoculada em NMP/mL	
Tempo de exposição das bactérias ao produto (h)	
Concentração Mínima Inibitória (CMI) determinada (ppm)	

Tabela III – Concentrações dos produtos avaliados (ppm) nos ensaios de CMI e leitura do resultado.

MIC BRS-m	Concentrações do produto (ppm)						
	0	50	100	200	300	400	500
THPS 75 %	+	-	-	-	-	-	-
Biocida em avaliação	+	+	+	+	-	-	-

Figura 2. Imagem do resultado obtido nos ensaios de CMI para o produto em avaliação, indicando uma CMI de 300 ppm.

3.2.2. Eficiência biocida

Devem ser apresentadas as principais condições de teste em formato de tabela, conforme modelo da Tabela IV.

Tabela IV – Principais condições de teste de eficiência biocida.

EFICIÊNCIA BIOCIDA	
Procedência da cultura de BRS-m	
Meio de cultura utilizado (anexar a composição e o procedimento de preparo)	
Temperatura de teste (º C)	
Concentração inicial do biofilme (NMP/cm^2)	
Tempos de exposição das bactérias ao produto (h)	
Tempo de incubação para crescimento do biofilme pré-formado nos cupons metálicos (dias)	
Concentrações do produto avaliadas (ppm)	

Os resultados da quantificação microbiana devem ser apresentados em formato de gráfico em escala logarítmica e tabela, conforme o modelo da Figura 3 e Tabela V a seguir.

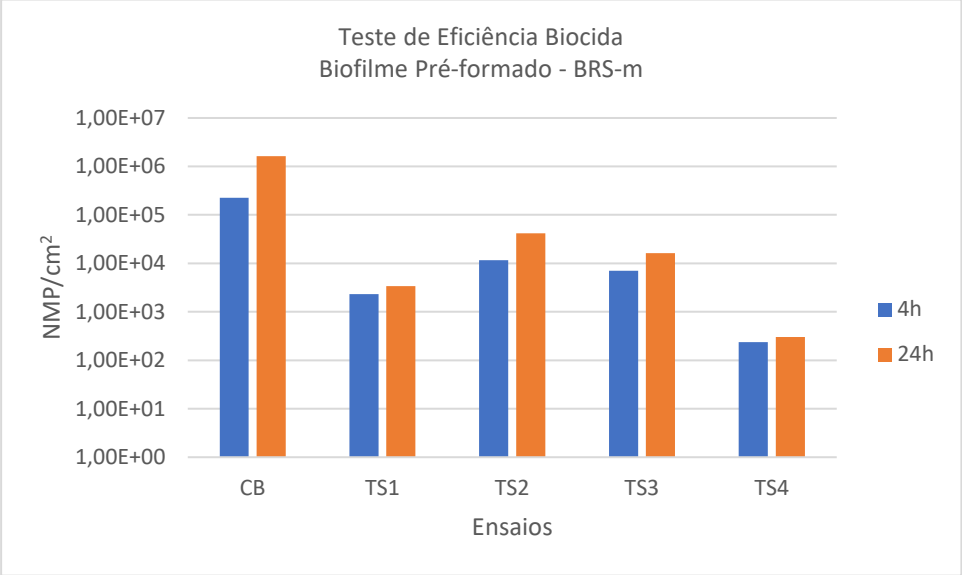

Figura 3. Modelo de gráfico de apresentação dos resultados da eficiência biocida do produto sobre a remoção das bactérias sésseis de um biofilme pré-formado em cupom metálico.

Tabela V - Resultados das quantificações e atividade de BRS-m nos tempos de contato de 4 e 24 h do teste de eficiência biocida.

Resultados		BRS (NMP/cm²)						BRS - Atividade	
Ensaio	Réplica	4 h	4 h	Média 4h	24 h	24 h	Média 24h		
		NMP/mL	NMP/cm²	NMP/cm²	NMP/mL	NMP/cm²	NMP/cm²	4 h	24 h
CB	1	4,30E+04	2,19E+05	2,26E+05	2,30E+04	1,17E+05	1,64E+06	4,00 - Média	4,65- Alta
	2	1,50E+04	7,65E+04		9,30E+03	4,74E+04		4,00 - Média	4,65- Alta
	3	7,50E+04	3,83E+05		9,30E+05	4,74E+06		4,00 - Média	4,65- Alta
TS1	1	9,30E+02	4,74E+03	2,33E+03	1,50E+02	7,65E+02	3,42E+03	4,00 - Média	4,65- Alta
	2	9,30E+00	4,74E+01		9,30E+02	4,74E+03		4,00 - Média	4,65- Alta
	3	4,30E+02	2,19E+03		9,30E+02	4,74E+03		4,00 - Média	4,65- Alta
TS2	1	2,30E+02	1,17E+03	1,16E+04	9,30E+02	4,74E+03	4,14E+04	4,00 - Média	4,65- Alta
	2	4,30E+03	2,19E+04		2,30E+04	1,17E+05		4,00 - Média	3,50 - Média
	3	2,30E+03	1,17E+04		4,30E+02	2,19E+03		4,00 - Média	4,65- Alta
TS3	1	9,30E+02	4,74E+03	7,07E+03	9,30E+02	4,74E+03	1,62E+04	4,00 - Média	4,65- Alta
	2	2,30E+03	1,17E+04		4,30E+03	2,19E+04		4,00 - Média	4,65- Alta
	3	9,30E+02	4,74E+03		4,30E+03	2,19E+04		4,00 - Média	4,65- Alta
TS4	1	4,30E+01	2,19E+02	2,38E+02	4,30E+01	2,19E+02	3,04E+02	4,00 - Média	4,65- Alta
	2	4,00E+00	2,04E+01		9,30E+01	4,74E+02		4,00 - Média	4,65- Alta
	3	9,30E+01	4,74E+02		4,30E+01	2,19E+02		4,00 - Média	4,65- Alta

3.3. Ensaios de compatibilidade

3.3.1. Avaliação da corrosividade

Devem ser apresentadas as principais condições de teste em formato de tabela, conforme modelo da Tabela VI.

Tabela VI – Representação das principais condições de teste e do resultado de avaliação da corrosividade.

AVALIAÇÃO DA CORROSIVIDADE	
Concentração do produto que foi avaliada	
Temperatura de teste (º C)	
Tempo de duração do teste (dias)	
Metalurgia do(s) cupom(ns) utilizado(s)	
Taxa de corrosão determinada (mm/ano)	

3.3.2. Ensaio de tendência à formação de espuma

Deve-se apresentar os resultados do teste, bem como as observações requeridas em formato de tabela, conforme modelo da Tabela VII.

Tabela VII – Representação dos resultados de avaliação da formação de espuma com três dosagens do produto: 5 vezes, 10 vezes e 20 vezes superior à dosagem recomendada para aplicação no campo.

	DURANTE O BORBULHAMENTO	APÓS O BORBULHAMENTO		
DOSAGEM	Volume de espuma (mL) após 1 min	Volume de espuma (mL) após 2 min	Tempo total de quebra de espuma (min)	OBSERVAÇÕES
5 x				
10 x				
20 x				

3.3.3. Ensaio de solubilidade

Deve-se apresentar os resultados do teste, bem como as observações requeridas em formato de tabela, conforme modelo da Tabela VIII.

Tabela VIII - Representação dos resultados do ensaio de solubilidade.

MEIO	PROPORÇÃO (solvente:produto)	SOLUBILIDADE (informar se: totalmente solúvel / parcialmente solúvel / insolúvel)	OBSERVAÇÕES (informar se: apresentou turbidez / precipitação / separação de fases / formação de borras)	FOTO
Água destilada	1:1			
Salmoura	1:1			

4. CRITÉRIOS DE APROVAÇÃO

O produto será considerado aprovado em laboratório se atender todos os critérios exigidos no protocolo de teste desta Especificação Técnica, listados a seguir.

4.1. Avaliação da ação antimicrobiana

4.1.1. Eficiência biocida

O produto avaliado será considerado apto, se no teste de eficiência biocida apresentar desempenho equivalente ou superior ao resultado obtido com o biocida THPS 75 %, na dosagem de 200 ppm.

4.2. Ensaios de compatibilidade

4.2.1. Avaliação da corrosividade

Para aprovação do produto, a taxa de corrosão do produto puro não deve ser maior que 0,5 mm/ano.

4.2.2. Ensaio de tendência à formação de espuma

Para aprovação do produto no ensaio de tendência a formação de espuma, os resultados com o teste utilizando 5 vezes a dosagem do produto devem atender os seguintes critérios:

- Altura máxima da espuma (H) durante o borbulhamento não ultrapassar 50 % do volume inicial, ou seja, altura máxima total (líquido + espuma) de 150 mL;
- Tempo de quebra da espuma, após o término do borbulhamento, deverá ser de até 2 minutos.

Os resultados com as dosagens de 10 vezes e 20 vezes superior à recomendada devem ser apresentados como informativo.

4.2.3. Ensaio de solubilidade

O biocida será considerado aprovado no teste de solubilidade quando demonstrar ser totalmente solúvel em água destilada e em salmoura nas diluições testadas, com tolerância de turvação nas proporções avaliadas, sem formação de precipitados ou separação de fases.

DETALHAMENTO DOS PROCEDIMENTOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

ANEXO A - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A determinação da CMI (ou *minimal inibitory concentration* - MIC) é um ensaio qualitativo que consiste na avaliação do efeito inibitório de diferentes concentrações do produto biocida sobre o crescimento de bactérias planctônicas de uma determinada cultura microbiana, em seu respectivo meio de cultura, em um intervalo mínimo de 24 h após a dosagem do biocida em estudo (VIDELA, 2003).

Os procedimentos descritos neste Anexo são aqueles comumente adotados e padronizados para avaliação da CMI em culturas microbianas anaeróbias representativas da indústria do petróleo.

O produto biocida em teste deve ser avaliado em comparação ao biocida padrão de referência, o THPS (sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio) 75 %. Os percentuais do princípio ativo em ambos os produtos devem ser confirmados através de seus respectivos laudos analíticos, os quais deverão ser anexados ao relatório do fornecedor.

As concentrações do produto a serem testadas devem ser selecionadas em função da dosagem de campo recomendada, contudo, na ausência dessa informação, pode-se utilizar as concentrações de referência do THPS 75 %, cuja CMI, normalmente, encontra-se entre 50 e 200 ppm (mg/L), a depender da cultura microbiana utilizada. Vale alertar que essas concentrações se referem às dosagens do produto em si e não do princípio ativo.

As soluções biocidas devem ser preparadas em água destilada estéril e 50 vezes mais concentradas que as concentrações a serem testadas, de modo que seja adicionado apenas 1 mL de biocida em cada frasco de teste. Variações desse volume são aceitáveis, desde que não contribuam com uma diluição superior a 5 % do volume de teste e não varie entre as concentrações testadas. Como a maioria dos biocidas é comercializado em solução, é necessário fazer a conversão de massa para volume utilizando-se a densidade do produto.

Os ensaios normalmente são realizados em frascos do tipo antibiótico/penicilina de 50 mL, contudo, podem ser realizados em volumes e frascos diferentes, desde que a anaerobiose seja garantida. Os ensaios devem ser feitos em triplicata. Os frascos de teste devem conter o respectivo meio de cultura em avaliação preparado adequadamente conforme a cultura utilizada.

Os ensaios de CMI deverão ser realizados no mínimo para uma cultura mista de bactérias redutoras de sulfato mesófilas (BRS-m), representativa de água de produção de petróleo. Um inóculo para o início dos ensaios deve ser previamente preparado a partir de um repique de 10 % (v/v) e 72 h de uma cultura estoque em incubação a 30 ± 2 °C ou 37 ± 2 °C e realimentação frequente no laboratório.

O cultivo e manutenção do inóculo de BRS-m deve ser feito em meio Postgate C modificado, conforme apresentado no Anexo B.3. O meio Postgate C modificado é normalmente utilizado em função da sua menor concentração de ferro, evitando assim, a possibilidade de falsos positivos na CMI, pela transferência de precipitados de sulfeto de ferro (FeS) durante a inoculação.

Já nos frascos de determinação da CMI, o meio de cultura a ser utilizado para BRS-m é o Postgate E modificado, preparado tal como apresentado no Anexo B.4, visto que se trata de um teste de detecção. Grupos microbianos e meios de cultura adicionais poderão ser utilizados a critério do fornecedor, a fim de evidenciar características diferenciais de seu produto.

Para execução da CMI, todos os frascos de teste devem ser inoculados com um volume de 1 % (v/v), ou seja, 0,5 mL da cultura inóculo deve ser transferida para 48,5 mL do meio de cultura no frasco de teste, aos quais, posteriormente, deverão ser adicionados 1 mL da solução biocida, completando assim os 50 mL por frasco, conforme ilustrado na Figura (a).

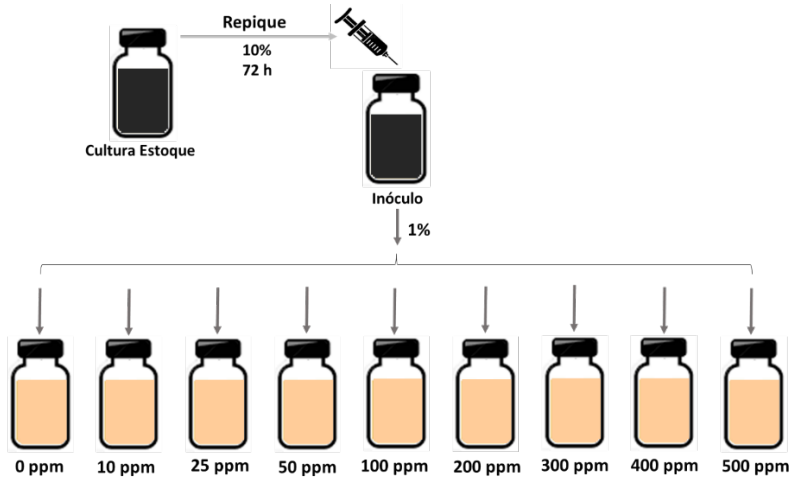

Figura (a). Representação esquemática da montagem do ensaio de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) ou minimal inibitory concentration (MIC) de biocidas.

O inóculo deve ser quantificado pela técnica do número mais provável (NMP), conforme descrito no Anexo B.6, no dia da inoculação, devendo apresentar uma concentração de no mínimo 10^5 NMP/mL, a fim de garantir a representatividade do resultado da CMI obtido, pois concentrações muito baixas do inóculo resultam em uma CMI superestimada.

Após a inoculação, deverão ser dosadas as diferentes concentrações dos biocidas nos respectivos frascos. Um frasco sem o biocida também deve ser inoculado como controle. Todos os frascos deverão ser incubados em estufa a 30 ± 2 °C ou 37 ± 2 °C e após 24 h devem ser avaliados quanto à alteração do meio pelos respectivos indicadores de crescimento microbiano. Consideram-se positivos os frascos que apresentarem crescimento microbiano e negativos os frascos nos quais o biocida interferiu na visualização do crescimento.

No caso de BRS-m, são considerados positivos os frascos que se apresentarem totalmente enegrecidos ou acinzentados com pontos pretos devido à formação de precipitados de FeS, conforme ilustrado na Figura (b).

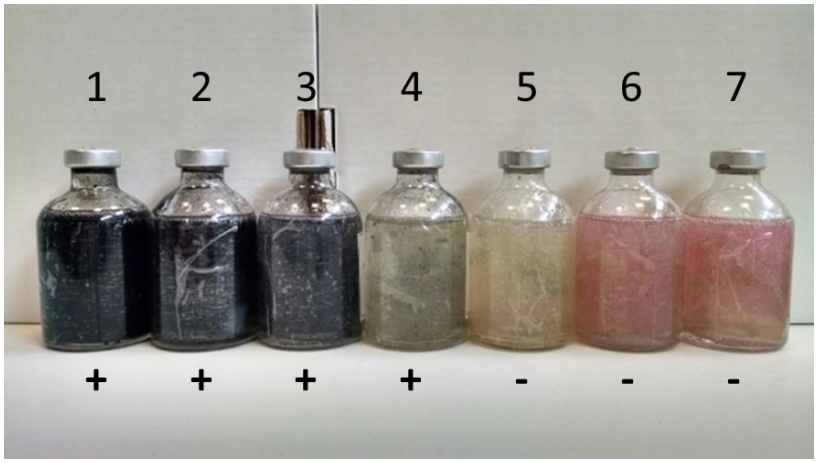

Figura (b). Resultado de um ensaio de concentração mínima inibitória (CMI) para BRS-m.

Eventualmente, caso não seja detectado crescimento no controle (frasco sem biocida) no tempo de 24 h, os frascos devem permanecer incubados por mais tempo (normalmente até 72h) e deverá ser considerado como CMI o resultado observado no menor tempo em que o controle de fato se tornou positivo, garantindo que houve crescimento adequado da cultura microbiana.

O valor da CMI é determinado para cada uma das culturas avaliadas e corresponde ao menor valor dentre as concentrações testadas em que não houve crescimento microbiano no tempo avaliado.

Tomando-se como exemplo a Figura (c) a seguir, a CMI seria de 200 ppm do produto avaliado, pois houve crescimento microbiano em todos os frascos até a concentração de 100 ppm.

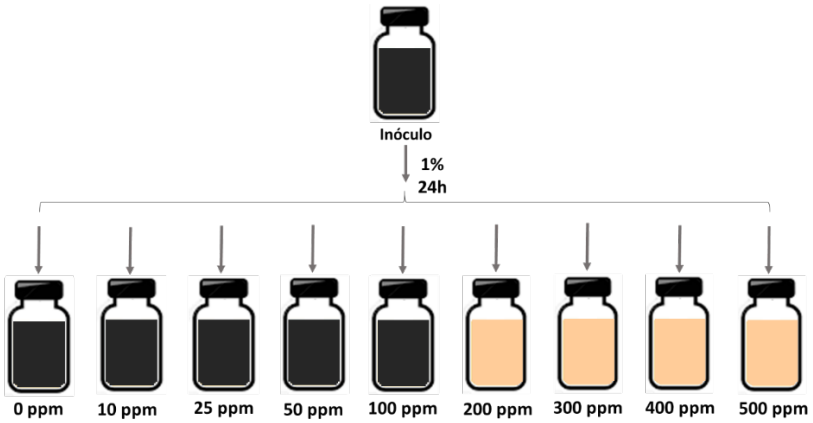

Figura (c). Exemplo de resultado de um ensaio de concentração mínima inibitória (CMI) para BRS-m no qual o valor da CMI foi de 200 ppm.

Todos os procedimentos, desde o preparo das soluções de biocida, preparo do inóculo, até a inoculação dos frascos de teste, devem ser realizados em cabine de segurança biológica de modo a evitar contaminações durante os procedimentos e tanto a transferência dos inóculos, quanto a dosagem das diferentes concentrações de biocida, devem ser realizadas com a utilização de agulha e seringa, para que os frascos não sejam abertos e preservem a condição anaeróbia ao máximo.

A CMI para um mesmo produto biocida pode variar quando são utilizadas culturas mistas em função de sua origem e consequentemente da diversidade microbiana recuperada naquele meio de cultura. Por outro lado, a determinação da CMI utilizando-se culturas puras possui representatividade muito baixa em relação aos sistemas operacionais reais, portanto, recomenda-se que tanto a CMI quanto os ensaios subsequentes de avaliação da eficiência biocida, sejam realizados com culturas obtidas diretamente do sistema operacional que se pretende aplicar o produto, ou na impossibilidade disto, de cenários operacionais mais próximos possíveis.

Os resultados da CMI podem ser utilizados como referência para a definição das concentrações do produto a serem utilizadas nos ensaios de eficiência biocida subsequentes, nos quais deverá ser realizada a avaliação de ao menos três concentrações, incluindo obrigatoriamente a concentração obtida na CMI e a concentração da dosagem de campo recomendada pelo fornecedor.

Tomando-se novamente a Figura (c) como exemplo e supondo-se que a dosagem de campo recomendada para o produto biocida fosse de 300 ppm, as concentrações do produto biocida a serem avaliadas nos ensaios de eficiência biocida poderiam ser 100, 200 e 300 ppm ou 200, 300 e 400 ppm, a critério do fornecedor, conforme seu próprio conhecimento quanto ao desempenho de seu produto sobre biofilmes.

ANEXO B - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA BIOCIDA

Os ensaios de avaliação da eficiência biocida têm por objetivo avaliar quantitativamente o desempenho do produto biocida e normalmente são avaliados quanto ao seu efeito sobre três aspectos: (1º) nos microrganismos planctônicos, (2º) na inibição da formação de um biofilme e (3º) na remoção de um biofilme pré-formado.

Contudo, considerando que: **(i)** o desempenho sobre os microrganismos planctônicos pode ser inferido, ainda que qualitativamente, a partir dos ensaios de CMI; **(ii)** que os biofilmes são a condição de vida predominante da microbiota, representando cerca de 80 % das células microbianas do ambiente (FLEMMING; WUERTZ, 2019); **(iii)** que os biocidas apresentam baixo poder de penetração nos biofilmes, em função da matriz extracelular, que confere uma barreira de proteção (VIGNERON; HEAD; TSESMETZIS, 2018); e, **(iv)** que nenhum sistema operacional da indústria do petróleo encontra-se totalmente isento de biofilmes no momento da dosagem de um biocida; o **resultado mais importante e representativo** para a qualificação de produtos, se refere ao efeito do biocida na **remoção de um biofilme pré-formado**.

Sendo assim, visando minimizar a demanda de ensaios por parte de fornecedores, apenas os ensaios relacionados à remoção do biofilme pré-formado serão obrigatórios e apresentados em detalhes nesse Anexo, ficando a critério do fornecedor, realizar os demais ensaios de desempenho, de modo opcional, se assim desejar, caso tenha interesse em demonstrar alguma característica peculiar de seu produto.

Os ensaios de eficiência biocida podem considerar a avaliação tanto de produtos de ação rápida, utilizando normalmente tempos de contato de 1 a 24 h, quanto produtos denominados de preservantes, utilizando geralmente, tempos de contato de 1 a 7 dias. Contudo, dada a natureza de ação rápida do produto biocida padrão de referência, o THPS 75 %, os ensaios de eficiência biocida aqui descritos consideram a realização obrigatória, apenas nos tempos de contato de 4 e 24h, ficando à critério do fornecedor realizar testes adicionais se pertinentes às características de seu produto.

O princípio dos ensaios de eficiência biocida consiste na quantificação dos microrganismos do biofilme que permaneceram aderidos a um cupom metálico, após os tempos de contato com o biocida. As condições de teste onde o biocida é dosado são comumente chamadas de **"teste sensor"**.

A quantificação microbiana do biofilme deve ser realizada no mínimo para o grupo de BRS-m pelo método do NMP, conforme descrito no **Anexo B.6**, expresso pela área do cupom em cm^2 (NMP/cm^2). Grupos microbianos adicionais, bem como técnicas de quantificação adicionais, poderão ser empregadas a critério do fornecedor.

Os ensaios deverão ser realizados em triplicata, utilizando água do mar (sintética ou natural), estéril, desaerada, contendo no mínimo as seguintes condições: **(i)** controle biológico do biofilme pré-formado, onde não há a adição de biocidas; **(ii)** teste sensor 1, utilizando o biocida de referência, o THPS 75 %, na dosagem de 200 ppm; **(iii)** teste sensor 2; **(iv)** teste sensor 3; e, **(v)** teste sensor 4, respectivamente, nas 3 concentrações selecionadas conforme citado anteriormente no **Anexo A**. Sendo assim, a avaliação de um produto biocida deverá compreender no mínimo 5 condições de teste, conforme apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Matriz indicando os componentes das condições de teste de cada frasco para a montagem dos ensaios de eficiência biocida na remoção do biofilme pré-formado.

CONDIÇÃO DE TESTE		ÁGUA DO MAR ESTÉRIL	CUPOM COM BIOFILME PRÉ-FORMADO	PRODUTO BIOCIDA
I.	Controle biológico do biofilme pré-formado	+	+	-
II.	Teste sensor do biofilme pré-formado 1 (THPS 200ppm)	+	+	+
III.	Teste sensor do biofilme pré-formado 2 (biocida na concentração 1)	+	+	+
IV.	Teste sensor do biofilme pré-formado 3 (biocida na concentração 2)	+	+	+
V.	Teste sensor do biofilme pré-formado 4 (biocida na concentração 3)	+	+	+

Os cupons contendo o biofilme pré-formado devem ser preparados conforme os procedimentos descritos nos itens 3 e 4. Após o tempo de crescimento microbiano, os cupons contendo o biofilme pré-formado devem seguir o seguinte procedimento, sempre em câmara de segurança biológica e sob purga de gás nitrogênio (N_2) estéril:

(i) Abrir os frascos de cultivo do biofilme e transferir cada cupom, tomando cuidado para não danificar o biofilme, para um respectivo frasco de lavagem, contendo solução salina redutora, estéril e desaerada, preparada conforme Anexo B.8;

(ii) Lavar o cupom na solução salina redutora, mergulhando e retirando o cupom completamente do líquido, por 3 vezes seguidas, para remoção das células que não estão fortemente aderidas integrando o biofilme;

(iii) Transferir o cupom para o seu respectivo frasco de contato do teste de eficiência biocida, o qual deve conter, nesse momento, apenas água do mar (natural ou sintética), estéril e desaerada;

(iv) Após selar todos os frascos, dosar os biocidas em suas respectivas concentrações de teste, em todos os frascos e iniciar a contagem do tempo de contato;

(v) Após 4 e 24h de contato, transferir cada cupom para seu respectivo frasco, contendo solução salina redutora e proceder a lavagem do cupom tal como realizado anteriormente;

(vi) Transferir o cupom para um novo frasco contendo solução salina redutora, purgar com N_2 e lacrar o frasco;

(vii) Sonicar os frascos contendo os cupons e proceder à quantificação do biofilme pela técnica do NMP, conforme descrito nos itens 8.

ANEXO B.1 - PREPARO DE CUPONS METÁLICOS

Os cupons metálicos a serem utilizados nos ensaios de eficiência biocida, podem ser de aço carbono C 1020. Normalmente, são utilizados cupons nas dimensões de 4,0 × 1,0 × 0,2 cm (altura × largura × espessura) pois os frascos de teste geralmente utilizados, são os frascos de antibiótico/penicilina de 50

mL, que garantem a anaerobiose e permitem a passagem de cupons com as dimensões citadas acima, pela boca do frasco, sem danificar o biofilme formado, contudo, essas dimensões podem ser variáveis em função do aparato laboratorial disponível, desde que mantidos os requisitos do ensaio.

Os cupons metálicos devem ser previamente jateados. O jateamento normalmente é realizado com esferas de vidro na faixa de 90 a 125 µm. Após o jateamento, os cupons devem ser limpos com acetona para remoção de possíveis resíduos e óleos provenientes da manipulação. Os cupons podem ser então acondicionados em sacos plásticos herméticos sob purga de gás nitrogênio e armazenados em dessecador com sílica gel ou podem simplesmente ser selados a vácuo após a limpeza.

Previamente ao início do crescimento do biofilme, os cupons devem ser esterilizados. A esterilização consiste na disposição dos cupons sobre lenços de papel dentro da câmara de segurança biológica, sob luz ultravioleta (UV) e sob fluxo de gás N_2 estéril, por 60 min, em cada lado do cupom. Os cupons metálicos esterilizados podem ser embrulhados nos lenços de papel e armazenados em dessecador com sílica gel, para mantê-los livre de umidade até a sua efetiva utilização, contudo, é recomendável, que essa esterilização seja feita, preferencialmente, no mesmo dia em que os cupons serão colocados em contato com o inóculo para crescimento do biofilme, não sendo assim necessário um novo armazenamento.

ANEXO B.2 - CRESCIMENTO DO BIOFILME PRÉ-FORMADO SOBRE OS CUPONS METÁLICOS

Previamente ao início dos ensaios de eficiência biocida sobre um biofilme pré-formado, é necessário realizar o crescimento de um biofilme fortemente aderido à superfície do cupom metálico.

Primeiramente, um inóculo da cultura de teste deve ser preparado tal como descrito no Anexo A, para a preparação do inóculo para a avaliação da CMI, ou seja, deve ser realizado um repique de 10 % e 72 h da cultura estoque em incubação a 30 ± 2 °C ou 37 ± 2 °C e realimentação no laboratório.

A cultura utilizada como inóculo nos ensaios de eficiência biocida deverá ser a mesma cultura de BRS-m utilizado nos testes de CMI. Essa cultura deverá ser quantificada no momento da inoculação e deverá apresentar uma concentração mínima de 10^5 NMP/mL de modo a propiciar a adesão e formação de um biofilme forte e coeso.

Os cupons metálicos, previamente jateados e esterilizados conforme descrito anteriormente no Anexo B.1, devem ser colocados individualmente dentro de frascos do tipo antibiótico/penicilina contendo 45 mL do meio Postgate C modificado, preparado conforme descrito no Anexo B.3, em salinidade de água do mar.

Os cupons devem apresentar um orifício em uma das extremidades por onde pode ser amarrado um fio de nylon estéril, permitindo que o cupom seja então pendurado no frasco através do septo de borracha com a ajuda de uma agulha. Esse procedimento deve ser realizado em cabine de segurança biológica e sob purga de gás nitrogênio estéril para minimizar a exposição ao oxigênio.

Os frascos devem ser então lacrados, inoculados com a cultura e colocados em incubação a 30 ± 2 °C ou 37 ± 2 °C por um período de no mínimo 7 dias, para se obter um biofilme com concentração de no mínimo 10^5 NMP/cm^2. Caso necessário, a depender da atividade da cultura microbiana, os frascos podem ser incubados por mais tempo, para se obter a concentração de biofilme mínima requerida.

Eventualmente, culturas mistas de BRS-m sozinhas podem apresentar baixa atividade e crescimento lento do biofilme, nesse caso, recomenda-se a utilização conjunta de culturas mistas de BRS-m e de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT), preferencialmente provenientes do mesmo sistema operacional, preparadas no meio de cultivo de BANHT conforme descrito no Anexo B.9, a fim de favorecer e acelerar a formação do biofilme. Nesse caso, a inoculação dos frascos contendo o meio Postgate C modificado e os cupons para início do crescimento do biofilme, pode ser feita com 10 % ou até 20 % do volume total do frasco, sendo metade de cada cultura.

ANEXO B.3 - MEIO POSTGATE C MODIFICADO

O meio de cultura tradicionalmente utilizado para o cultivo de inóculos e para o crescimento de biofilmes de BRS-m em cupons metálicos é o meio denominado de **Postgate C** (POSTGATE, 1984) **modificado**, o qual possui menor concentração de ferro, evitando assim a transferência de FeS durante a inoculação e a deposição acentuada desse FeS nos cupons metálicos onde o biofilme será formado.

A incubação padrão é realizada na temperatura de 30 ± 2 ºC ou 37 ± 2 ºC. O preparo do meio modificado consiste na: **(i)** utilização de **água do mar sintética ou natural** e **(ii)** substituição do ácido tioglicólico por uma solução de **tioglicolato de sódio.**

A água do mar apresenta uma salinidade em torno 3,5 % (35,0 g/L) e deve ser ajustada com cloreto de sódio (NaCl) para a salinidade da cultura microbiana que se pretende avaliar (aceitando-se uma variação em torno de 2,5 g/L). Para o cálculo da massa de NaCl a ser adicionada, utiliza-se a equação abaixo:

$$mNaCl = [(Sd - Sa) - 0{,}03] \times 0{,}913$$

Onde: mNaCl é a massa de NaCl a ser adicionada por litro de meio, em g;
Sd é a salinidade desejada, em g/L;
Sa é a salinidade da água utilizada no procedimento, em g/L.

Nos casos em que a salinidade da amostra é menor que a da água do mar, deve ser utilizada água destilada como base para a preparação e adicionado o NaCl para adequação da salinidade, contudo, para amostras com salinidade abaixo de 0,8 % (8,0 g/L) não há a necessidade de adição de NaCl, uma vez que os sais utilizados na composição do meio já conferem essa salinidade mínima.

A substituição do ácido tioglicólico pelo tioglicolato de sódio deve-se ao fato de que em alta temperatura o ácido tioglicólico enegrece o ferro presente no meio, podendo ocasionar falsos positivos na detecção e quantificação de BRS (SANTOS, 2018). O tioglicolato de sódio atua como agente redutor do meio de cultura e juntamente com citrato de sódio, permite que se alcance um potencial de oxirredução (ORP) abaixo de -100 mV, ideal para o metabolismo das BRS (BHATTACHARYA; UBEROI; DRONAMRAJU, 1996; NEVIUS; BAGWELL; BRIGMON, 2004).

O procedimento de preparo do meio Postgate C modificado, bem como dos demais meios de cultura anaeróbios, levam em consideração a necessidade de preparo de grandes volumes normalmente requeridos para quaisquer análises de rotina na indústria do petróleo. Portanto, se tratam de variações dos métodos convencionais de preparo de meios de cultura para anaeróbios estritos (ARANKI; FRETER, 1972; HUNGATE, 1969; MOORE, 1966), os quais foram adequados de modo a se tornarem viáveis e exequíveis em larga escala laboratorial. Dentre estas adequações estão: **(i)** a utilização dos frascos do tipo antibiótico/penicilina com purga do *headspace* ao invés dos tubos do tipo *Hungate* e utilização de câmara de anaerobiose (MILLER; WOLIN, 1974); e **(ii)** a realização de purga com N_2 diretamente no meio de cultura em preparação, para obtenção da anoxia (FEIO et al., 1998; STROBEL, 2009).

Estas alternativas foram sendo desenvolvidas, testadas para situações reais e aprimoradas ao longo do tempo, visando manter a representatividade necessária para um monitoramento de campo adequado e correlacionado aos problemas operacionais. Além disso, são historicamente aplicadas e se adequam aos mais diversos tipos de amostras da indústria do petróleo, de modo que ainda hoje, são as técnicas mais empregadas por todas as empresas de petróleo e empresas desenvolvedoras e fornecedoras de produtos biocidas e isso, apesar de serem baseadas em cultivo, que possuem limitações de detecção inerentes à própria técnica.

A seguir, segue a descrição do procedimento de preparo do meio Postgate C modificado:

(i) Adicionar de 900 mL a 4.500 mL de água em um recipiente com capacidade adequada ao volume de meio que se pretende preparar. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo

entrada e saída para conexão de uma purga de gás N_2. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;

(ii) Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;

(iii) Conectar uma purga de N_2 de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;

(iv) Manter a purga de N_2 durante todo o tempo de preparo e envaze, de modo a garantir um meio anóxico (com O_2 abaixo de 0,1 ppm);

(v) Adicionar os componentes do meio seguindo a sequência apresentada na Tabela 2. O lactato de sódio, o sulfato de ferro(II) e a resazurina devem ser adicionados por último para evitar precipitações e eventuais contaminações;

(vi) Ajustar o pH para 7,6 ± 0,2 com NaOH 1 N ou HCl 1 N;

(vii) Transferir a solução para uma proveta ou balão volumétrico e completar o volume para 1.000 mL com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada com purga de gás N_2;

(viii) Distribuir o meio em frascos do tipo antibiótico/penicilina sob purga de N_2 com o auxílio de uma bomba peristáltica;

(ix) Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);

(x) Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm e então resfriar sob temperatura ambiente. Após a esterilização a cor do meio pode variar de incolor a levemente rosa. Caso apresente aspecto alaranjado e/ou com pontos de enegrecimento após a autoclavação, o meio deve ser descartado;

(xi) Após o resfriamento dos frascos autoclavados, adicionar uma solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v) conforme Anexo B.5, dentro de câmara de segurança biológica, para evitar a contaminação do meio. Para frascos de 50 mL, adicionar 0,5 mL de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio no meio seja de 0,124 g/L;

Tabela 2. Componentes do meio de cultura Postgate C modificado, para ensaios de concentração mínima inibitória (CMI) e crescimento de biofilmes em cupons metálicos, para ensaios de eficiência biocida, com Bactérias Redutoras de Sulfato Mesófilas (BRS-m).

COMPONENTE *	QUANTIDADE/L
Sulfato de magnésio hexaidratado – $MgSO_4 \cdot 6H_2O$	0,06 g
Cloreto de amônio – NH_4Cl	1,0 g
Sulfato de sódio – Na_2SO_4	4,5 g
Cloreto de cálcio hexaidratado – $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,06 g
Extrato de levedura	1,0 g
Fosfato monobásico de potássio – KH_2PO_4	0,5 g
Citrato de sódio heptaidratado – $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 7H_2O$	0,3 g
Sulfato de ferro(ii) heptaidratado – $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,004 g
Lactato de sódio 50 % (m/v)	9,4 mL
Resazurina 0,025 % (m/v)	4,0 mL

* Os componentes são apresentados na tabela em sua ordem de adição durante o preparo.

A resazurina é utilizada como um indicador de oxirredução que apresenta coloração fortemente rosa quando oxidado e mantêm uma coloração transparente quando é reduzido em completa anaerobiose ou levemente rosa quando em condição anóxica, sendo assim, os meios de cultura normalmente representativos de condições de campo, costumam apresentar a coloração levemente rosa, que se refere a uma condição de O_2 abaixo de 0,1 ppm.

Os meios de cultura preparados dessa forma podem ser armazenados em temperatura ambiente, e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

ANEXO B.4 - MEIO POSTGATE E MODIFICADO

O meio de cultura denominado de **Postgate E** (POSTGATE, 1984) **modificado** é tradicionalmente utilizado nos ensaios de CMI para BRS-m e para detecção e quantificação de BRS-m pelo método do NMP na indústria do petróleo.

A incubação padrão é realizada na temperatura de 30 ± 2 ºC ou 37 ± 2 ºC por um período de 28 dias. O preparo do meio modificado consiste nas mesmas alterações descritas anteriormente no **Anexo B.3** para o meio Postgate C, ou seja, **(i)** utilização de **água do mar sintética ou natural** e **(ii)** substituição do ácido tioglicólico por uma solução de **tioglicolato de sódio**, contudo, deve ser feita também a **(iii)** adição de **ágar-ágar** para obtenção de um meio semi-sólido.

O ágar-ágar é adicionado com o objetivo de favorecer a detecção de bactérias que necessitam de uma superfície de adesão para seu crescimento, as quais são características de sistemas susceptíveis a biocorrosão (SURINACH, 1987). Essa pequena quantidade de ágar-ágar também ajuda a manter um potencial de oxirredução baixo, através da estabilização do meio contra correntes de convecção, mantendo por isso, a anoxia nas zonas mais profundas do meio (LABORCLIN, 2019).

O procedimento de preparo do meio Postgate E modificado segue os mesmos princípios e etapas apresentadas anteriormente para o meio Postgate C, contudo, existem pequenas diferenças na sua composição (**Tabela 3**) e os seguintes diferenciais no procedimento de preparo devem ser considerados:

Tabela 3. Componentes do meio de cultura Postgate E modificado para realização de ensaios de concentração mínima inibitória (CMI) com Bactérias Redutoras de Sulfato Mesófilas (BRS-m) e sua quantificação pelo método de NMP.

COMPONENTE *	QUANTIDADE/L
Cloreto de magnésio hexaidratado – $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,83 g
Cloreto de amônio – NH_4Cl	1,0 g
Sulfato de sódio – Na_2SO_4	1,0 g
Cloreto de cálcio hexaidratado – $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Fosfato monobásico de potássio – KH_2PO_4	0,5 g
Ácido ascórbico – $C_6H_8O_6$	0,1 g
Sulfato de ferro(ii) heptaidratado – $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Lactato de sódio 50 % (m/v)	7,0 mL
Resazurina 0,025 % (m/v)	4,0 mL

* Os componentes são apresentados na tabela em sua ordem de adição durante o preparo.

(i) Antes da adição dos componentes do meio, adicionar 1,9 g/l de ágar-ágar ao recipiente pré-aquecido sob agitação até sua completa dissolução;

(ii) Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 24 frascos de 10 mL, nos quais são adicionados 9 mL do meio e 2 frascos de 50 mL nos quais são adicionados 45 mL do meio, os quais são introduzidos para se obter uma análise indireta da atividade das BRS-m, conforme procedimento apresentado no Anexo B.7;

(iii) Após a esterilização, parte do ágar-ágar presente no meio continua na forma de flocos, porém, a mesma cor é mantida, variando de incolor a levemente rosa;

(iv) Na etapa de adição da solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v), para frascos de 10 mL, adicionar 0,1 mL e para os frascos de 50 mL, adicionar 0,5 mL de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio no meio seja de 0,124 g/L;

(v) Agitar vigorosamente os frascos de forma a deixar os flocos de ágar-ágar em suspensão.

Os meios de cultura preparados dessa forma, assim como os respectivos kits de quantificação, também podem ser armazenados em temperatura ambiente e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

Quanto à detecção do crescimento microbiano no meio Postgate E modificado, um frasco é considerado positivo quando se torna totalmente negro, ou quando se torna acinzentado com pontos negros. Essa coloração negra se refere a precipitados de FeS, resultantes da reação do sulfeto de hidrogênio (H_2S) gerado pelas BRS-m, com o ferro proveniente do sulfato de ferro utilizado no meio.

ANEXO B.5 - SOLUÇÃO DE TIOGLICOLATO DE SÓDIO

A solução de tioglicolato de sódio a 1,24 % (m/v), ou seja, 12,4 g/L (Tabela 4), faz parte da composição dos meios de cultura para microrganismos anaeróbicos e deve ser adicionada somente após a autoclavação do meio para evitar precipitação.

Conforme citado anteriormente, o tioglicolato de sódio atua como um agente redutor do meio de cultura para garantir o baixo potencial de oxirredução, requerido pelo metabolismo das BRS e demais microrganismos anaeróbicos.

Tabela 1. Composição da solução de tioglicolato de sódio a 1,24 % (m/v).

COMPONENTE	QUANTIDADE
Tioglicolato de sódio	1,24 g
Água destilada	100 mL

O preparo da solução, é feito pela dissolução de 1,24 g do tioglicolato de sódio em 100 mL de água destilada, dentro de frascos do tipo antibiótico de 50 mL ou 100 mL, sob purga de gás N_2. O frasco é lacrado com septo de borracha e selo de alumínio e esterilizado em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm. Após a autoclavação e resfriamento, a solução é transferida para os frascos já esterilizados contendo o restante do meio de cultura com a utilização de uma seringa de 1 mL.

ANEXO B.6 - TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

A metodologia de quantificação microbiana conhecida por técnica do número mais provável (NMP) ou *most probable number* (MPN) é um conceito antigo, desenvolvido inicialmente para interpretar numericamente o crescimento de bactérias fermentativas em tubos múltiplos (MCCRADY, 1915).

Posteriormente foi amplamente adotada, de modo padronizado e aplicada para a quantificação de inúmeros tipos de microrganismos cultivados em meio líquido. Atualmente, ainda é de longe o método mais utilizado para detecção e quantificação de diferentes grupos microbianos pela indústria do petróleo e pela indústria química desenvolvedora e fornecedora de produtos biocidas (BHAGOBATY, 2014), onde é também comumente chamada de "*bug bottles*" (FICHTER et al., 2015).

A técnica do NMP é o método obrigatório em praticamente todas as normas técnicas vigentes da *ASTM (American Society for Testing and Materials) International* e da *NACE* (*National Association of Corrosion Engineers*) *International,* para o monitoramento de comunidades microbianas relacionadas à biocorrosão na indústria do petróleo (SKOVHUS; ECKERT; RODRIGUES, 2017).

A técnica do NMP tem por objetivo estimar numericamente a densidade de microrganismos em uma amostra líquida, independente de se realizar uma contagem direta, pois diluições da amostra são inoculadas em frascos múltiplos contendo o meio de cultura líquido, os quais são incubados ao longo do tempo e verifica-se visualmente o crescimento dos microrganismos em função de alterações de coloração de indicadores e/ou produção de metabólitos no meio (COCHRAN, 1950; CORNELL; SPECKMAN, 1967; HARRIGAN, 1998; OBLINGER; KOBURGER, 1975).

A estimativa de densidade microbiana pela técnica do NMP baseia-se no princípio de probabilidade, fundamentada em dois pressupostos principais: (i) a distribuição randômica dos microrganismos em uma amostra líquida homogeneizada, ou seja, um microrganismo possui a mesma probabilidade de estar presente em qualquer volume da amostra, não existindo qualquer tendência ao agrupamento ou à repulsão entre as células; e, (ii) a capacidade de um único microrganismo exibir crescimento no meio utilizado, ou seja, se ao menos uma célula viável cultivável para o meio utilizado, estiver presente no volume amostral coletado, ao ser incubado, esse microrganismo será capaz de crescer ao ponto de demonstrar visualmente, em ao menos uma diluição, seu crescimento pelo princípio do meio de cultura utilizado (COCHRAN, 1950; CORNELL, 2006; GONZÁLEZ, 1996; WOODWARD, 1957).

Portanto, a técnica do NMP é um método dependente de cultivo que se baseia no princípio da diluição seriada até a extinção (OBLINGER; KOBURGER, 1975). A Figura (d) ilustra esquematicamente o princípio de diluição e inoculação do método conforme as seguintes etapas:

(i) Uma alíquota da amostra, no fator de 1:10, é inoculada em triplicata em frascos contendo o meio de cultura líquido para o tipo de microrganismos em avaliação;

(ii) Outra alíquota da amostra é diluída serialmente, no fator de 1:10, em frascos contendo solução salina adequada ao tipo de microrganismo em avaliação (no caso de microrganismos anaeróbios, utiliza-se uma solução salina redutora, cujo preparo encontra-se detalhado no Anexo B.8);

(iii) As diluições são inoculadas em triplicata em frascos contendo o mesmo meio de cultura líquido;

(iv) Esse conjunto de frascos é então incubado na temperatura adequada e pelo período padronizado para o tipo de microrganismo em avaliação;

(v) O crescimento microbiano em cada frasco é acompanhado e anotado diariamente segundo o princípio de detecção de cada tipo de microrganismo;

(vi) Após o período de incubação a combinação dos resultados de frascos positivos e negativos, são avaliados em comparação à tabela de probabilidade estatística do método (HARRIGAN, 1998; MAN, 1977), a partir da qual, a estimativa de densidade celular é dada na unidade de NMP/mL.

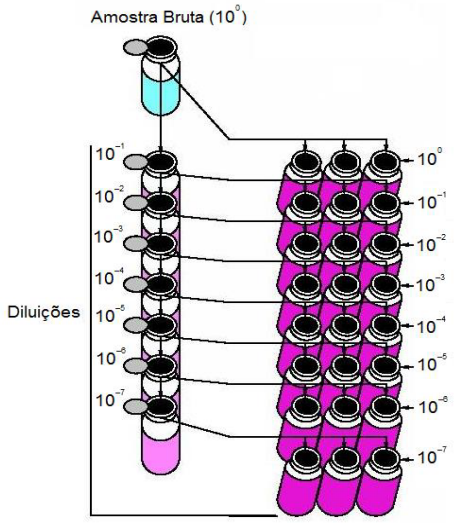

Figura (d). Representação esquemática das diluições e inoculações da amostra nos frascos de um kit de quantificação pela técnica do número mais provável (NMP).

Em amostras de sistemas operacionais da indústria do petróleo, as estimativas de NMP/mL geralmente se encontram na faixa de ≥ 10^0 até ≤ 10^7, por esta razão, os kits de quantificação microbiológica normalmente são compostos por 7 frascos de diluição e 24 frascos com meio de cultura, conforme ilustrado nas **Figura (e).**

De modo geral, na maior parte dos problemas associados à presença de microrganismos indesejados na indústria do petróleo, o nível de contaminação microbiana pode ser classificado conforme a **Tabela 5**.

(I)

(II)

Figura (e). (I) Kit de quantificação microbiológica utilizado no monitoramento de rotina de campo na indústria do petróleo. (II) Distribuição dos frascos no interior do kit.

Tabela 5. Classificação do nível de contaminação microbiana em função da quantificação microbiológica pela técnica do NMP.

QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DO NMP	NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO
≥ 10^6	Altíssima
10^5	Muito alta
10^4	Alta
10^3	Média
10^2	Baixa
10^1	Muito baixa
≤ 100	Baixíssima

A técnica do NMP também é utilizada para a quantificação de amostras de resíduos, bem como de biofilmes em superfícies. No caso de resíduos, eles devem ser coletados em frascos cuja massa tenha sido previamente aferida e registrada. Após a coleta, o frasco é pesado novamente, para que a estimativa do NMP possa ser convertida para a massa total de resíduo, ou seja, em NMP/g. Já no caso de coleta em superfícies de equipamentos e estruturas, a área superficial amostrada deve ser medida e no caso de uma amostra de cupom, deve-se conhecer a área superficial do cupom, de modo que a estimativa do NMP seja convertida para NMP/cm^2.

Para a quantificação em cupons, eles devem ser coletados em frascos contendo solução salina redutora (normalmente utilizam-se os frascos do tipo antibiótico de 50 mL) e em seguida sonicados em ultrassom, em 3 ciclos de 1 min, a 40 Hz e 135 W, para desprendimento do biofilme aderido ao cupom. Então, o fluido contendo os microrganismos é submetido à quantificação por NMP, convertendo-se o valor obtido em mL para a área em cm^2 do cupom.

ANEXO B.7 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE BRS-m

A atividade de BRS-m é uma medida indireta qualitativa do potencial de geração de H_2S pela comunidade microbiana de determinada amostra, obtida a partir da avaliação dos frascos qualitativos de

um kit de quantificação de BRS-m por NMP. Essa análise pressupõe que nem sempre maiores concentrações celulares na amostra significam maior produção de H_2S, assim como, permite detectar qualitativamente a presença de BRS-m mesmo em amostras cujo resultado de NMP/mL esteja abaixo do limite mínimo de detecção da técnica.

A determinação da atividade de BRS-m na amostra, consiste na inoculação de dois frascos de 50 mL presentes no kit de quantificação, denominados frascos qualitativos. Esses dois frascos são preparados com o mesmo meio de cultura, Postgate E modificado, seguindo o mesmo procedimento de preparo dos demais frascos de 10 mL do kit e são inoculados com 5 mL (10 % v/v) da amostra em processamento.

Esses frascos são acompanhados diariamente quanto ao crescimento microbiano de modo a se determinar, dentro dos 28 dias de incubação, qual foi o dia em que os frascos se tornaram positivos. O valor da atividade corresponde ao tempo total de incubação (28 dias), dividido pelo tempo em que os frascos apresentaram crescimento positivo, conforme o cálculo da equação abaixo e valores de classificação da atividade de BRS (em alta, média ou baixa) conforme apresentado na Tabela 6.

$$\text{ATIVIDADE DE BRS} - \text{m} = \frac{28\ (\text{dias})}{\text{CRESCIMENTO POSITIVO (dias)}}$$

Tabela 6. Classificação da atividade de BRS-m pela análise dos frascos qualitativos do kit de quantificação.

ATIVIDADE DE BRS-m	VALOR
Alta	> 4,00
Média	1,34 A 4,00
Baixa	≤ 1,33

Deste modo, além da estimativa da densidade celular, é possível analisar comparativamente amostras que apresentam densidades semelhantes, porém atividades de BRS-m (potencial geração de H_2S) distintas ou vice-versa. Além disso, em muitos casos, amostras que não apresentam crescimento no primeiro conjunto de frascos de 10 mL inoculados, podem se tornar positivas nos frascos qualitativos de 50 mL, permitindo detectar a presença das BRS-m naquela amostra, ainda que a quantificação esteja abaixo do limite de detecção do método.

Dessa forma, o kit de quantificação de BRS-m pela técnica do NMP, além da determinação da densidade, permite uma análise comparativa de amostras quanto ao potencial de geração de H_2S por aquela comunidade microbiana e, portanto, um melhor diagnóstico do problema em campo e/ou ensaio laboratorial em execução.

ANEXO B.8 - SOLUÇÃO SALINA REDUTORA

A solução salina redutora é a solução utilizada tanto para realizar a diluição seriada das amostras destinadas à técnica do NMP, quanto para a coleta de resíduos, biofilmes e cupons, quando se pretende fazer a avaliação de microrganismos anaeróbios nessas amostras.

As etapas de preparo da solução salina redutora consistem em:

(i) Adicionar cerca de 500 mL de água em um recipiente com volume útil igual ou superior a 1.000 mL. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de N_2. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser avaliada;

(ii) Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;

(iii) Conectar uma purga de N2 de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;

(iv) Manter a purga de N_2 durante todo o tempo de preparo e envaze, de modo a garantir um meio anóxico (com O_2 abaixo de 0,1 ppm);

(v) Adicionar os componentes da solução apresentados na Tabela 7 a seguir e aguardar sua completa dissolução homogeneização;

Tabela 7. Composição da solução salina redutora.

COMPONENTE	QUANTIDADE/L
Tioglicolato de sódio	0,124 g
Ácido ascórbico	0,1 g
Resazurina (0,025 %, m/v)	4,0 mL

(vi) Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N_2;
(vii) Completar o volume para 1.000 mL com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N_2;
(viii) Ajustar o pH para 7,6 ± 0,2 com NaOH 1 N ou HCl 1 N;
(ix) Distribuir a solução em frascos do tipo antibiótico/penicilina, sob purga de N2, com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 7 frascos de 10 mL, nos quais são adicionados 9 mL da solução;
(x) Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);
(xi) Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm.

ANEXO B.9 - MEIO DE CULTURA PARA BANHT

O meio de cultura normalmente utilizado para detecção e quantificação de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT) na indústria do petróleo é um meio rico, não definido, que contém fontes de carbono reduzido (HARRIGAN, 1998).

Tal como o meio Postgate E modificado, para melhor representatividade dos sistemas operacionais, o cultivo é realizado em condições anaeróbias (O_2 abaixo de 0,1 ppm). A incubação padrão é realizada na temperatura de 30 ± 2 °C ou 37 ± 2 °C por um período de 28 dias.

Em relação ao meio tradicional, o preparo do meio pra BANHT para a indústria do petróleo também consiste na: (i) utilização de água do mar sintética ou natural e (ii) substituição do ácido tioglicólico pela solução de tioglicolato de sódio.

As etapas de preparo do meio BANHT consistem em:

(i) Adicionar cerca de 500 mL de água em um recipiente com volume útil igual ou superior a 1.000 mL. Utilizar preferencialmente um Erlenmeyer com rolha contendo entrada e saída para conexão de uma purga de gás N_2. O tipo de água utilizada deve estar de acordo com a salinidade da amostra a ser cultivada;
(ii) Colocar o recipiente com água em placa sob aquecimento e agitação magnética;
(iii) Conectar uma purga de N_2 de modo que o gás seja borbulhado no fundo do recipiente, diretamente no líquido;
(iv) Manter a purga de N_2 durante todo o tempo de preparo e envaze, de modo a garantir um meio anóxico (com O_2 abaixo de 0,1 ppm);
(v) Adicionar os componentes do meio na ordem em que são apresentados Tabela 8 abaixo e aguardar sua completa dissolução;

Tabela 8. Componentes do meio de cultura para cultivo e quantificação de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT).

COMPONENTE	QUANTIDADE/L
Glicose	5,0 g
Peptona universal	4,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Resazurina 0,025 % (m/v)	4,0 mL

(vi) Transferir o volume para uma proveta ou balão volumétrico, mantendo a purga de N_2;

(vii) Completar o volume para 1.000 mL com o mesmo tipo de água utilizada, previamente desaerada também através da purga de N_2;

(viii) Ajustar o pH para 7,6 ± 0,2 com NaOH 1 N ou HCl 1 N;

(ix) Distribuir o meio em frascos do tipo antibiótico sob purga de N_2 com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para o preparo de kits de quantificação são utilizados 24 frascos de 10 mL, nos quais são adicionados 9 mL do meio;

(x) Tampar imediatamente os frascos com septos de borracha e selar com selos de alumínio com a utilização de lacrador (manual ou automático);

(xi) Esterilizar em autoclave por 15 min, a 121 °C e 1,1 atm;

(xii) Após a esterilização, deixar resfriar em temperatura ambiente;

(xiii) Após o resfriamento, adicionar uma solução de tioglicolato de sódio 1,24 % (m/v) dentro de câmara de segurança biológica, para evitar a contaminação do meio. Para frascos de 10 mL, adicionar 0,1 mL, de modo que a concentração final de tioglicolato de sódio seja de 0,124 g/L;

(xiv) Após a adição do tioglicolato de sódio, o meio está pronto para uso. O meio apresenta aspecto translúcido e coloração levemente rósea-amarelada, caso apresente leve coloração alaranjada ou enegrecida, deve ser descartado.

Os meios de cultura preparados dessa forma, assim como os respectivos kits de quantificação, podem ser armazenados em temperatura ambiente e recomenda-se que sejam utilizados em um período de no máximo 3 meses, desde que não sejam observadas alterações em seu aspecto visual.

Quanto à detecção do crescimento microbiano no meio para BANHT, um frasco é considerado positivo quando é possível notar turbidez devido à biomassa microbiana, normalmente observada no fundo do frasco e que se dispersa em forma de espiral quando o frasco é agitado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANKI, A.; FRETER, R. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. **The American journal of clinical nutrition**, v. 25, n. 12, p. 1329–1334, 1972.

BHAGOBATY, R. K. Culture dependent methods for enumeration of sulphate reducing bacteria (SRB) in the Oil and Gas industry. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 11–16, 2014.

BHATTACHARYA, S. K.; UBEROI, V.; DRONAMRAJU, M. M. Interaction Between Acetate Fed Sulfate Reducers and Methanogens. **Water Research**, v. 30, n. 10, p. 2239–2246, 1996.

COCHRAN, W. G. Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number". **Biometrics**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 1950.

CORNELL, R. G.; SPECKMAN, J. A. Estimation for a Simple Exponential Model. **Biometrics**, v. 23, n. 4, p. 717–737, 1967.

CORNELL, R. G. Most Probable Number Counts. Em: KOTZ S, READ CB, BALAKRISHNAN N, V. B. (Ed.). **Encyclopedia of Statistical Sciences**. John Wiley and Sons Ltd, 2006.

FEIO, M. J. et al. Isolation and characterisation of a novel sulphate-reducing bacterium of the Desulfovibrio genus. **Anaerobe**, v. 4, n. 2, p. 117–130, 1998.

FICHTER, J. et al. **Direct Comparison of Microbial Population Analysis Using ATP Quantification, Culture Based Enumeration in Bug Bottles, Epifluorescence Microscopy and Shotgun Population Analysis by Sequencing 16S Amplicons**. CORROSION 2015 - Paper Number: NACE-2015-5555. **Anais**. Dallas, Texas, USA: 2015.

FLEMMING, H. C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247–260, 2019.

GONZÁLEZ, J. M. A general purpose program for obtaining most probable number tables. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 3, p. 215–218, 1996.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3rd. ed. California, USA: Academic Press, 1998.

HUNGATE, R. E. Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. **Methods in Microbiology**, v. 3, n. PART B, p. 117–132, 1969.

LABORCLIN. **TIOGLICOLATO COM INDICADOR**. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, 2019.

MAN, J. C. DE. MPN tables for more than one test. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p. 307–316, 1977.

MCCRADY, M. H. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. **The Journal of Infectious Diseases, Oxford University Press**, v. 17, n. 1, p. 183–212, 1915.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 985–987, 1974.

MOORE, W. E. C. Techniques for routine culture of fastidious anaerobes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 2, p. 173–190, 1966.

NEVIUS, B. A.; BAGWELL, C. E.; BRIGMON, R. L. Characterization of Microbial Communities in TCE-Contaminated Seep Zone Sediments. **JoumaCof the South CaroCinafLcademy of S**, v. 2, p. 25–29, 2004.

OBLINGER, J. L.; KOBURGER, J. A. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique1. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 38, n. 9, p. 540–545, 1975.

POSTGATE, J. R. **The Sulphate Reducing Bacteria.** 2nd. ed. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press,1984.

SANTOS, V. V. C. M. DOS. **EFEITO DO NITRATO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA DE H2S EM RESERVATÓRIOS DE PETRÓLEO**. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ/Brasil, 2018.

STROBEL, H. J. Chapter 16 - Basic Laboratory Culture Methods for Anaerobic Bacteria. Em: **Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. 581p. 247–261, 2009.

SKOVHUS, T. L.; ECKERT, R. B.; RODRIGUES, E. Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—Overview and a North Sea case study. **Journal of Biotechnology**, v. 256, n. Mic, p. 31–45, 2017.

SURINACH, P. P. A New Concept of Treating Surfaces Exposed to Oilfield Water Systems. SPE International Symposium on Oilfield Chemistry - Paper Number: SPE-16262-MS. Anais...San Antonio, Texas: 1987.

VIDELA, H. Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais. Edgard Blucher, 2003.

VIGNERON, A.; HEAD, I. M.; TSESMETZIS, N. Damage to offshore production facilities by corrosive microbial biofilms. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 102, n. 6, p. 2525–2533, 2018.

WOODWARD, R. L. How Probable is the Most Probable Number? Journal American Water Works Association, v. 49, n. 8, p. 1060–1068, 1957.