



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO DE COMUNIDADE MICROBIANA DE BACTÉRIAS
REDUTORAS DE SULFATO *IN VITRO* COM ÁGUA PRODUZIDA
DE PETRÓLEO.**

Luiz Lázaro Franco Batista

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Almeida

Salvador – 2013

Luiz Lázaro Franco Batista

**ESTUDO DE COMUNIDADE MICROBIANA DE BACTÉRIAS
REDUTORAS DE SULFATO *IN VITRO* COM ÁGUA PRODUZIDA
DE PETRÓLEO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Almeida

Salvador – 2013

B333 Batista, Luiz Lázaro Franco.

Estudo de comunidade microbiana de bactérias redutoras de sulfato in vitro com água produzida de petróleo. / Luiz Lázaro Franco Batista. – Salvador, 2013.

74 f.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Bactérias. 2. Sulfato 3. Água. 4. Petróleo. I. Roque, Milton Ricardo de Abreu. II. Almeida, Paulo Fernando. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 579

LUIZ LÁZARO FRANCO BATISTA

**ESTUDO DE COMUNIDADE MICROBIANA DE
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO IN VITRO COM
ÁGUA PRODUZIDA DO PETRÓLEO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 31 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Milton Ricardo de Abreu Roque – Orientador

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia



Josilene Borges Torres Lima Matos

Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.

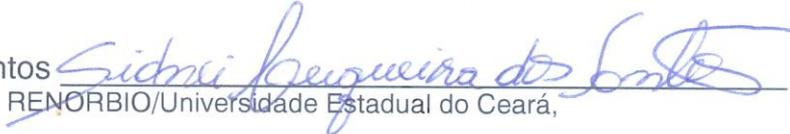
Universidade Federal da Bahia



Sidnei Cerqueira dos Santos

Doutor em Biotecnologia pela RENORBIO/Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil.

Universidade Federal da Bahia



AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a D'us, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais que me criaram e me educaram dentro dos princípios da moral e da ética.

A minha esposa Gil Almeida que teve muita paciência para agüentar os meus momentos de *stress*.

A meu filho que às vezes não entendia porque eu não ia passar o fim de semana com ele.

Aos professores Milton Roque, por ter me convidado e Paulo Almeida por deixar abertas as portas do LABEM.

Gostaria imensamente de agradecer a professora Josilene Matos, que apesar da pouca idade foi uma verdadeira mãe para mim.

As minhas irmãs de Labem, Aldinéia Damião e Brena Moitinho que muito me ajudaram e me incentivaram a continuar quando eu achava que não dava mais.

A Sidnei Cerqueira por ter me apresentado ao Labem, permitido assim o inicio dessa nova etapa da minha vida e pudesse chegar até aqui.

A equipe gestora do Colégio Estadual Ministro Aliomar Baleeiro, que por muitas vezes entendeu os motivos das minhas ausências

Quero também agradecer a toda equipe do Labem: Leila Sousa, Sueli, Roberta Santoro, Luísa Andrade, Jamile Pereira, Hendor, Diana Matos, Fúlvia Sousa e todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a realizar esse trabalho.

Alcinéia Damião, pelo grande apoio durante o desenvolvimento deste trabalho

A PETROBRAS pelo uso das instalações e pelo financiamento das pesquisas com a água produzida

SHALOM

RESUMO

As Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são responsáveis pela corrosão de tubos de metal e estruturas de transporte de óleo em estações de petróleo (corrosão induzida por micro-organismos – CIM). Além da corrosão, a produção de sulfeto de hidrogênio por estas bactérias produz um fenômeno denominado de acidificação do óleo (*souring*). Para inibir a ação das BRS, o glutaraldeído tem sido utilizado em poços de petróleo como biocida, mas seu uso apresenta determinados inconvenientes, tais como contaminação das águas subterrâneas, bem como os efeitos adversos da exposição ocupacional. Como uma alternativa para a utilização de biocidas, a utilização de micro-organismos e/ou os seus bioprodutos para tentar inibir a ação das BRS mostrou-se como uma alternativa ambientalmente mais segura em vários processos industriais, por exemplo, na indústria do petróleo, na qual os micro-organismos e seus bioprodutos (biossurfactantes) podem ser usados na recuperação melhorada de petróleo e como agentes de inibição microbiana. A detecção e quantificação de bactérias redutoras de sulfato (BRS), em poços de petróleo, utilizando-se hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e DAPI (4,6-dicloroamino fenol indol) são ferramentas muito úteis para o controle destas comunidades ao longo de um período de tempo, a fim de avaliar a sua distribuição temporal e espacial. O presente trabalho teve como finalidades: a detecção e quantificação de BRS em amostras de água produzida de petróleo, de modo a avaliar a influência de micro-organismos que produzem biossurfactantes na inibição do crescimento de BRS e, assim, inibir a produção de sulfeto de hidrogênio.

Palavras-chaves - Bactéria redutora de sulfato, água produzida, *souring*, FISH, Surfactante, inibição da biossulfetogênese.

ABSTRACT

The sulfate reducing bacteria (SRB) are responsible for the corrosion of metal pipes and structures for carrying oil in the oil stations (induced by micro -organisms corrosion - CIM). Besides the corrosion, hydrogen sulfide production by these bacteria produce a phenomenon called acidification of the oil (souring). To inhibit the action of SRB, glutaraldehyde has been used in oil wells as a biocide, but its use has certain drawbacks, such as groundwater contamination, as well as the adverse effects of occupational exposure. As an alternative to the use of biocides, the use of micro-organisms and / or their byproducts to try to inhibit the action of SRB was shown as an environmentally safer alternative in various industrial processes, for example in the oil industry, in which micro-organisms and their byproducts (biosurfactants) can be used in enhanced oil recovery and as agents inhibiting microbial recovery. The detection and quantification of sulfate-reducing bacteria (SRB) in oil wells, using fluorescent in situ hybridization (FISH) and DAPI (4,6- dichloroamino indole phenol) are very useful tools for the control of these communities in a period of time in order to assess the temporal and spatial distribution. The present work purposes: the detection and quantification of SRB in samples of produced water from oil in order to evaluate the influence of micro- organisms that produce biosurfactants in inhibiting the growth of SRB and thus inhibit the production of sulfide hydrogen.

Keywords - sulfate reducing bacteria, produced water, souring, FISH, surfactant, inhibition biosulfidogenic.

Sumário

1 – INTRODUÇÃO.....	8
2 – OBJETIVOS	13
Objetivo geral.....	13
Objetivos específicos	13
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 – O POÇO DE PETRÓLEO E A ÁGUA PRODUZIDA	14
3.1.1 – Caracterização do processo de produção de petróleo	14
3.1.2 – A ecologia do poço de petróleo	16
3.1.3. – Método em ecologia microbiana	17
3.2 – METABOLISMO MICROBIANO	19
3.2.3 – Metabolismo visão geral	19
3.2.4 – Metabolismo microbiano aeróbico	19
3.2.5 – Metabolismo microbiano anaeróbico	20
3.3 – BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	21
3.3.1 – Ciclo do enxofre.....	21
3.3.2 – A biologia e eco-fisiologia das bactérias redutoras de sulfato (BRS)	23
3.3.3 – Cultivo e crescimento	24
3.3.4 – Biosulfetogênese e Biocorrosão	25
3.4 – MICRO-ORGANISMOS E BIOPRODUTOS.....	27
3.4.1 – Bioprocessos e bioprodutos.....	27
3.4.2 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e ramnolipídeo.....	30
3.4.3 – <i>Bacillus</i> spp.e surfactina	31
4 - RESULTADOS	32
4.1 - ARTIGO 1.....	33
Detecção e quantificação de bactérias redutoras de sulfato em amostras de água produzida através Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i> (FISH).....	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
Contagem direta de células – DAPI / FISH	37
Análise estatística.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Contagem direta de células – DAPI / FISH	38
Estatística descritiva	40

CONCLUSÃO	41
4.2 - ARTIGO 2.....	42
Estudo de dinâmica microbiana <i>in vitro</i> de linhagens produtoras de surfactante e bactérias redutoras de sulfato em água produzida do petróleo.	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
Triagem dos micro-organismos.....	45
Amostragem e montagem dos microcosmos	46
Contagem direta de células – DAPI / FISH	47
Determinação de parâmetros físico-químicos (Eh/pH)	47
Dosagem de sulfato e sulfeto.....	48
Determinação E ₂₄ (produção de surfactante).....	49
RESULTADOS e DISCUSSÃO	49
Contagem direta de células – DAPI / FISH	49
Determinação de Eh e pH.....	51
Avaliação da produção de substâncias surfactante – teste qualitativo E ₂₄	52
Avaliação do consumo de sulfato e sulfeto X crescimento microbiano.....	53
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIA	59

1 – INTRODUÇÃO

Na indústria de petróleo ocorre a produção de água oriunda do processo de recuperação secundária do óleo, sendo esta água denominada de água produzida ou água de produção. A água destinada à injeção para a recuperação secundária pode ter variada composição, podendo ser: a água doce captada em poços executados para este fim, a água do mar ou a própria água produzida. Esta última contém sal, óleo emulsificado e ainda, durante o processo de separação do petróleo, pode receber produtos químicos como desemulsificantes, anti-espumantes, e também fluidos descartados de outros processos.

A produção excessiva de água nos campos maduros de produção de petróleo, que é o efluente resultante dos processos de separação nas estações coletoras e de tratamento, é um problema sério nos campos de petróleo maduros, isto é, nos campos que têm permanecido em operação por um longo período de tempo, onde a razão água:óleo é muito alta (STEPHENSON, 1992). As águas de produção contêm uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos, cuja composição e quantidade variam em função das características do reservatório e da localização, bem como da idade do poço, do tipo de óleo a ser extraído, e até mesmo, do método de extração desse óleo. Dentre os compostos que compõem as águas produzidas encontram-se: compostos de óleo dispersos e dissolvidos; minerais dissolvidos; produtos químicos usados durante a produção; sólidos produzidos, incluindo produtos de corrosão; micro-organismos; e gases dissolvidos, incluindo CO₂ e H₂S (TELLEZ *et al.*; 2002). Essa água de produção apresenta uma diversidade microbiana grande e muitos desses micro-organismos são de interesse da indústria devido à sua importância no processo de produção do óleo, acarretando danos e prejuízos.

Um dos problemas cruciais dos sistemas *offshore* de exploração de petróleo, que realizam recuperação secundária é a biosulfetogênese ou produção biogênica de sulfeto, realizada por bactérias redutoras de sulfato (BRS). No processo de recuperação secundária, a injeção de água doce ou do mar ou ainda a própria água produzida no interior dos reservatórios com o objetivo de forçar a saída do petróleo da rocha-reservatório, deslocando-o para um poço produtor é bastante utilizada, com a finalidade de estimular a produção de petróleo em campos maduros. Porém, tal processo cursa com a produção biogênica do sulfeto pelas BRS, que estão presentes no material injetado no reservatório (água do mar ou água produzida - reinjeção) (NAGL, 1997). Esses micro-

organismos (BRS), presentes na água injetada no reservatório durante a recuperação secundária (ORPHAN, 2000) podem participar ativamente no processo de corrosão, causando a dissolução do metal através do seu metabolismo, produzindo substâncias corrosivas, às quais podem ser de natureza química diversa, como ácidos, álcalis, sulfeto entre outros, transformando um meio originalmente inerte em agressivo. A corrosão induzida por micro-organismos (CIM), ou seja, a corrosão do material metálico processada sob a influência de micro-organismos tem recebido importante atenção devido às perdas econômicas a ela atribuídas, estando entre os fatores associados à ação bacteriana em superfícies metálicas: presença de sulfeto de hidrogênio (H_2S) contido na água; produção de H_2S pelas bactérias redutoras de sulfato e presença de bactérias oxidantes de enxofre (*Thiobacillus ferrooxidans*) (KERESZTES, FELHOSI & KÁLMÁN, 2001).

As bactérias redutoras de sulfatos (BRS) são comumente encontradas nesse material injetado, em especial quando o material injetado é a própria água produzida nos reservatórios, e causam diversos problemas na indústria do petróleo, podendo ser encontradas tanto na forma planctônica (nadante) como na forma sésil (aderida). As BRS toleram uma ampla faixa de pH de 5,0 a 9,5 e crescem melhor entre temperaturas de 25°C e 35°C, mas alguns poucos gêneros termofílicos crescem em temperaturas superiores a 60°C (PRESTRELO, 2006).

As BRS são micro-organismos que realizam a redução disassimilatória do íon sulfato, na qual este íon atua como agente oxidante para metabolização da matéria orgânica. Nesse processo, apenas uma pequena parcela do enxofre reduzido é assimilada pelos micro-organismos, sendo a maior parte excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a sulfeto de hidrogênio livre (H_2S) (ALMEIDA *et al*, 2009 apud POSTGATE, 1984). A maior parte do H_2S gerado em campos de petróleo origina-se da atividade metabólica das bactérias redutoras de sulfato (BRS) que crescem em anaerobiose (MAUKONEN *et al.*; 2006). Dependendo da concentração produzida, o gás sulfídrico pode causar efeitos diversos à saúde humana, que vão desde a emissão de odores desagradáveis, irritações das vias respiratórias e olhos, até a morte em concentrações maiores que 1000mg/L (ANTUNES & MANO, 2004; MAUKONEN *et al.*; 2006). Além disso, este gás é o principal responsável pela corrosão de estruturas metálicas e danos aos sistemas de produção. Por conta da habilidade de metabolizar sulfato, gerando sulfeto de hidrogênio, as BRS demandam especial atenção dos profissionais da área de fluidos, pois o sulfeto de hidrogênio (H_2S) é gerado tanto em ambientes anaeróbios quanto em ambientes aeróbios.

Biocidas não oxidantes tais como glutaraldeído, (GARDNER & STEWART, 2002), diaminas, e compostos quaternários de amônio, são utilizados para reduzir a atividade microbiana em instalações de produção de petróleo (TELANG *et al.*; 1998). Os efeitos positivos destes tratamentos são normalmente dependentes de condições do reservatório, tais como a temperatura, a permeabilidade, e a composição química da água produzida, e os casos de resistência a biocidas não oxidantes após uso prolongado foram descritos (GARDNER & STEWART, 2002). Além disso, estas substâncias podem trazer riscos tanto para trabalhadores e ao meio ambiente, em alguns casos, necessitando medidas de controle alternativas.

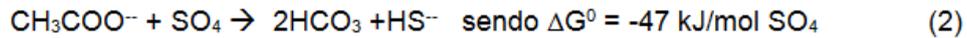
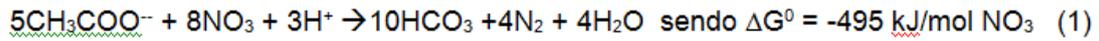
O glutaraldeído é um dialdeído, alifático de baixo peso molecular, líquido, miscível em água, álcool e solventes orgânicos, tem potente ação biocida, sendo bactericida, virucida, fungicida e esporicida. Sua atividade é devida a alquilação de grupos sulfidril, hidroxila, carboxila e amino dos microrganismos alterando seu DNA, RNA e síntese de proteínas. Nos esporos o glutaraldeído atua reagindo com a superfície do esporo, provocando o endurecimento das camadas externas e morte do esporo (ANVISA, 2007). Nos últimos anos (desde 2010 no Brasil; 2000 nos EUA e Oriente Médio) o glutaraldeído vem sendo utilizado em poços de petróleo como um dos principais agente biocida (GARDNER & STEWART, 2002; KAUR *et al.*, 2009). Porém seu uso apresenta efeitos adversos devido a exposição ocupacional, tais como: náuseas, cefaléia, obstrução das vias aéreas, a asma, rinite, irritação dos olhos, dermatite, além de apresentar efeito ecotóxico contaminando solo e aquíferos (ANVISA 2007).

Para evitar os problemas que resultam da utilização do glutaraldeído nos poços de petróleo, uma opção interessante seria a utilização de micro-organismos e/ ou seus bioprodutos, para inibir as BRS. Neste sentido, sabe-se que muitos micro-organismos produzem substâncias químicas como resultado do seu metabolismo primário e secundário. No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor, mas são derivados dos precursores (de energia gerada através do metabolismo primário). Estes compostos naturais produzidos podem ser alcalóides, terpenóides, aromáticos e glicosídeos descobertos (MELO, 2000). Dentro dos muitos produtos de origem microbiana, vem merecendo destaque nas ultimas décadas os surfactantes, em especial os produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus spp.*; que além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (BANAT *et al.*, 2000).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas com porções tanto hidrofílica quanto hidrofóbicas agindo preferencialmente na interface entre as fases de fluido com diferentes graus de polaridade e de ligação de hidrogênio tanto como óleo / água ou interfaces de ar / água . Essas propriedades tornam surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial e formação de micro emulsão em que os hidrocarbonetos podem solubilizar em água ou em que a água pode solubilizar em hidrocarbonetos, tais características conferem excelente detergência, agentes emulsionantes, a formação de espuma, dispersantes, o que os torna candidato em potencial na recuperação avançada de petróleo. Dentro dos surfactantes vem merecendo enorme destaque os surfactante de origem microbiana denominado de biossurfactantes (NITSCHKE & PASTORE,2002). Os biossurfactantes são um grupo estruturalmente diverso de agentes tensoativos sintetizadas por micro-organismos, tendo várias vantagens sobre os agentes tensoativos químicos, tais como menor toxicidade; maior biodegradabilidade; melhor compatibilidade ambiental, maior formação de espuma; alta seletividade e específico atividade a temperaturas extremas, pH, salinidade e a capacidade de ser sintetizado a partir de matérias-primas renováveis (GEORGIU *et al.*; 1990; KORONELLI *et al.*; 1983)

Compreender a ecologia, a fisiologia e a dinâmica dos micro-organismos e sua participação no ecossistema são essenciais para o sucesso da avaliação da interação de micro-organismos diversos presentes em um mesmo ambiente, como a indústria de petróleo, por exemplo. Fundamental também é entender como a biodiversidade da comunidade microbiana autóctone contribui para o conhecimento das várias interações que ocorrem neste ambiente, permitindo o levantamento de algumas hipóteses. Dentre estas, pode-se pensar em: mudanças na microbiota; e a inibição de determinados micro-organismos, bem como entender o que causam tais modificações e seus motivos.

A inibição do crescimento de BRS é uma das principais busca daquele que procuram uma alternativa para os efeitos deletérios desses micro-organismos. Vários trabalhos propuseram soluções para esse problema, que vão deste a adição de biocidas (glutaraldeído, compostos quaternário de amônio), ao uso de nitrato e nitrito como inibidor do crescimento de BRS uma vez que o nitrato apresenta uma maior afinidade eletrônica do que o sulfato, organismos que utilizam o nitrato teria vantagem em relação aos organismos que utilizam o sulfato devido a questões termodinâmicas conforme as equações a seguir:



Essas reações mostram a grande vantagem das bactérias redutoras de nitrato em relação as bactérias redutoras de sulfato (ECKFORD & FEDORAK, 2002). Estudos demonstram que a adição de nitrito elimina a atividade microbiana e a corrosão associada, através do estímulo de bactérias redutoras de nitrato ou nitrito, e oxidantes de enxofre. (NR-SOB) (HUBERT *et al*, 2005).

Outra alternativa proposta é a utilização de compostos que façam competição com o sulfato nos sítios de ligação da enzima APS-redutase, uma enzima chave da redução de sulfato. Algumas substâncias também provocam a inibição da redução do sulfato, por apresentarem estruturas análogas. Dentre elas destacam-se o selenato e os íons monofluorofosfato que são os inibidores mais poderosos e mais específicos. O molibdato é um inibidor, assim como o cromato, mas não da mesma forma que o selenato; este ânion inibe as células de *Desulfovibrio* formando um análogo instável do sulfato ativado, esgotando os ATPs da célula. O efeito do molibdato nas BRS é relativamente específico e, por isso, é um inibidor útil na redução do sulfato (POSTGATE, 1984). Segundo Barton (1995), o próprio sulfeto de hidrogênio em elevadas concentrações (16 mM H₂S) inibe o crescimento das BRS. A utilização da tecnologia de exclusão biocompetitiva (TEB) para estimular o crescimento de bactérias redutoras de análogos de sulfato e oxidantes de enxofre, denominadas petrobióticas (ALMEIDA *et al*, 2004) surge como mais uma opção de tentativa de inibir o crescimento de BRS. Tais bactérias competem com as BRS e inibem o seu crescimento, impedindo a acidificação e conseqüentemente, a corrosão associada a este fenômeno.

Neste escopo, a busca por métodos alternativos no controle da atividade das BRS e, conseqüentemente, da geração de H₂S biogênico, de modo a prevenir a corrosão microbiologicamente induzida, em substituição aos de biocidas como glutaraldeído vem ganhando importância.

Assim sendo, o presente trabalho tem como meta oferecer subsídios para o controle dos danos microbiológicos (*souring*) causados por BRS em reservatórios de petróleo, apresentando resultados preliminares referentes as ações de dois testes: 1 – tecnologia de exclusão biocompetitiva (TEB) e 2 – biocompetição com bactérias produtoras de surfactante, em reservatórios de petróleo para a diminuição da biosulfetogênese.

2 – OBJETIVOS

Objetivo geral

Monitorar a dinâmica de populações microbianas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) presentes em água produzida, e avaliar a produção de H₂S através da inibição de BRS na presença de bactérias produtoras de surfactante.

Objetivos específicos

- 1 – Detectar e quantificar bactérias redutoras de sulfato (BRS) em amostras de água produzida de petróleo;
- 2 - Caracterizar a população microbiana da água produzida e a concentração relativa de bactérias redutoras de sulfato, utilizando a hibridização fluorescente *In Situ* (FISH);
- 3 - Avaliar a dinâmica populacional de BRS sobre influência de bactérias aeróbicas produtora de biossurfactantes, na tentativa de inibir a produção de sulfeto.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – O POÇO DE PETRÓLEO E A ÁGUA PRODUZIDA

3.1.1 – Caracterização do processo de produção de petróleo

Originado da transformação de grandes deposições fósseis, o petróleo é uma mistura com composição variável de compostos orgânicos, predominantemente hidrocarbonetos (GESAMP *apud* CURY, 2002). Esta composição varia amplamente em função das características geoquímicas, tipo e qualidade da matéria orgânica original, grau de evolução térmica da rocha geradora, estado de biodegradação do óleo e fracionamento sofrido durante a migração até a rocha reservatório, entre outras (VEIGA, 2003). Os hidrocarbonetos presentes na composição do petróleo são compostos químicos apolares, o que limita sua solubilidade na água do mar, favorecendo a tendência de associação a partículas sólidas (materiais em suspensão, tecidos biológicos e aos sedimentos) e a destinação final em deposição sedimentar (READMAN *et al.*; 2002). Assim sendo, os sedimentos são compartimentos ambientais propícios ao registro dos padrões de distribuição temporal destes compostos.

Durante a fase de recuperação primária, a produção do reservatório vem de uma série de mecanismos naturais, que utilizam da energia natural disponível para produzir o petróleo para a superfície (tais como gás em solução, capa de gás, influxo de água, etc). Em muitos casos, busca-se maximizar o tempo de produção por afloramento, já que estes são capazes de produção a menores custos, quando comparados com os poços que utilizam da elevação artificial. O fator de recuperação durante a fase de recuperação primária é tipicamente 5-15% (STEPHERSON, 1992)

Enquanto a pressão no reservatório subterrâneo de petróleo é suficiente para forçar o óleo à superfície, tudo que é necessário é colocar um arranjo complexo de válvulas sobre a cabeça do poço para conectar o poço a uma rede de transporte tubular para o armazenamento e processamento (ROSA, 2006).

Durante o tempo de operação do poço, a pressão vai caindo até alcançar uma pressão de equilíbrio, e em algum momento haverá uma pressão subterrânea insuficiente para forçar o óleo à superfície. Após a produção natural do reservatório diminuir, métodos de recuperação secundária são aplicados. Eles contam com o fornecimento de energia externa para o reservatório na forma de injeção de fluidos para aumentar a pressão do

reservatório, portanto, substituir ou aumentar o impulsor natural do reservatório com um meio artificial. Às vezes, as bombas são usadas para trazer o petróleo para a superfície (MOTHÉ *et al.*; 2006). Outras técnicas de recuperação secundária são o aumento da pressão do reservatório por injeção ou reinjeção de água (do mar ou a própria água produzida), reinjeção de gás natural e *gas lift* (injeção de ar, gás carbônico ou algum outro gás para o fundo de um poço de produção, reduzindo a densidade global do fluido no poço). Em geral, os dois maiores problemas associados à injeção de água para recuperação secundária de petróleo são o controle da corrosão e a minimização da injeção de sólidos (partículas) no reservatório. As causas dos processos corrosivos em sistemas de injeção de água podem ser tanto de natureza abiótica quanto biótica, e a ocorrência do plugueamento de reservatórios pode ser resultado da injeção de partículas (sólidos em suspensão e produtos e corrosão), bactérias e formação de incrustação (MAGALHÃES *et al.*; 1998).

Na exploração e produção de petróleo, a água está presente na rocha juntamente com o petróleo e o gás natural, essa água é denominada água de formação. Estes fluidos estão separados em camadas, sendo que o mais denso, a água, fica usualmente na parte inferior da rocha, sobre ela o petróleo e acima deste, o gás. É comum a injeção de água no reservatório para manter a pressão e auxiliar o fluxo do petróleo para a superfície (recuperação secundária). A água a ser injetada na rocha pode ser doce, salgada ou aquela produzida juntamente com o óleo depois de separada, durante o processo de produção do petróleo (VEIL *et al.*; 2004).

A água de formação é encontrada no reservatório misturada com os hidrocarbonetos, sendo denominada de água produzida, quando chega à superfície com o óleo cru ou o gás natural (VEIL *et al.*; 2004). (Além da água de formação (própria do poço), a água produzida pode ser oriunda da água injetada no reservatório através dos poços de injeção a fim de alcançar, por aumento de pressão e diminuição de viscosidade, possibilitando uma maior recuperação de óleo (recuperação secundária); da condensação de gás injetado, com o mesmo propósito anterior; e de água proveniente de vários tratamentos químicos empregados nos poços durante a perfuração e a produção (EKINS *et al.*; 2007).

Atualmente, tendo em vista os aspectos legais e econômicos pertinentes, o melhor método indicado para a disposição da água produzida é a injeção no próprio poço; sendo a injeção simplesmente um processo de disposição ou parte de um projeto de recuperação secundária (EKINS *et al.*; 2007). Em pesquisa feita em campos produtores na

Bacia do Recôncavo Baiano, observou-se que toda a injeção de água para recuperação secundária é de água produzida. Não há injeção de descarte, com isso minimiza-se o impacto ambiental da atividade (AYRES & PARKER, 2001).

3.1.2 – A ecologia do poço de petróleo

O reservatório de petróleo assim como a água produzida contida nele, nos reserva uma grande diversidade de micro-organismos, porém, apesar do número grande de micro-organismos que já foram isolados e caracterizados de reservatórios de petróleo (MAGOT, 2000), o cultivo de representantes dessa microbiota nativa consiste em um desafio significativo. Os métodos comumente utilizados anteriormente para a identificação de micro-organismos do reservatório eram técnicas baseadas em cultivos (métodos microbiológicos) que geralmente acessam somente uma pequena parte das comunidades presentes no reservatório. Importantes parâmetros de seletividade que influenciam na habilidade para isolar culturas representativas do reservatório de petróleo são: pH, salinidade, pressão, condições de redox e temperatura (ORPHAN *et al.*; 2000).

A finalidade das estratégias de isolamento com relação aos parâmetros ambientais acima citados deve refletir as condições *In Situ*, coisa muito difícil de manter ou então muito dispendiosa. Entretanto, os estudos em ecologia microbiana avançaram rapidamente com a introdução das técnicas moleculares de rDNA e rRNA baseadas na molécula 16S, tornando possível a detecção e caracterização de muitas comunidades microbianas. A hibridização fluorescente *In Situ* (FISH) é uma das muitas técnicas moleculares utilizadas no estudo de diversidade e estrutura de comunidades microbianas não cultiváveis (AMANN, 1992). Utilizando-se das técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), associada à técnica de FISH, foi possível desenhar sequências para vários grupos microbianos de importância ecológica relacionados ao reservatório de petróleo e comprovar a sua presença além de quantificar suas populações naquele sítio (AMANN *et al.* 1990; MANZ *et al.*;1992),

Em um estudo conduzido por Orphan e colaboradores (2000), foi elaborada uma biblioteca de sequências de 16S, que continha uma diversidade enorme de micro-organismos oriundos de amostras de água de produção de reservatórios de petróleo com temperatura entre 70-75⁰C. Nesse estudo foram encontrados 83 clones únicos dos 480 clones triados, sendo que apenas 8,8% era pertencente ao domínio *Archaea* e 0% de representantes do domínio *Eukarya*. Do domínio *Prokarya*, foram encontrados: alfa, gama e delta proteobactérias, além de bactérias Gram positivas com baixo teor de G+C.

Hoje sabemos que os micro-organismos da microbiota do reservatório, apresentam uma série de interações ecológicas com relação à degradação da matéria orgânica existente no poço (OLLIVIER & MAGOT, 2005). Em um ambiente muito competitivo, os micro-organismos desenvolveram estratégias para sobreviver, as chamadas estratégias *r* e *K*. Os micro-organismos que seguem a estratégia *r* se reproduzem depressa enquanto o ambiente está rico em substrato, apresentando altas taxas de crescimento específico e altas constantes de saturação do substrato. Já os micro-organismos que seguem a estratégia *K*, apresentam baixo crescimento específico e baixas constantes de saturação do substrato, sendo esses micro-organismos os mais estáveis dentro da comunidade microbiana, e os predominantes no reservatório de petróleo (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Culturas obtidas de amostras de água produzida são verdadeiros enigmas, pois a certeza da comunidade microbiana nativa não pode ser confirmada devido a determinados problemas relacionados à obtenção das amostras, dentre eles a introdução de micro-organismos no reservatório durante o processo de perfuração; amostras são frequentemente obtidas de reservatórios inundados e a injeção de água que contém nutrientes, que servem como aceptores de elétrons e micro-organismos não-endógenas podem conduzir mudanças dentro da comunidade microbiana nativa do poço (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

3.1.3. – Método em ecologia microbiana

A aplicação de métodos de biologia molecular para o estudo da diversidade e ecologia de micro-organismos em ambientes naturais tem sido praticada desde meados da década de 1980. Desde aquela época muitas informações novas sobre a composição de comunidades microbianas não cultivadas foram obtidas. Grupos inteiros de organismos que eram apenas conhecidos a partir das sequências moleculares estão agora sendo estudados quantitativamente de forma significativa em muitos ambientes. Métodos moleculares também têm permitido a caracterização de muitos organismos há muito tempo reconhecido, mas mal compreendido (AMANN *et al*, 1991; 1992; 1995; MUYZER, 1996).

A investigação filogenética de populações naturais é importante para conhecer a diversidade microbiana dos ambientes. O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular tais como Hibridização Fluorescente *In Situ*(FISH) e Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) aliado à bioinformática constituem ferramentas de

uma nova linha de estudo interdisciplinar intitulada Ecologia Molecular Microbiana, que busca determinar a diversidade genética das comunidades microbianas e suas relações com o ambiente (MUYZER *et al.*; 1996; HEUER *et al.*; 1997). A combinação da Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH) e Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) são técnicas rápidas e sensíveis e podem auxiliar no estudo da diversidade microbiana em sistemas complexos.

Os rRNAs são as principais moléculas-alvo para FISH por várias razões: eles podem ser encontrados em todos os organismos vivos, são relativamente estáveis e ocorrem em número de cópias elevado (geralmente vários milhares por célula), e eles incluem os domínios variáveis das sequências altamente conservadas (AMANN, 1995). As assinaturas, são sequências únicas para um grupo escolhido de micro-organismos, variando de filões inteiro para cada espécie, podendo, portanto, serem identificados por análise de sequência comparativa. Bactérias e Archaea contem 5S, 16S, 23S rRNAs e com comprimentos de cerca de 120, 1500 e 3000 nucleotídeos, respectivamente. Na grande maioria das aplicações do FISH as sondas-alvo são de rRNA 16S (ZARDA *et al.*; 1997). As sondas de oligonucleotídeos utilizados na técnica de FISH possuem geralmente entre 15 e 30 nucleotídeos de comprimento e estão ligados de forma covalente na extremidade 5' com uma molécula fluorescente (ALEXA-555). Um protocolo de FISH típico inclui quatro etapas: (1) a fixação e permeabilização da amostra; (2) hibridação; (3) lavagem (passos para remover sonda não ligada); e (4) a detecção de células marcadas através da microscopia ou da citometria de fluxo (EILERS, *et al.*; 2000). Vale ressaltar que a técnica de FISH é totalmente compatível com os métodos de contagem direta (BOETIUS *et al.*; 2000).

As primeiras aplicações da técnica de FISH foram poucas, por exemplo: identificação de bactérias simbiotes *In Situ* ou a identificação das bactérias magnetostáticas que podem ser fisicamente removidas do ambiente antes da hibridação (BLUMER *et al.*; 1969; BLAKEMORE, 1975; BOCK *et al.*; 1986). Porém ao longo dos últimos anos, muitas aplicações para amostras complexas, como lodo ativado ou do solo, têm sido publicados (MANZ *et al.*; 1992). O FISH passou também a ser utilizado com sucesso para a visualização de consórcios microbianos hipotéticos oriundos dos mais diversos ambientes (BROCK, 1987; BRITSCHGI & GIOVANNONI, 1991). Recentemente, Kumaraswamy e colaboradores (2011) utilizaram a técnica de FISH para análise filogenética e enumeração de comunidades microbianas em microcosmos modificados.

3.2 – METABOLISMO MICROBIANO

3.2.1 – Metabolismo visão geral

O metabolismo é o conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos. O termo "metabolismo celular" é usado em referência ao conjunto de todas as reações químicas que ocorrem nas células. Estas reações são responsáveis pelos processos de síntese e degradação dos nutrientes na célula e constituem a base da vida, permitindo o crescimento e reprodução das células, mantendo as suas estruturas e adequando respostas aos seus ambientes (SMITH & MOROWITZ, 2004). As reações químicas do metabolismo estão organizadas em vias metabólicas, que são sequências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte.

Diferentes enzimas catalisam passos distintos de vias metabólicas, agindo de forma concentrada, e de modo a não interromper o fluxo nessas vias. As enzimas são vitais para o metabolismo porque permitem a realização de reações desejáveis, que seriam termodinamicamente desfavoráveis, ao acoplá-las a reações mais favoráveis. As enzimas regulam as vias metabólicas em resposta a mudanças no ambiente celular ou a sinais de outras células (SMITH & MOROWITZ, 2004).

3.2.2 – Metabolismo microbiano aeróbico

O metabolismo aeróbico consiste nos processos de oxidação de compostos orgânicos tendo como aceptor final de elétrons (agente oxidante) o oxigênio (O_2). Esses processos apresentam rotas bioquímicas que levam a transformação do carbono orgânico em gás carbônico (CO_2) e transporte de elétrons por um sistema que envolve enzimas e proteínas, ao longo de cadeias de reações complexas, havendo simultaneamente um aproveitamento progressivo de energia que vai sendo transferida. Esse processo apresenta um balanço energético alto devido a total mineralização do composto orgânico (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Segundo a teoria de Lynn Margulis (1981), os primeiros seres seriam fermentadores, em seguida surgiria um novo grupo de seres – os fotossintetizantes –, que seriam responsáveis pela produção de oxigênio, permitindo assim a evolução ou surgimento de uma nova modalidade metabólica – o metabolismo aeróbico, muito mais eficiente do ponto de vista energético (EBENHÖH & HEINRICH, 2001).

3.2.3 – Metabolismo microbiano anaeróbico

O metabolismo anaeróbico ou respiração anaeróbica é uma realização única de procariontes, sendo muito comum encontrá-lo, pois uma grande variedade de bactérias e arqueobactérias o realizam. Esse tipo de processo é uma forma de respiração que utiliza outros receptores de elétrons diferentes do oxigênio, entre eles o nitrato e sulfato, além de metais como o ferro e o manganês. Embora o oxigênio não seja usado como o último receptor de elétrons, o processo ainda utiliza uma cadeia respiratória de transporte de elétrons, utilizando citocromos, quinonas, ferrosulfoproteína, além de outras proteínas transportadoras típicas de sistemas aeróbicos. O metabolismo anaeróbico é uma conquista dos seres procariontes, se mostrando um grande salto evolutivo no que diz respeito à exploração de novos nichos, apresentando uma diversidade muito grande de vias que possibilitam a vida em ausência de oxigênio, tais como redução de radicais oxidados (nitrato e sulfato), assim como oxidação de metais como ferro e manganês (VANDERCASTEELE, 2008). Dentre as diversas vias do metabolismo anaeróbico, duas merecem destaque: a redução de nitrato ou desnitrificação e a redução disassimilatória do sulfato.

A redução do nitrato é muito comum em organismos aeróbicos devido a presença da enzima nitrato-redutase que participa da redução assimilatória de nitrato para a assimilação de nitrogênio para síntese de aminoácidos utilizando nitrogênio inorgânico. Porém, na ausência de oxigênio, essa via passa a ser o caminho para a produção de energia, através da incorporação de íons nitrato que atuam como aceptores de elétrons para eliminar o excesso do poder redutor através da denitrificação ou redução disassimilatória de nitrato, ou ainda respiração pelo nitrato. Nessa via, os íons nitrato em condições anaeróbicas são reduzidos a nitrito e subsequentemente, em óxido nítrico (NO), óxido nitroso (NO₂) e finalmente em nitrogênio molecular (N₂). Devido à excreção de gases pelos micro-organismos, os termos redução disassimilatória, respiração ou denitrificação têm sido usados equivalentemente na literatura para denominar esta via (BOTHE, FERGUSON e NEWTON, 2007). A enzima que inicia a redução disassimilatória do nitrato é a nitrato-redutase, uma enzima transmembrana cuja síntese é ativada pelo nitrato e inibida pela presença de oxigênio molecular (VIVIAN *et al.*;1999). A maioria dos procariontes que denitrificam pertencem ao filo das proteobactérias e são aeróbios facultativos, ou seja, utilizam tanto o oxigênio como outros aceptores na respiração, mostrando uma verdadeira diversidade de mecanismos alternativos de produção de energia (BOTHE, FERGUSON e NEWTON, 2007).

A redução disassimilatória de sulfato realizada por micro-organismos é uma importante atividade metabólica em muitos ambientes com potencial redox baixo (reduzido) como sedimentos marinhos, aquíferos contaminados, terrenos alagados e etc. Esta atividade é mediada por diversos grupos de bactérias redutoras de sulfato (WIDDEL, 1988). Uma enzima fundamental no processo de redução disassimilatória de sulfato é a sulfito redutase-disassimilatória, sendo essa enzima uma ferramenta essencial para o processo de respiração anaeróbia de sulfato (WAGNER *et al*, 1998). O transporte do sulfato transmembrana, ocorre comumente partir de um gradiente iônico, havendo evidências para um sistema de troca iônica com H^+/Na^+ , a partir de um gradiente de sódio ao longo da membrana celular das bactérias redutoras de sulfato (CYPIONKA, 1989). Neste processo não há gasto energético, contudo, quando em baixas concentrações de sulfato no meio, moléculas de ATP podem ser consumidas para produzir um gradiente iônico favorável para o transporte de sulfato (KREKELER & CYPIONKA, 1995). A ativação do sulfato citoplasmático ocorre a partir da sua fosforilação pela enzima *ATP sulfurilase* (uma fosforilação ao nível do substrato), havendo produção de adenosina 5'-fosfosulfato (APS), também conhecida como adenilsulfatase (KRAMER & CYPIONKA, 1989). Neste processo, há consumo de um mol de ATP por mol de sulfato ativado, e produção de pirofosfato. O caráter anaeróbio das BRS pode estar relacionado com essa enzima devido à sua atividade em condições anóxicas estritas (BAUMGARTNER *et al.*; 2006).

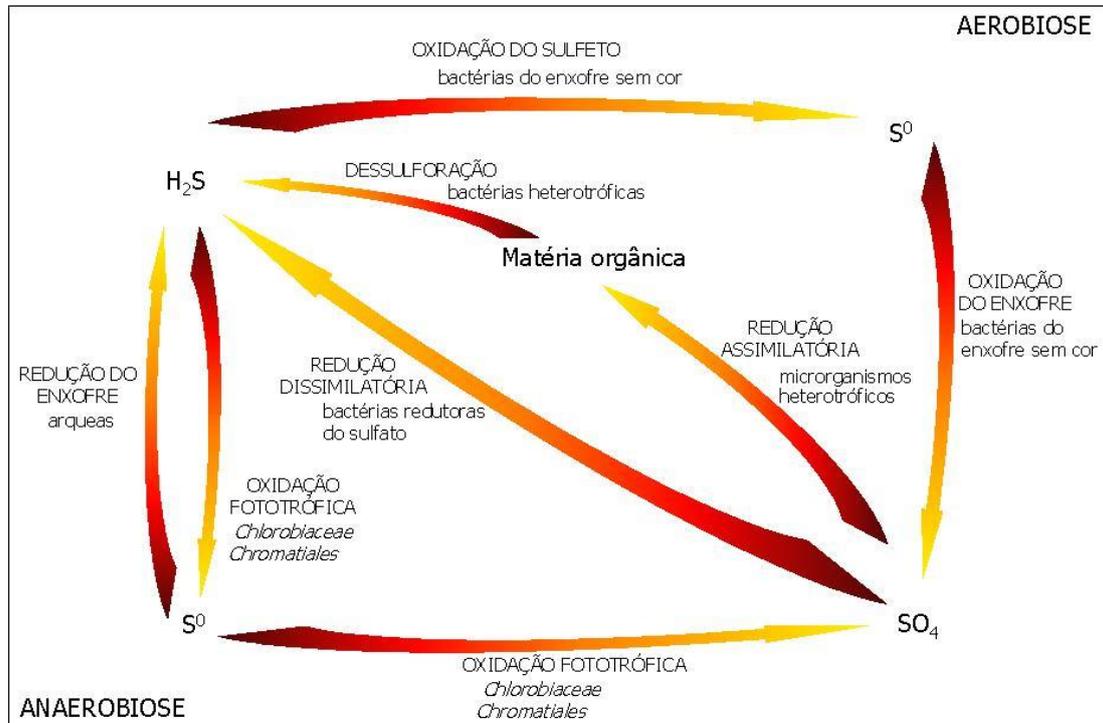
3.3 – BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

3.3.1 – Ciclo do enxofre

O enxofre apresenta um ciclo que passa entre o ar e os sedimentos, sendo que existe um grande depósito na crosta terrestre e nos sedimentos e um depósito menor na atmosfera. O enxofre é um elemento relativamente abundante na crosta terrestre, ocorrendo principalmente na forma de sulfatos solúveis. Grande parte dos reservatórios de enxofre inerte está em rochas sulfurosas, depósito de elementos sulfurosos e combustíveis fósseis. Alguns minérios de sulfeto podem ser de origem biogênica. O enxofre pode ser adicionado também na biosfera na forma reduzida (H_2S), como resultado da atividade vulcânica e do metabolismo microbiano. O enxofre pode ser encontrado também em diversos estados de oxidação nos compostos orgânicos e inorgânicos (GIBSON, 1990). Os micro-organismos catalisam a oxidação e redução das diferentes formas de enxofre, estabelecendo deste modo um ciclo. O enxofre é um

componente essencial do sistema de vida, estando contido em diversos aminoácidos na forma de grupo sulfidril (-SH), além de ser um componente essencial de várias coenzimas (DWORKIN *et al.*; 2006).

Como o enxofre na sua forma elementar não pode ser utilizado por organismos superiores, para que sua assimilação se torne possível é necessário que microorganismos oxidem a sulfa elementar a sulfatos. Neste processo podem participar bactérias foto pigmentadas dos gêneros *Chlorobium* e *Pelodityon*. Porém, as mais ativas neste processo são as não fotopigmentadas em especial as do gênero *Thiobacillus*, que podem gerar ácido sulfúrico durante o processo (DWORKIN *et al.*; 2006). O sulfato gerado pode ser assimilado diretamente por vegetais, algas e diversos organismos heterotróficos sendo incorporados à aminoácidos sulfurados. O mesmo sulfato também pode ser dissimilado formando H_2S . Na redução disassimilatória do sulfato na qual participam as bactérias do gênero *Desulfovibrio* o íon sulfato atua como um agente oxidante para dissimilação da matéria orgânica, assim como o oxigênio na respiração convencional (SASS & CYPIONKA, 2007). As bactérias redutoras do sulfato utilizam estes íons que são reduzidos a sulfeto de hidrogênio (H_2S). Seu papel no ciclo do enxofre pode ser comparado ao papel das bactérias redutoras de nitrato no ciclo do nitrogênio. Além das bactérias *Desulfovibrio*, outras bactérias anaeróbicas restritas e morfologicamente diversificadas participam desse processo, sendo: *Desulfomaculum* e *Desulfobulbus*, as mais conhecidas. O gás sulfídrico, resultante da redução dos sulfatos e da decomposição de aminoácidos, é oxidado a enxofre elementar (MUYZER & STAMS, 2008)

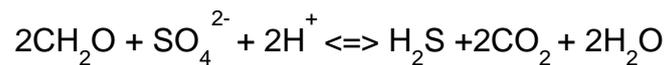


3.3.2 – A biologia e eco-fisiologia das bactérias redutoras de sulfato (BRS)

As BRS é o maior grupo de micro-organismos anaeróbicos, sendo considerados o principal agente produtor da biocorrosão. Eles possuem uma grande e diversificada árvore filogenética que inclui: bactérias Gram-negativas mesofílicas que pertencem à divisão δ -Proteobacteria, bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, bactérias termofílicas e Arqueobactérias termofílicas (CASTRO *et al.*; 2000). As BRS são caracterizadas por algumas características específicas: paredes celulares sem peptidoglicano, a membrana da célula apresenta uma composição específica de lípidos, seus ribossomos são caracterizados por uma sequência específica de nucleótidos na cadeia de RNA (ALCAMO, 2001). Dentro desse grupo merecem destaque alguns gêneros de bactérias tais como: *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfonema*, *Desulfovibrio*, *Desulfobaculum* e *Desulfosporosinus* (CASTRO *et al.*; 2000). Estes micro-organismos usam como fonte de carbono, compostos diversos: hidrocarbonetos aromáticos, n-alcanos, ácidos graxos e produtos orgânicos polares formados de bactérias aeróbicas a partir de carboidratos, além de ácidos graxos voláteis e compostos orgânicos de cadeia curta como lactato e acetato, achados naturalmente em poços de gás natural e petróleo (MAGOT *et al.*,2000). Os outros grupos de BRS são menos representativos em

diversidade, contudo não são menos importantes. O filo Firmicutes reúne BRS com baixo conteúdo de citosina e guanina (C+G) no DNA (aproximadamente 38%), presença de parede celular espessa, produção de endósporos e tolerância a temperatura moderadamente alta (65^o C), sendo os representantes desse filo denominados de BRS não oxidante de acetato (WIDDEL, 1988)

A diversidade de espécies e a semelhança eco-fisiológica entre grupos distintos de bactérias redutoras de sulfato (BRS) dificultam a sua classificação taxonômica e a definição de uma sistemática filogenética sendo que até a década de 1980, os estudos taxonômicos de BRS eram fundamentados em suas características fenotípicas as quais eram utilizadas na descrição de táxons específicos. Algumas das características fenotípicas podem ser citadas tais como: a morfologia celular, o metabolismo, a produção de esporos e a capacidade de adaptação aos habitats eram utilizados na descrição de táxons específicos (CASTRO *et al.*; 2000). Em relação à nutrição, as BRS se dividem em dois grupos fisiológicos: espécies que oxidam substratos orgânicos incompletamente a acetato e espécies que oxidam substratos orgânicos, incluindo acetato, completamente a CO₂. O processo de redução global do sulfato, segundo Madigan e colaboradores (2010), pode ser representado pela equação:



onde CH₂O representa um composto orgânico. Ainda segundo Gibson (1990), as BRS são as responsáveis por reduzir metabolicamente íons sulfato ou outras espécies oxidadas do enxofre (sulfito, tiosulfato ou enxofre elementar) a sulfeto de hidrogênio. A redução biológica do enxofre está associada à respiração anaeróbica do sulfato, havendo armazenamento de energia celular a partir da oxidação de um substrato orgânico (MADIGAN *et al.*; 2010). Na respiração anaeróbica, compostos orgânicos ou hidrogênio (H₂) são oxidados havendo transferência de elétrons através de um complexo enzimático celular, conhecido como cadeia respiratória, até um acceptor inorgânico, que não o oxigênio (WIDDEL, 1998; MUYZER *et al.*; 2008).

3.3.3 – Cultivo e crescimento

As BRS são rigorosas em seus requisitos para condições anaeróbicas de crescimento exigindo Eh em torno de -200 mV para o início do crescimento. Além de

valores de Eh baixos mantidos por substâncias redutoras (ácido ascórbico e tioglicolatos), se faz necessários aportes de sulfato e uma fonte de carbono em particular ácidos orgânicos de cadeia curta (lactato, piruvato, propionato, butirato e em alguns casos acetato). Baseado nesses requisitos em 1964, John Postgate elaborou um meio de cultivo para BRS. A composição desse meio apresenta variações conforme a fonte de carbono usada e a quantidade de fontes de carbono usadas, sendo o mais usado a variação C, que contém lactato e citrato como fontes de carbono (POSTGATE, 1984).

3.3.4 – Biosulfetogênese e Biocorrosão

Os processos corrosivos mediados por BRS afetam várias indústrias, entre as quais as petrolíferas, de gás, de distribuição e de tratamento de água (ITO *et al.*; 2002 e ICGEN *et al.*; 2006), de engenharia civil (MAGALHÃES, 2007) de construção naval entre outras; causando danos nas suas estruturas, como sistemas de refrigeração, tanques, condutas e tubulações, cascos de embarcações, etc. Os danos causados pelas BRS traduzem-se em elevados prejuízos econômicos, sobretudo associados à biocorrosão, mas também em problemas de saúde e segurança.

A corrosão pode ser definida como sendo a deterioração de um material, geralmente metálico, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente, aliada ou não a esforços mecânicos. A deterioração representa alterações prejudiciais e indesejáveis sofridas pelo material, tais como desgaste, e ainda variações químicas e estruturais (PERES, 2006). Este fenômeno consiste no retrocesso natural dos metais processados, como o ferro, o cobre e o zinco, ao seu estado nativo, como compostos químicos ou minerais. Por exemplo, o ferro no seu estado natural é um composto oxidado (exemplos: Fe_2O_3 , FeO , Fe_3O_4), mas quando processado metalurgicamente em aço, perde o oxigênio e torna-se em ferro elementar (Fe). Na presença de água ou oxigênio, o ferro oxida, revertendo-se em óxidos de ferro. Trata-se de um processo eletroquímico no qual se estabelece uma diferença de potencial elétrico entre dois metais ou entre dois pontos de um mesmo metal, e que envolve fundamentalmente duas reações: 1) A perda de material do ânodo, em que o Fe é libertado para a solução aquosa e oxida-se em Fe^{2+} , ocorrendo a libertação de dois elétrons (reação anódica); 2) O oxigênio (O_2) na solução aquosa move-se para o cátodo completando o circuito elétrico utilizando os elétrons para formar hidroxilas (OH^-) na superfície do metal (reação catódica). Em ambientes anaeróbios, o O_2 é substituído por íons de hidrogênio ou pela água como agentes da reação catódica (VIDELA E WILKES, 1997 e PERES, 2006).

Existem alguns fatores que promovem a corrosão (MAGALHÃES, 2007) como:

- valores baixos de pH, isto é, ambientes ácidos uma vez que quanto menor for o pH da água, maior será a concentração de íons de hidrogênio, que aceleram a corrosão;
- o aumento de temperatura do meio, que faz aumentar a velocidade das reações envolvidas na corrosão;
- a presença de determinados sais dissolvidos (sais de cloreto e sulfatos) que aumentam a condutividade elétrica;
- a presença de alguns gases dissolvidos (dióxido de carbono; oxigênio, amônia);
- a existência de áreas metálicas relativas, isto é, presença de metais diferentes em contato entre si, que promove o aparecimento de zonas de diferença de potencial elétrico originando células de corrosão;
- a presença de matéria em suspensão, que provoca depósitos porosos que facilitam o aparecimento de células de corrosão por arejamento diferencial.
- a presença de micro-organismos, que promovem a corrosão ao libertarem hidrogênio no decorrer do seu metabolismo; as bactérias anaeróbicas formam células de corrosão por arejamento diferencial e algumas espécies produzem compostos ácidos.

A corrosão induzida por micro-organismos (CIM) é denominada de biocorrosão, apresentando a mesma natureza eletroquímica da corrosão tradicional (VIDELA *et al.*; 2005). Os micro-organismos em ambiente natural tendem a colonizar sob as superfícies sólidas, formando biofilmes. Estes formam uma camada envoltória diminuindo a exposição da superfície ao ambiente externo. No entanto, isto pode também levar à deterioração dos materiais podendo mesmo alterar a função a que o material estava inicialmente destinado. O crescimento microbiano associado a superfícies, por exemplo, a formação de um biofilme, pode estimular o desenvolvimento da bioincrustação (*biofouling*), já que promove reações físico-químicas não favorecidas em condições abióticas, conduzindo à deterioração do material (BEECH, 2003). A biocorrosão ou corrosão microbiana é um processo complexo de deterioração de materiais geralmente metálicos, promovido pela atividade de diversos micro-organismos, em consequência do seu crescimento e metabolismo (BEECH, 2003), resultado da ação dos processos biológicos que ocorrem no interior do biofilme e eletroquímicos que ocorrem na interface deste com o metal, tendo por consequência a sua degradação (VIDELA *et al.*; 2005).

Os micro-organismos e os produtos resultantes da sua atividade influenciam as reações catódicas e anódicas na superfície do metal, criando condições de corrosão (BEECH, 2003 e PIMENTA *et al.*; 2003). No caso das BRS a corrosão pode ser atribuída sobretudo aos três fatores seguintes:

- formação de biofilmes e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS);
- produção de metabólitos corrosivos como o sulfeto de hidrogênio; e
- despolarização catódica. (JAN-ROBLERO *et al.*; 2004 e BERNARDEZ *et al.*; 2007).

Os biofilmes são ecossistemas microbianos extremamente complexos, podendo ser constituídos por bactérias, fungos, algas e protozoários. Estes micro-organismos produzem substâncias insolúveis denominados de exopolissacarídeos (EPS), que aderem à superfície metálica sob a forma de incrustações, permitindo o estabelecimento e manutenção do biofilme. Com a produção de EPS, o crescimento de novas células e adesão de outras, presentes na fase líquida, passa a envolver e a aglutinar novos micro-organismos, resultando na colonização da superfície sólida. Deste modo, são estabelecidas condições adequadas para o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios, como as BRS. Os ambientes anaeróbios são criados através do metabolismo microbiano, quer pelo consumo de oxigênio, quer pela secreção de EPS, limitando a difusão do oxigênio até a base do biofilme (PERES, 2006). Por outro lado, metabólitos de natureza química diversa, tais como, ácidos, bases, sulfetos, entre outros, formados por micro-organismos podem ser corrosivos, uma vez que transformam o meio originalmente inerte em quimicamente ativo (BEECH, 2003). No caso das BRS, o sulfeto de hidrogênio resultante da redução de sulfato é um produto metabólico bastante agressivo que quando dissolvido na água, ataca o ferro formando depósitos de sulfeto de ferro (FeS), de coloração escura (PERES, 2006).

A corrosão mediada por BRS pode ainda ser explicada pela despolarização catódica, devido ao consumo de hidrogênio no cátodo, causado pela atividade da enzima hidrogenase, presente nas BRS. Na presença de oxigênio dissolvido as reações químicas tendem a remover o hidrogênio da área catódica, promovendo a corrosão (CHAN *et al.*; 2002). As hidrogenases das BRS permanecem ativas dentro da matriz do biofilme, mesmo na forma extracelular tendo um papel significativo na biocorrosão do ferro e das ligas ferrosas (BEECH *et al.*; 2005).

3.4 – MICRO-ORGANISMOS E BIOPRODUTOS

3.4.1 – Bioprocessos e bioprodutos

Muitos micro-organismos são capazes de reconhecer os hidrocarbonetos como fonte de carbono, iniciando o processo de degradação (CURY, 2002), assim estas populações microbianas tornam-se maiores em solo com histórico de exposição a

petróleo do que nos não expostos (CURY, 2002). Rapidamente a proporção destes micro-organismos aumenta de menos de 1%, em ambientes marinhos não expostos, para mais de 10%, em ambientes marinhos expostos (ATLAS, 1981). A utilização de micro-organismos que degradam compostos químicos de alto risco, utilizando-os como fonte de alimento e energia, para eliminar os poluentes presentes em amostras ambientais é conhecida como biodegradação ou biorremediação. A biorremediação explora a diversidade e versatilidade metabólica dos micro-organismos para a transformação dos contaminantes em produtos finais menos tóxicos os quais serão integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (LIU E SUFLITA, 2000). As técnicas que envolvem a biorremediação se baseiam em dois princípios: a bioestimulação, que consiste em fornecer estímulo dos micro-organismos já existentes (autóctones) no ambiente; e a bioaumentação que se caracteriza pela introdução de micro-organismos no solo ou água (aclimatados ou modificados) (METTING, 1992).

O uso de micro-organismos e seus produtos: polímeros, como a xantana, e os surfactantes (ramnolípídeo e surfactina), vem se tornando uma alternativa promissora para a MEOR (ALMEIDA *et al.*; 2004). Com relação ao uso de micro-organismos, vamos enfatizar os agentes produtores de surfactante e substância antibióticas (HARRISON *et al.*; 1993; BETTIOL, 1995), como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, que apresentam-se como uma boa alternativa devido à sua capacidade de tolerar ambientes anoxicos, sendo redutores de nitrato nessas condições (TRABULSI, 2005). Essa capacidade de utilizar nitrato se deve à presença das enzimas nitrato-redutase e nitrito-redutase, enzimas presentes em muitos micro-organismos aeróbicos, conferindo-lhes uma vantagem adaptativa (MADIGAN, 2008).

Os bioprocessos são conduzidos mediante ação de agentes biológicos, sendo, portanto, as transformações catalisadas enzimaticamente (PEREIRA Jr.; 2008). Bioprocessos conduzidos por micro-organismos, tradicionalmente conhecidos como processos fermentativos, são importantes fontes de produtos biológicos usados nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia. Além disso, exercem importante papel nos processos vitais dos ciclos geoquímicos, como também são fundamentais no equilíbrio de populações, na remediação ambiental e na manutenção de ecossistemas.

Os micro-organismos produzem substâncias químicas como resultado do metabolismo primário e secundário. No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor, mas são derivados dos precursores (de energia gerada através do metabolismo primário), estes compostos naturais produzidos podem

ser alcalóides, terpenoides, aromáticos e glicosídeos descobertos (MELO, 2000), uma vez isolados e selecionados um micro-organismo produtor de uma substância útil ele é preservado e, portanto, prontamente disponível. Os micro-organismos que sintetizam estes compostos podem ser utilizados na produção de antibióticos, enzimas líticas e principalmente utilizados nas aplicações biotecnológicas. A produção de (bio)surfactantes por micro-organismos vem merecendo destaque nas últimas décadas, e em especial os produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus spp*, tem exercido papel importante na inibição bacteriana, segundo alguns autores (GOMAA, 2012; MAGALHÃES & NITSCHKE, 2012). Na última década observou-se um aumento expressivo na quantidade de bioprodutos comerciais, especialmente metabólitos secundários e proteínas terapêuticas produzidas com tecnologia de DNA recombinante, e dentre esses produtos metabólicos, vem merecendo destaque os biosurfactantes. Os surfactantes são compostos anfílicos que apresentam propriedades de redução das tensões superficiais e interfaciais, aumentando a solubilidade e a biodegradabilidade de substâncias hidrofóbicas.

Os biosurfactantes (de origem microbiológica) são mais eficientes e mais efetivos que os surfactantes convencionais (de origem industrial) detergentes aniônicos sulfatados, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biosurfactante e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A maioria dos biosurfactantes conhecidos é sintetizada por micro-organismos cultivados em hidrocarbonetos imiscíveis em água, mas alguns são produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol (TABATABAEE *et al.* 2005). Eles podem ser encontrados como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas ou ficarem aderidos à sua superfície (MARIANO *et al.* 2007, CAMEOTRA & SINGH 2009, SEO *et al.* 2009), e ainda segundo Cameotra & Singh (2009), a produção de biosurfactantes por bactérias está ligada à alta densidade celular. A presença de biosurfactantes no ambiente desempenha um papel natural, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos, uma vez que aumentam a área superficial das micelas, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando, por conseguinte, a produção de biomassa bacteriana, permitindo assim uma melhor ocupação e exploração do meio.

Estudos demonstraram que a produção de ramnolipídeos é ativada sob condições de limitação de nitrogênio, comprometendo a síntese da enzima NAD e NADP isocitrato-desidrogenase, que catalisa a oxidação de isocitrato a 2-oxoglutarato no ciclo do ácido cítrico, levando assim ao acúmulo de citrato no mesossomo, que são então transportados

para o citosol, onde o citrato é convertido pela citrato-sintase formando acetil-CoA que é o processador de síntese de ácidos graxos levando ao início da produção de biossurfactante (MANEERAT, 2005). Ainda que a maioria dos estudos sobre as ações antibióticas produzidas pelos biossurfactantes de *Pseudomonas spp.* e *Bacillus spp.* sejam relacionados a fitopatógenos, Nitschke & Pastore (2002) relatam que os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas de outros micro-organismos, promovendo a permeabilização da membrana e conseqüente expulsão do conteúdo interno da célula (ZHAO *et al.*;, 2010), sendo que através da excreção destes biossurfactantes no meio, os micro-organismos produtores de biossurfactante adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes. Daí a importância da utilização desses micro-organismos em ensaios de dinâmica populacional, a fim de avaliar seu poder de inibição em algumas populações microbianas.

3.4.2 – *Pseudomonas aeruginosa* e ramnolipídeo

O gênero *Pseudomonas* da família da Pseudomonaceae e apresenta bacilos Gram-negativos, aeróbio podendo crescer em anaerobiose desde que haja presença nitrato para ser acceptor final de elétrons (*Pseudomonas aeruginosa*). São micro-organismos ubiqüitários em especial a espécie *Pseudomonas aeruginosa* sendo encontrada nos mais diversos ambientes (TRABULSI, 2005). Muitas bactérias desse gênero estão envolvidas com a conservação ambiental, devida à habilidade de algumas bactérias desse grupo de degradar compostos derivados do petróleo com hidrocarbonetos principalmente n-alcanos, decanos, querosene, hidrocarbonetos aromático, óleo cru entre outros (ABOUSEOUD *et al.*;, 2008). A propriedade dessas bactérias em degradar compostos derivados do petróleo se deve a capacidade de produção de substâncias denominadas de surfactantes. O biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*, é um glicolipídeo denominado de ramnolipídeo. Os ramnolipídeos são formados por uma ou duas moléculas de ramnose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico. Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas spp.* têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial contra n-hexadecano para 1 dina/cm e a tensão superficial da água para 25 a 30 dina/cm, usando concentrações entre 10 e 200 mg/L. (MONTEIRO, 2007).

Devido as suas características os ramnolipídeos são empregados em vários processos que vão desde produção de cosméticos, passando pela biodegradação de

hidrocarbonetos no solo como na recuperação melhorada de óleo (BENINCASA, 2007; PERFUMO *et al.*; 2010).

3.4.3 – *Bacillus* spp.e surfactina

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram positivas, produtoras de endósporos, que lhes conferem resistência ao estresse ambiental. Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* são os que possuem as espécies reconhecidamente fixadoras de nitrogênio. Outra característica dos bacilos é o grande potencial em produzir substâncias capazes de promover o crescimento vegetal, como hormônios, sideróforos, antibióticos e a capacidade de solubilização de fosfatos. Devido à resistência dos seus endósporos ao stress ambiental, bem como a sua sobrevivência à longo prazo sob condições adversas, bactérias aeróbias formadoras de esporos são ubíquas e pode ser isoladas a partir de uma ampla variedade de fontes. Assim, a ocorrência de bactérias aeróbias formadoras de esporos em um determinado ambiente não é necessariamente uma indicação de habitat. No entanto, é geralmente aceite que o habitat primário das bactérias aeróbias formadoras de esporos é o solo. Assim como o gênero *Pseudomonas*, o gênero *Bacillus* possui vários representantes produtores de substâncias com propriedades surfactantes.

Em 1968 Arima e colaboradores descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, o qual foi denominado surfactina devido à sua grande atividade superficial, tendo, posteriormente, sua estrutura elucidada. Mais tarde, foi registrada a produção desse biosurfactante em meios hidrofóbicos, o que levou a estudos de sua aplicação em tratamento de resíduos de petróleo, recuperação de petróleo, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos. Apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina na década de 60, somente nos anos 80 chamou a atenção de diversos pesquisadores como uma alternativa eficaz para substituir os surfactantes sintéticos, os quais podem ser mais danosos ao ambiente (PEYPOUX *et al.*; 1999). A surfactina é um biosurfactante, constituído de uma mistura de lipopeptídios cíclicos, construído a partir de variantes de um heptapeptídio e uma cadeia hidroxil de ácido carboxílico (KOWALL *et al.*; 1998). Esse composto possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (MUTHUSAMY *et al.*; 2008), além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam

emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (BANAT *et al.*; 2000). No entanto daremos ênfase a capacidade dessa bactéria de inibir o crescimento microbiano.

Diante do exposto acima é necessário monitorar e quantificar comunidades de BRS, onde o foi usado glutaraldeído para avaliar a eficácia desse processo. Porém novas alternativas menos impactantes e mais sustentáveis devem ser propostas em especial utilizando micro-organismos e seus bioprodutos, a fim de minimizar os efeitos ecotóxicos no ambiente.

4 - RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados 2 artigos, sendo que o artigo 1 envolverá os dois primeiros objetivos e o artigo 2 os dois últimos objetivos.

4.1 - ARTIGO 1

Detecção e quantificação de bactérias redutoras de sulfato em amostras de água produzida através Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH)

RESUMO

A caracterização de populações de BRS em períodos distintos em reservatórios com grande quantidade de água produzida possibilita uma melhor compreensão da dinâmica de micro-organismos em reservatórios de petróleo. A detecção e identificação de micro-organismos a partir de amostras ambientais de água produzida oriunda de campos petrolíferos podem ser alcançadas com uma maior veracidade através da hibridização fluorescente *in Situ* (FISH) do que com outras técnicas, com a finalidade de representar e estimar a população endógena. Neste trabalho utilizamos a técnica de FISH para avaliar a composição microbiana de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em amostras diretas de águas a partir de campos de petróleo. A composição da comunidade microbiana foi avaliada por DAPI (4,6-dicloroamino fenol indol) e hibridação fluorescente *in Situ* (FISH), utilizando sondas para 16S rRNA (sondas EUB-338, para Eubacteria e SRB-385, grupo específico para BRS) em três períodos distintos. Foi demonstrado que houve alterações significativas na população de BRS nos poços avaliados devido ao uso de biocida, sendo que em média $95,90\% \pm 1,82$ do total de células coradas com DAPI eram do domínio Eubacteria. E dentro deste domínio, $25\% \pm 20,52$ das células hibridizaram com a sonda para BRS.

Palavras-chaves – bactérias redutoras de sulfato, hibridização *In Situ*, água produzida de petróleo

ABSTRACT

The characterization of SRB populations in distinct periods in reservoirs with large amounts of produced water allows a better understanding of the dynamics of microorganisms in oil reservoirs. The detection and identification of microorganisms from environmental samples produced water coming from oil fields can be achieved with a higher accuracy by fluorescent in situ hybridization (FISH) than with other techniques in order to estimate the endogenous population. In this work we used the FISH technique to assess the microbial composition of sulfate-reducing bacteria (BRS) in direct water samples from oil fields. The microbial community was assessed by DAPI (4,6-dichloroamino indole phenol) and fluorescent in situ hybridization (FISH) using probes for 16S rRNA (probe EUB - 338 for Eubacteria, and SRB -385, specific for BRS) into three distinct periods. It was demonstrated that there were significant changes in the population of the BRS oil wells due to the use of biocide, being on average 95.90 ± 1.82 % of total cells stained with DAPI from the domain Eubacteria. And within this domain, $25 \% \pm 20.52$ cells hybridized with the probe for SRB.

Keywords - sulfate-reducing bacteria, In Situ Hybridization, water produced oil field

INTRODUÇÃO

O poço de petróleo apresenta características anóxicas, o que possibilita o desenvolvimento de um grande número de espécies bacterianas de metabolismo anaeróbico. Dentre essas espécies, encontramos as bactérias redutoras de sulfato (BRS), que se caracterizam pela redução disassimilatória do sulfato a sulfeto, sendo distribuídos em todos os ambientes anóxicos (SASS & CYPIONKA, 2007). A taxa de crescimento anaeróbio lento das BRS pode representar uma grande dificuldade para o isolamento e a identificação dessas bactérias (FITE *et al.*; 2003). Estudos para avaliação da ocorrência e abundância de BRS dentro de uma complexa comunidade microbiana anaeróbica surgiram a partir de informações obtidas pelos métodos convencionais de cultivo bacteriano. Como por exemplo, estas comunidades microbianas podem estar presentes nas instalações de produção de petróleo. No entanto, nem sempre a composição desses meios de cultura reproduzem as condições originais existentes no ambiente extremo; por conta disso, o isolamento de espécies representativas do ambiente fica restrito, podendo ocasionar um erro ou viés na interpretação de informações sobre a diversidade e abundância de BRS. A dificuldade de cultivo pode levar a interpretações errôneas inclusive da atividade metabólica e representam fatores limitantes para o isolamento e identificação dos membros da microbiota, o que pode influenciar também a estratégia de controle das BRS em um campo de petróleo (FITE *et al.*; 2003; KJELLERUP *et al.* 2005; ICGEN *et al.*; 2007).

Por conta da habilidade de metabolizar sulfato, gerando sulfeto de hidrogênio (H_2S), as BRS demandam especial atenção quanto a problemas ocasionados ao meio ambiente e à saúde do trabalhador, pois o sulfeto de hidrogênio (H_2S) é gerado a partir do seu metabolismo, tanto em ambientes anaeróbios quanto em ambientes aeróbios. (MAUKONEN *et al.*; 2006). Dependendo da concentração produzida, o gás sulfídrico pode causar efeitos diversos a saúde humana, que vão desde a emissão de odores desagradáveis, irritações das vias respiratórias e olhos, até a morte em concentrações maiores que 1000mg/L (ANTUNES & MANO, 2004; MAUKONEN *et al.*; 2006). Além disso, este gás é o principal responsável pela corrosão de estruturas metálicas e danos aos sistemas de produção de gás e óleo (VIDELLA, 2003).

O monitoramento dinâmico das populações microbianas em uma amostra ambiental deve ser feito usando métodos sensíveis que sejam capazes de detectar pequenas alterações na comunidade. Os avanços nas técnicas de biologia molecular

aplicadas ao estudo de comunidades microbianas, em sistemas complexos, têm contribuído significativamente para o entendimento da diversidade de espécies e seu metabolismo, inclusive de micro-organismos não cultiváveis (CURY, 2002; MILLS *et al.*; 2003).

Dentro desta perspectiva, e visando um maior entendimento da complexidade do papel dos micro-organismos nas várias etapas da cadeia produtiva do petróleo, métodos moleculares e “*in situ*”, como por contagem direta ao microscópio pode representar uma técnica de grande interesse, por permitir além da quantificação, a visualização da morfologia bacteriana. Dessa maneira, as técnicas de contagem direta com microscopia de fluorescência, têm sido frequentemente utilizadas para estimar de forma mais acurada a quantidade de células em vários ambientes (KEPNER e PRATT, 1994), sendo as mais utilizadas: a coloração com laranja de acridina, a coloração com o 4',6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (KEPNER e PRATT, 1994), e a técnica de Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH) (AMANN, 1995).

O método da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) é baseado na hibridização de células com sondas, geralmente complementar ao RNA (BIDINENKO *et al.*; 1998), sendo particularmente importante para estudos de ecologia microbiana de micro-organismos não cultiváveis (AMANN *et al.* 1992). Com o emprego desta técnica é possível descrever a distribuição temporal e espacial de bactérias aquáticas, e as taxas específicas de micro-organismos nos ciclos biogeoquímicos e na dinâmica da cadeia alimentar; ou seja, é possível determinar quais micro-organismos se sucedem naquele ambiente e quais prevalecem em determinados nichos (BOUVIER, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo detectar, monitorar e quantificar bactérias redutoras de sulfato (BRS) em água produzida, coletada em poços de petróleo em três períodos distintos, através de hibridização fluorescente *in situ* (FISH).

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo

As amostras de água produzida foram coletadas em dois poços de petróleo (poços A e B), em estação de produção localizada no Agreste de Alagoinhas, região de Buracica. Esses poços apresentam uma grande quantidade de água produzida devido à

idade do poço e ao uso de água de injeção como método de recuperação secundária de óleo. As coletas foram realizadas em períodos distintos, sendo realizadas 3 coletas (C1, C2 e C3) em intervalos de 12 meses. A água produzida coletada foi transportada em frasco de borossilicato âmbar até a unidade laboratorial. E todo experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos- LABEM, ICS, UFBA.

Contagem direta de células – DAPI / FISH

Para contagem total (DAPI) de células e contagem diferencial de BRS (FISH), foram centrifugados 150 ml de água produzida de cada poço, para formação dos pellets. Esse pellets foram ressuspensos em 200 µL de PBS (1X) e 600 µL de tampão de fixação com paraformaldeído a 4% em PBS (1X), e então, 5 µL da amostra foram colocadas em lâminas previamente tratadas para a fixação das células (ZARDA *et al.*; 1997). A metodologia adotada para a hibridização segue como descrito em Sarti (2007): foi utilizado 5 µL da amostra para a hibridização com tampão contendo 0.9M NaCl, 20mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS e formamida. As sondas utilizadas para a hibridização foram EUB-338 para Eubactérias e BRS-335 para bactérias redutoras de sulfatos. As lâminas foram mergulhadas em um tampão (20mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS e 80mM NaCl) por 20 minutos e em seguida coradas com 10 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenil indol) durante 20 minutos na ausência de luz. Após este período as lâminas foram lavadas com água Milli-Q e secas em temperatura ambiente. Depois de secas, cada poço da lâmina recebeu 4 µL de solução anti-fading e foram cobertas com uma Hybridization Coverslip, tratamento necessário para evitar o branqueamento das células após o tempo de exposição ao microscópio. As lâminas finalmente foram analisadas no microscópio de fluorescência modelo Olympus BX51, com câmera para captura de imagens Olympus Q-Color e o software Image Pro-Plus versão 5.1

SONDA	SEQUENCIA (5'-3')	ESPECIFICIDADE	REFERÊNCIA
EUB-338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Maioria das Eubactérias	Amann <i>et al.</i> ; 1990
BRS-385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	Maioria das δ – proteobacteria e Desulfovibrionales	Amann et al.; 1990

QUADRO 1 – Sequência das sondas para 16s RNAr utilizadas.

Análise estatística

Os resultados do FISH foram descritos estatisticamente com cálculo da média, desvio-padrão e coeficiente de variação. Com objetivo de demonstrar o comportamento quantitativo dos poços ao longo do experimento, os dados foram tratados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência ou não de diferença significativa entre as quantificações das espécies microbianas detectadas pelas respectivas sondas, em cada coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

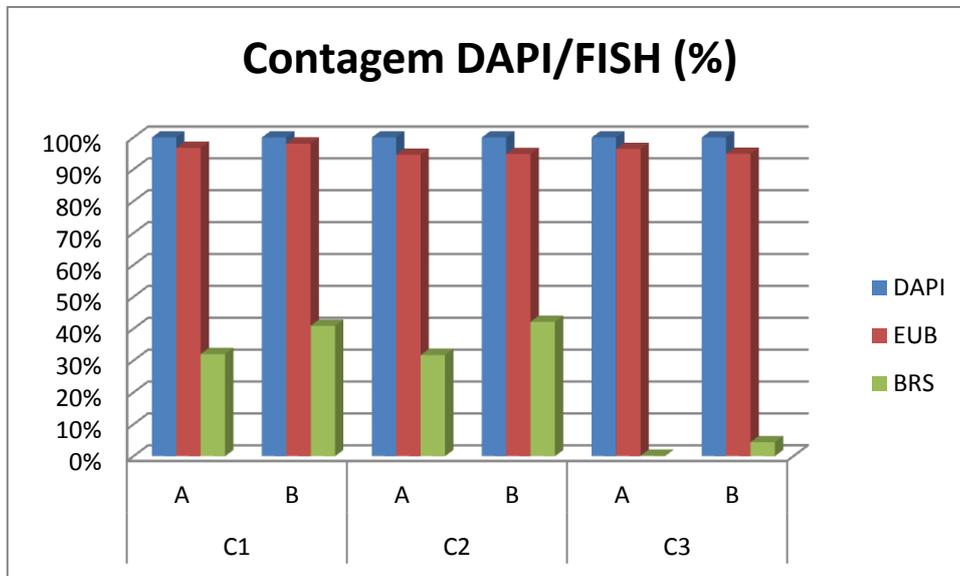
Contagem direta de células – DAPI / FISH

A quantificação relativa dos membros do domínio Eubacteria foi detectada com a sonda EUB-338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'); e as bactérias redutoras de sulfato (BRS) foram detectadas com as sondas específicas para células pertencentes à família e gênero do grupo BRS-385 (5'-CGGCGTCGCTGCGTCAGG-3') que se ligam na fita de DNA na região que codifica o gene 16s do RNAr (AMANN, 1995; HESHAM & ALAMRI, 2012). De acordo com os resultados encontrados foi observado que ao longo das coletas o poço A apresentou uma média populacional de 95,92% e o poço B 95,93%, respectivamente, para o grupo Eubacteria. Com relação a sonda para BRS as médias percentuais foram para os poços A e B: 21,30% e 29,16%, respectivamente. Os valores das quantificações estão na tabela 01, sendo C1 a primeira coleta, C2 a segunda coleta, e C3 a terceira.

Durante os experimentos se percebeu uma grande diversidade morfológica, o que não foi observado na última etapa (C3). O número de BRS obtido a partir das quantificações e análises com FISH ao longo dos 03 períodos de coleta apresentou uma diminuição bastante significativa, o que pode ser relacionado provavelmente ao uso de agentes biocidas. De acordo com os dados apresentados, é notável a extrema importância da aplicação de técnicas moleculares avançadas, como a FISH, como uma ferramenta para determinação das comunidades microbianas envolvidas nos processos de biocorrosão na indústria de petróleo e gás, funcionando também como uma técnica de ação preventiva para controle desses processos.

	C1		C2		C3	
	A	B	A	B	A	B
DAPI	3,08E+03	2,64E+04	1,67E+04	9,03E+04	5,90E+04	2,15E+04
EUB	2,98E+03	2,59E+04	1,58E+04	8,56E+04	5,69E+04	2,04E+04
BRS	9,55E+02	1,06E+04	5,01E+03	3,61E+04	9,80E+01	8,96E+02

QUADRO 01 - Tabela com os valores das quantificações (Contagens com DAPI e FISH – para EUB e BRS) dos poços A e B em três períodos: C1, C2 e C3. Os valores estão expressos em potência de 10.



QUADRO 02 - Composição percentual da comunidade microbiana de água produzida, identificadas por sondas específicas em três momentos distintos.

Análise estatística

Estatística descritiva

DAPI			BRS		
	A	B		A	B
med	2,63E+04	4,61E+04	med	2,02E+03	1,59E+04
desp	2,92E+04	3,84E+04	desp	2,62E+03	1,82E+04
CV	1,11	0,83	CV	1,30	1,15

QUADRO 03 – Resumo da estatística descritiva das contagens com DAPI e FISH (BRS), nos períodos: C1, C2 e C3

Após análise da estatística descritiva foi observada uma variação significativa entre as médias obtidas em cada momento de coleta, sendo visto tanto na contagem total quando na contagem diferencial (BRS). No entanto, depois de realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, foi verificado que essas variações não apresentam significância estatística, sendo o $H_{\text{calc}} = 0,75$ e o $H_{\text{tab}} = 5,6$, com $\alpha = 0,05$. Foi observado também, de acordo com os resultados das análises descritivas, que o poço B apresentou maior número de células totais (DAPI) e também de BRS (FISH) em comparação ao poço A. Porém, a partir do terceiro período de coleta (C3) houve uma redução significativa nos valores para as contagens de BRS, conforme já foi confirmado em outros experimentos em nosso laboratório (GARDNER & STEWART, 2002; GANA *et al.*, 2011).

Podemos inferir que as populações de BRS, diminuíram de forma abrupta tanto nos poço A quanto no poço B, porém as diferenças poço a poço em cada momento da coleta não se mostraram significativos segundo o teste de Kruskal-Wallis (CALLEGARI-JACQUES, 2007).

A Hibridização *in situ*, mostrou-se realmente uma ferramenta eficiente para o estudo da detecção e quantificação de comunidade microbiana complexa, podendo fornecer informações específicas e rápidas sobre esta comunidade (AMANN *et al.*, 1990; 1995; BRYUKHANOV, *et al.*, 2011)., sendo possível observar a presença de bacilos curtos e retos (poço B), bacilos longos e algumas células espiraladas (poço B) e bacilos curvos e pequenos, sendo que na água produzida do poço A, a predominância foi de

bacilos curtos. Em relação à análise quantitativa dos micro-organismos foi possível observar que a água produzida do poço B tem um número maior de micro-organismos em comparação à água produzida do poço A, além de uma diversidade morfológica, com exceção na coleta C3 onde a população geral e relativa do poço A foi maior do que a do poço B.

CONCLUSÃO

As técnicas utilizando sondas de rRNA, assim como o FISH é o método de escolha para muitos estudos em que a quantificação de células e sua distribuição espacial necessitam ser determinados. A metodologia está sendo continuamente melhorada. Até agora, no entanto, a análise microscópica por FISH não foi totalmente automatizada o que seria desejável em muitas investigações ecológicas, podendo o FISH ser também utilizado como ferramenta para monitorizar as condições de um dado processo de biorremediação de esgotos industriais utilizando BRS de forma a otimizar o método de biorremediação utilizado e, simultaneamente, controlar a ocorrência de corrosão nas instalações industriais causada pelas BRS (KUMARASWAMY *et al.*, 2011). A precisão da quantificação ainda continua a ser uma tarefa desafiadora, mas os resultados parecem mostrar valores muito próximos dos valores reais (HESHAM & ALAMRI, 2012).

4.2 - ARTIGO 2

Estudo de dinâmica microbiana *in vitro* de linhagens produtoras de surfactante e bactérias redutoras de sulfato em água produzida do petróleo.

RESUMO

A produção de gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio (H₂S) por bactérias redutoras de sulfato (BRS) é um problema mundial da indústria de petróleo e gás natural e as regiões relacionadas, gerando impactos ao meio ambiente, e também ocasionando os problemas de corrosão industrial. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da dinâmica de crescimento de BRS com bactérias aeróbicas produtoras de biosurfactante numa tentativa de controlar a biosulfetogênese. O sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi detectado de forma qualitativa após a formação de sulfeto de ferro (FeS) e a produção de surfactante foi avaliada pelo teste de emulsificação em 24h (E₂₄). A população microbiana total foi determinada através da técnica de Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH). Houve produção de sulfeto nos tratamentos onde o micro-organismo teste foi *Pseudomonas aeruginosa* (TPS), *Bacillus* spp. (TBC) e no mix de *P. aeruginosa* e *Bacillus* spp. (TMIX), sendo no tratamento TBC mais significativo. Não houve produção de surfactante, nem inibição de BRS em nenhum tratamento teste.

Palavras-chaves – bactérias redutoras de sulfato, hibridização *In Situ*, água produzida de petróleo

ABSTRACT

The production of hydrogen sulfide (H₂S) by sulfate-reducing bacteria (SRB) is a worldwide problem of oil and natural gas industry and related regions, generating impacts on the environment, and also leads to the problems of industrial corrosion. The present study was aimed to evaluate the dynamic growth of SRB with biosurfactant - produced by aerobic bacteria in an attempt to control the biosulfetogênese. Hydrogen sulfide (H₂S) was detected qualitatively after the formation of iron sulfide (FeS) and surfactant production was assessed by the emulsification test in 24 (E24). The total microbial population was determined using the technique of fluorescent in situ hybridization (FISH). There were sulfide production in the treatments where the test microorganism was *Pseudomonas aeruginosa* (TPS), *Bacillus* spp. (TBC) and the mix of *P. aeruginosa* and *Bacillus* spp. (TMIX), being more significant in treatment TBC. There was no surfactant production, neither inhibition of SRB in any test.

Keywords - sulfate-reducing bacteria, In Situ Hybridization, water produced oil field

INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são micro-organismos heterotróficos anaeróbicos, e algumas espécies são restritas a ambientes anóxicos. Os processos corrosivos mediados por BRS afetam várias indústrias, entre as quais as petrolíferas, de gás, de distribuição e tratamento de água (ITO *et al.*; 2002 e ICGEN *et al.*; 2006) de engenharia civil (MAGALHÃES, 2007) e construção naval entre outras, causando danos nas suas estruturas, como sistemas de refrigeração, tanques, condutas e tubulações, cascos de embarcações, etc. Os danos causados pelas BRS traduzem-se em elevados prejuízos econômicos, sobretudo associados à biocorrosão, mas também em problemas de saúde e segurança. A importância das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) na indústria de petróleo está relacionada aos processos de biosulfetogênese e biocorrosão, onde em 95% dos casos, as BRS estão envolvidas (BERNADEZ *et al.*;2007).

A inibição do crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) tornou-se nos últimos anos uma busca incessante, devido aos efeitos deletérios provocados pela biosulfetogênese, tais como “*souring*” e corrosão metálica induzida por micro-organismos (BERNADEZ *et al.*;2007), devido a acidificação do meio, provocando uma maior disponibilidade de ions H^+ .

A utilização de bioprodutos na tentativa de inibir o crescimento de BRS vem se tornando uma alternativa promissora devido à grande aplicabilidade e também devido à aceitação ecológica. Vários trabalhos propuseram soluções para o problema da corrosão, sendo o mais comum a adição de biocidas (glutaraldeído, compostos quaternário de amônio). Devido a sua aceitação ecológica comparada aos surfactantes químicos, os biosurfactantes se apresentam como uma excelente alternativa para determinadas áreas industriais. Além da importância industrial, com aplicação também nas áreas: comercial e biotecnológica, é importante lembrar que os micro-organismos produzem biosurfactantes com finalidades fisiológicas.

Em geral os biosurfactantes permitem que os micro-organismos cresçam em substratos hidrofóbicos, diminuindo sua tensão superficial e conseqüentemente este componente se torna disponível para o seu metabolismo. Admite-se também que a produção desses tensoativos esteja ligada a fatores de virulência e a formação de biofilme (NITSCHKE *et al.*; 2005). Micro-organismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* spp. são relatados com freqüência na literatura científica como excelentes produtores de biosurfactantes.

Ainda que a maioria dos estudos sobre as ações antibióticas produzidas pelos biossurfactantes de *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.* sejam relacionados a fitopatogênicos, Nitschke e Pastore (2002) relatam que os rhamnolipídeos de *P. aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas, sendo que através da excreção destes biossurfactantes no meio, os micro-organismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes

Segundo Cameotra e Singh (2009) a produção de biossurfactantes por bactérias está ligada à alta densidade celular. A presença de biossurfactantes no ambiente desempenha um papel natural, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos, uma vez que aumentam a área superficial das micelas, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando, por conseguinte, a produção de biomassa bacteriana, do organismo produtor e inibindo o crescimento de outros micro-organismos (CAMEOTRA & SINGH, 2009; BANAT *et al.*; 2010; GOMAA, 2012;).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a dinâmica populacional de BRS sobre influência de bactérias aeróbicas produtora de surfactante, a fim de avaliar a possível inibição de seu crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água produzida foram coletadas de poços maduros de petróleo em estação de produção localizada no Agreste de Alagoinhas, região de Buracica. A água produzida foi transportada em frasco de borossilicato âmbar até a unidade laboratorial (Labem - Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos). Foram feitas triagens para a escolha de micro-organismos que seriam utilizados como teste com relação a sua habilidade de degradar hidrocarbonetos, pois os ensaios foram realizados em ambiente composto por hidrocarbonetos. Os micro-organismos triados fazem parte da coleção de culturas do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, sendo os que apresentaram melhores resultados: CCMICS 108 e CCMICS 109.

Triagem dos micro-organismos

1 - *Preparação dos pré-inóculos* - Os isolados utilizados foram denominados como CCMICS 108 (*Bacillus sp.*) e CCMICS 109 (*Pseudomonas aeruginosa*). Os micro-

organismos foram inicialmente repicados em meio líquido TSB, por aproximadamente 16h à 30°C em agitação de 180rpm, para posterior avaliação da capacidade de biodegradabilidade.

2 - *Teste de biodegradabilidade* - Após um período de 16 horas de incubação, foram inoculados em 8,5mL de meio salino mineral contendo 100uL de água produzida (1%), 1mL do inoculo (aprox.10⁶cel/ml). Os tubos foram então incubados por 24h a 30°C em agitação (180rpm). Posteriormente, foi adicionado 45 uL do indicador redox DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol). O indicador DCPIP, tem a finalidade de sinalizar a ocorrência de oxidação biológica do referido petroderivado através de mudança de coloração do meio de cultivo de azul para incolor, ou seja, viragem do indicador da forma reduzida para a forma oxidada. Os tubos ficaram em incubação por 10 dias a 30°C em agitação de 180rpm. O meio salino mineral é composto de 4g de KH₂PO₄, 2g de K₂HPO₄, 1g de NaNO₃, 0,2g de MgSO₄.7H₂O, 0,05g de FeCl₃, 0,02g de CaCl₂.2H₂O, para 1L de H₂O (SANTOS, 2008) contendo um petroderivado como fonte de carbono na concentração de 1% (no caso água produzida).

Amostragem e montagem dos microcosmos

Depois de selecionadas as amostras CCMICS 108 – produtor de surfactina e CCMICS – produtor de raminolípido, foram montados os microcosmos com água produzida (AP) procedente de um poço maduro A2 de uma estação produtora na região do Agreste de Alagoinhas, unidade de Buracica, acrescido de solução aporte (aumentar o aporte de sulfato e nitrato), solução redutora (tornar o potencial redox baixo) e um inoculo microbiano (micro-organismos testes), em frasco de borossilicato de 100ml de volume. A solução enriquecedora era composta de: 0,8mM de nitrato de sódio (NaNO₃), 0,18mM de sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄ * 7 H₂O) e 0,7mM de sulfato de sódio (Na₂SO₄); a solução redutora era composta de: 0,0130g/L de Tioglicolato de sódio, 0,1g/L de ácido ascórbico e 4mL de resazurina 0,025%. Os inóculos microbianos foram retirados da coleção de cultura microbiana do Instituto de Ciências da Saúde (CCMICS), as cepas foram: CCMICS 108 (*Bacillus sp.*) e CCMICS 109 (*Pseudomonas aeruginosa*). Todos os microcosmos tiveram a seguinte composição:

solução redutora – 2,5ml

solução aporte – 2,5ml

inoculo microbiano – 2,0 ml

água produzida A2 – q.s.p. 50ml

Os microcosmos foram denominados de:

TPS – inoculo *Pseudomonas aeruginosa*;

TBC – inoculo *Bacillus sp.*

TMIX – inoculo *Pseudomonas aeruginosa* (1ml) + *Bacillus sp.* (1ml).

TCT – sem inoculo (microcosmo controle)

Depois de realizada a triagem, os microcosmos foram montados com a finalidade de avaliar a capacidade dos micro-organismos testes de inibir as BRS. Os microcosmos foram acondicionados em estufa à 38°C durante 16 dias (384h). Foi retirado um frasco de cada tratamento para cada ponto de retirada da amostra, sem reposição. As amostras foram retiradas em intervalos de 72h a partir do tempo zero (T_0).

Contagem direta de células – DAPI / FISH

Para contagem direta de células e contagem diferencial de BRS dos microcosmos, foram retirados 3ml de cada tratamento, centrifugados e os pellets foram fixados com 200 μ L de PBS (1X) e 600 μ L de tampão de fixação com paraformaldeído a 4% em PBS (1X), Após o período de fixação as células foram colocadas em lâminas previamente tratadas (ZARDA *et al.*; 1997). A metodologia adotada para a hibridização segue como descrita em Sarti (2007). Foi utilizado 5ul da amostra para a hibridização com tampão contendo 0.9MNaCl, 20mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS e formamida de acordo com a sonda a ser utilizada. As lâminas foram mergulhadas em um tampão específico (20mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS e 80mM NaCl) por 20 minutos e em seguida corada com 10uL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenil indol) durante 20 minutos na ausência de luz. Após este período as lâminas foram lavadas com água Milli-Q e secas em temperatura ambiente. Depois de secas, cada poço na lâmina recebeu 4 μ L de solução anti-fading e foram cobertas com uma Hybridization Coverslipe, tratamento necessário para evitar o branqueamento das células após o tempo de exposição ao microscópio. As lâminas foram então analisadas no microscópio Olympus BX51 que possui uma câmera para captura de imagens Olympus Q-Color, e foi utilizado o software Image Pro-Plus versão 5.1.

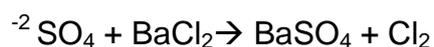
Determinação de parâmetros físico-químicos (Eh/pH)

Para determinação dos parâmetros físico-químicos (o potencial redox Eh, e o potencial hidrogeniônico pH) em cada microcosmo durante os pontos de retirada, foram avaliados utilizando 7ml de cada frasco (tratamento) e colocado em tubos polietileno tipo falcon de 50ml. A leitura do potencial redox foi feita em eagemetro da Thermo Electron Corporation, modelo Orion 3 Star com eletrodo de platina e calamelano saturado, os valores foram expressos em miliVolt (mV). O pH foi medido em peagemetroThermo Electron Corporation, modelo Orion 3 Star. Esses parâmetros indicam as condições eletrolíticas do meio, permitindo a inferência sobre qual via metabólica estava acontecendo durante o teste.

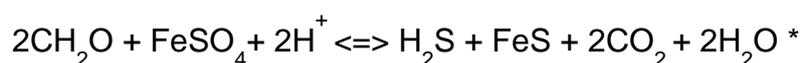
Dosagem de sulfato e sulfeto

Para avaliar o consumo de sulfato e a produção de sulfeto nos testes, foi realizada dosagem dos íons SO_4 , e S^{2-}

1 – SULFATO – A determinação de sulfato foi realizada pelo método turbidimétrico utilizando espectrofotômetro ajustado para comprimento de onda de 420nm, utilizando solução-padrão de sulfato preparada dissolvendo 0,148g de sulfato de sódio anidro em 100ml de água deionizada. Além da solução padrão foi preparada uma solução condicionante com 0,85ml de glicerol; 0,5ml de HCl concentrado; 1,3g de NaCl; 17ml de etanol. Para realização a dosagem de sulfato foi adicionado 0,01g de acetato de zinco à 1ml da amostra ou aprox. 1g da amostra, que foi centrifugada à 6000rpm e o sobrenadante recuperado (0,3ml) e a ele foi adicionado 2,7ml da solução condicionante mas 0,08g de cloreto de bário. O material foi vortexiado até dissolver o cloreto de bário e deixado em repouso por 45 min. A absorbância foi medido em comprimento de onda de 420nm e a reação é descrita conforme a seguinte equação química:



2 – SULFETO – A determinação de sulfeto foi realizada de forma qualitativa pela formação de sulfeto de ferro (que se apresenta com um precipitado de cor negra), oriundo da completa redução do sulfato de ferro. O processo ocorre de acordo com a seguinte reação química.



Para isso cada microcosmo recebeu 0,18mM de sulfato de ferro heptahidratado.

* o sulfeto de ferro é um composto não-estequiométrico

Determinação E24 (produção de surfactante)

Para avaliação da produção de surfactante foi utilizado o teste emulsificação, para isso, foram aliqüotados 5ml de cada tratamento em tubo de polietileno de 15ml. Os tubos com as amostras foram centrifugados à 8000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, foram transferidos para tubo de ensaios de 20m, sendo que 2ml da amostra (em duplicata) foi adicionado a 2ml de óleo mineral. Cada tubo foi colocado no vortex por 2 minutos e deixado em repouso por 24 horas. As análise fora feitas de acordo com o grau de emulsificação do óleo mineral seguindo o seguinte critério:

$$\% E24 = \frac{AE}{AT} \times 100$$

Onde, % E24 é o índice de emulsificação, AE é a altura da zona de emulsificação e AT é a altura total.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Contagem direta de células – DAPI / FISH

Foram analisados três tratamentos, além de um tratamento controle, sendo os tratamentos formados por água produzida, solução redutora, solução enriquecida e inoculo. Os micro-organismos usados foram: *Pseudomonas aeruginosa* (TPS), *Bacillus* sp. (TBC), *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* sp. (TMIX) e controle (sem adição de micro-organismos). Após 96h observa-se formação de precipitado negro (sulfeto de ferro) no tratamento TBC, sendo um indicativo de crescimento de BRS (ver figura 1 TBC 96H). Os tratamentos TPS e TMIX apresentaram formação de sulfeto de ferro após 240h. O tratamento controle não apresentou formação de sulfeto de ferro nem formação de H₂S durante as 384h de monitoramento. As populações de BRS apresentaram um

crescimento rápido e expressivo no tratamento TBC (ver figura 2) indicando uma taxa de consumo de sulfato alta em relação aos outros tratamentos (tabela 1). O tratamento TPS veio a apresentar um aumento expressivo no número de BRS entre 168h e 240h; o tratamento TMIX apresentou um crescimento menor que TBC e TPS, se mantendo estável a partir das 240h. O tratamento TCT além de uma redução no número total de micro-organismos, se manteve praticamente estável com relação ao aumento no número de BRS.

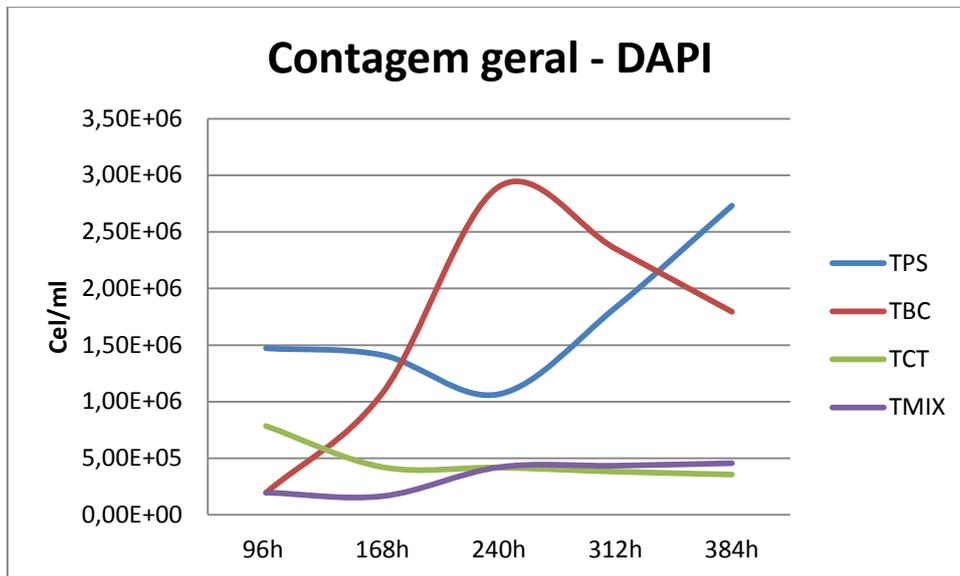


FIGURA 1 – Dinâmica de crescimento microbiano nos tratamentos: TPS, TBC, TCT e TMIX.

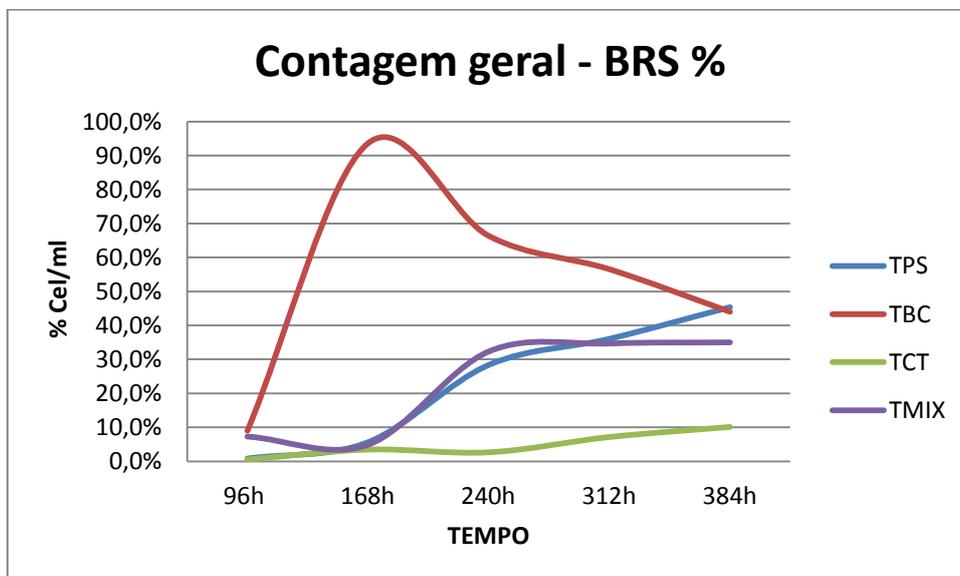


FIGURA 2 – Contagem percentual de BRS nos tratamentos: TPS, TBC, TCT e TMIX, em função do tempo.

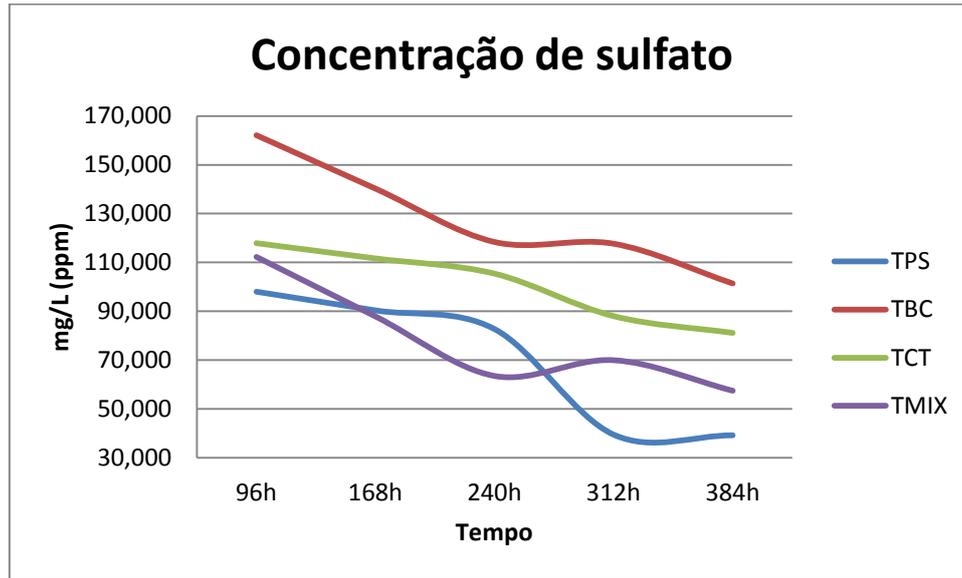


FIGURA 3 – Consumo de sulfato ao longo de 384h. Cada microcosmo de 50 ml recebeu 2,5ml de uma solução de sulfato com 8,47g/L, perfazendo 423,5mg/L nos tratamentos: TPS, TBC, TCT e TMIX.

A partir de t_0 até a formação do sulfeto de ferro, cada tratamento apresentou uma dinâmica de consumo de sulfato própria, sendo que o tratamento TBC apresentou a maior taxa de consumo de sulfato por hora 2,14 mg/L hora; o tratamento controle (TCT) que apresentava apenas micro-organismos oriundos da água produzida apresentou a menor taxa de consumo de sulfato por hora 0,89 mg/L hora; TPS - 1,42mg/L hora e TMIX - 1,5mg/L hora.

Determinação de Eh e pH

Os valores do Eh demonstram a ocorrência de respiração anaeróbica inicialmente de nitrato e posteriormente de sulfato (Eh a partir de -150mV), mostrando uma predominância de condições propícias para o desenvolvimento de BRS (ver figura 5). Os valores do pH se mantiveram mais homogêneos oscilando entre 6,5 e 8,5. O tratamento TCT se mostrou o menos reduzido com valores de Eh acima de -150mV e pH abaixo de 7,5 (ver figuras 4 e 5)

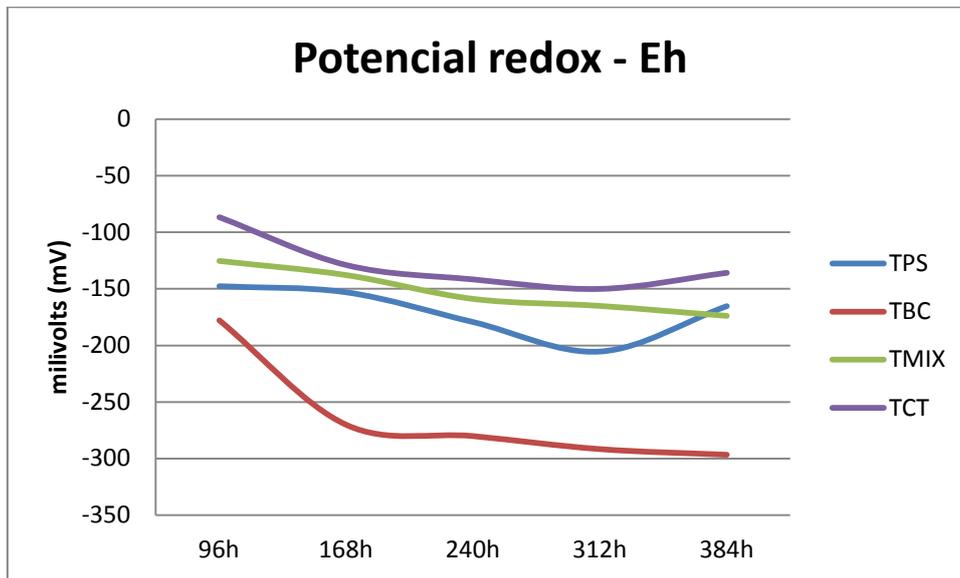


FIGURA 4 – Valores do potencial redox (Eh) para os tratamentos: TPS, TBC, TMIX e TCT

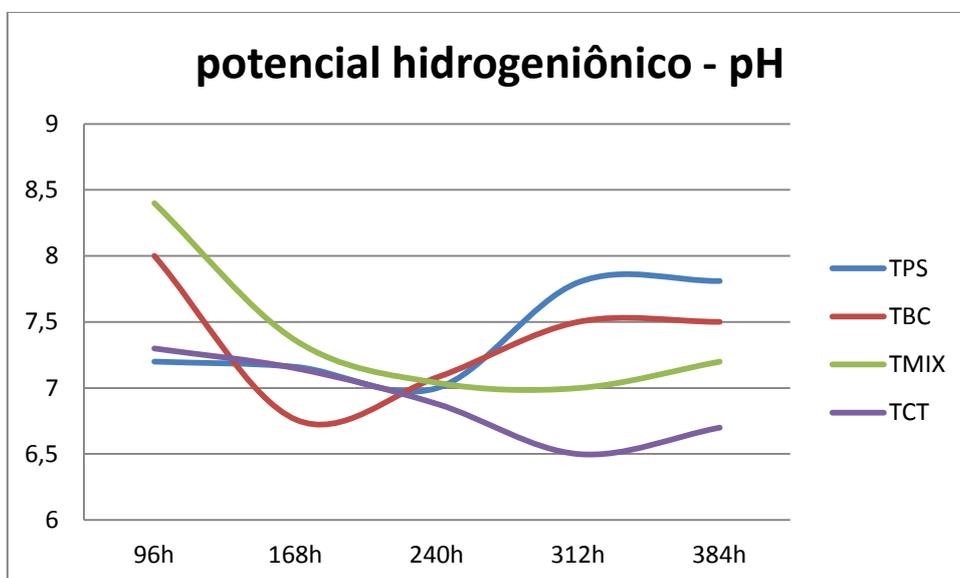


FIGURA 5 – Valores do potencial hidrogeniônico

Avaliação da produção de substâncias surfactante – teste qualitativo E₂₄

Conforme visto na figura 6, podemos observar que a produção de surfactante nos tratamentos TPS, TBC e TMIX, foram insignificantes, ao passo que no tratamento TCT houve uma boa produção. Talvez devido às condições de Eh dos tratamentos, o que não permitiu a assimilação do nitrato como agente oxidante e fonte de nitrogênio (surfactina) e

a utilização da via alternativa do metabolismo energético, que levaria a produção de surfactante com metabolito secundário, (DEZIEL *et al.*; 2003; BENINCASA *et al.*; 2004).

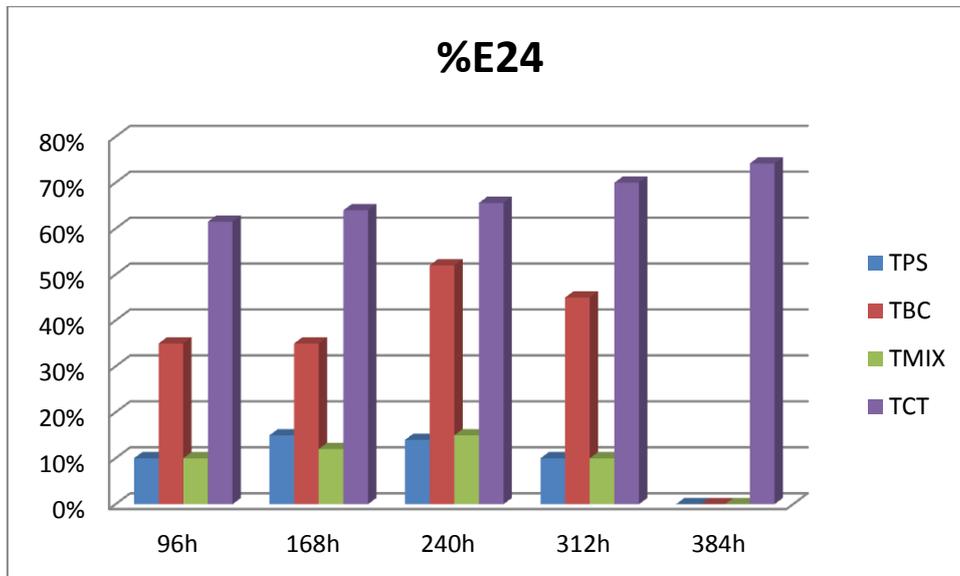


FIGURA 6 – Índice percentual de emulsificação

Avaliação do consumo de sulfato e sulfeto X crescimento microbiano

Com relação ao consumo de sulfato durante o experimento, foi observado que o tratamento TBC foi que apresentou uma taxa de consumo maior 2,14mg/L h de sulfato contra 1,4mg/L h, (TPS) e 1,50mg/L h (TMIX). Chegando a estabilização do consumo e formação de sulfeto de ferro e gás sulfídrico entre às 96h e 168h. A diferença nas taxas de consumo se deve ao fato do comportamento dos micro-organismos do tratamento TBC, que se utiliza com bastante eficiência do oxigênio tornando o ambiente anóxico e com o Eh muito baixo em poucos dias. O tratamento TCT apresentou uma taxa de consumo muito baixa (0,89 mg/L h) o que levou a evidências de um baixo crescimento de BRS.

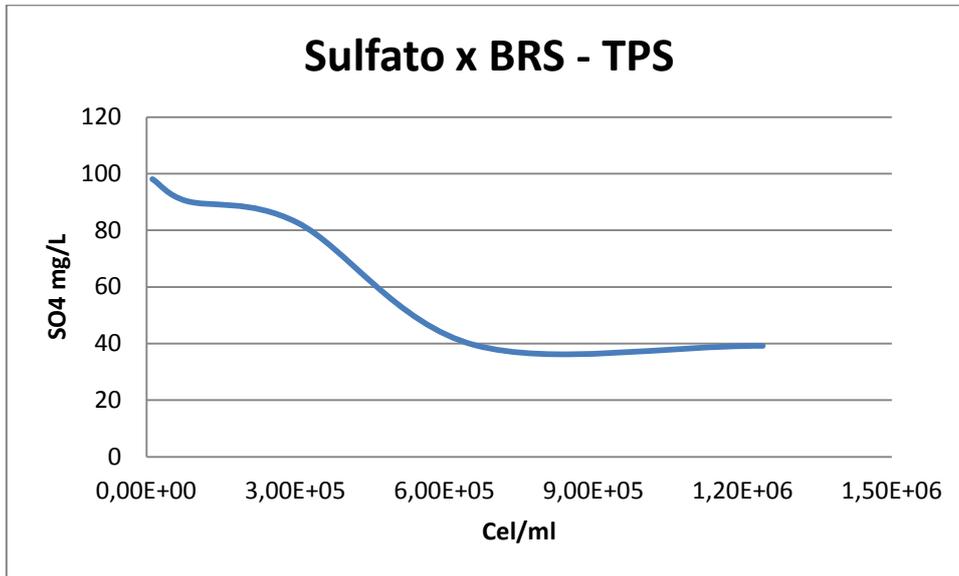


FIGURA 7 – Consumo de sulfato X crescimento de BRS (TPS)

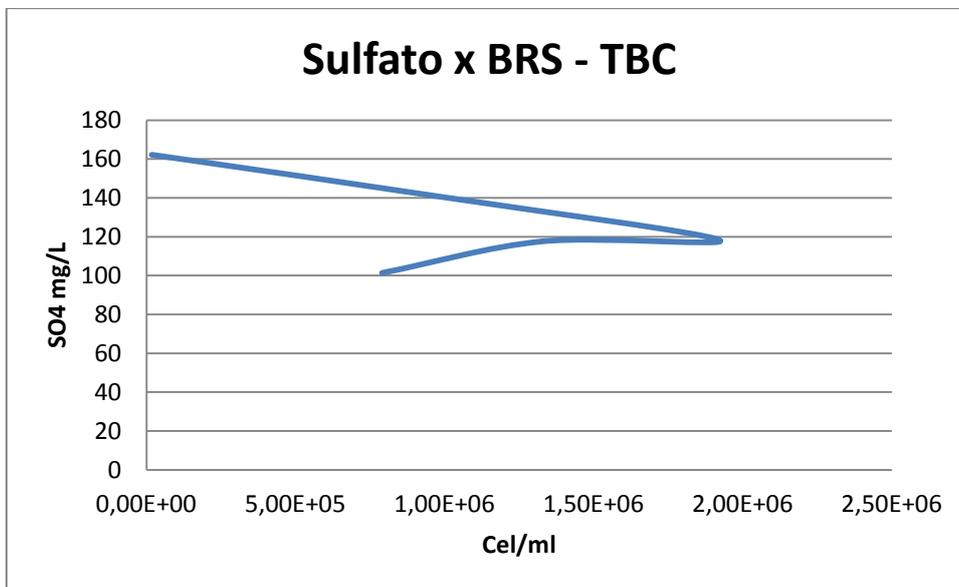


FIGURA 8 – Consumo de sulfato X crescimento de BRS (TBC)

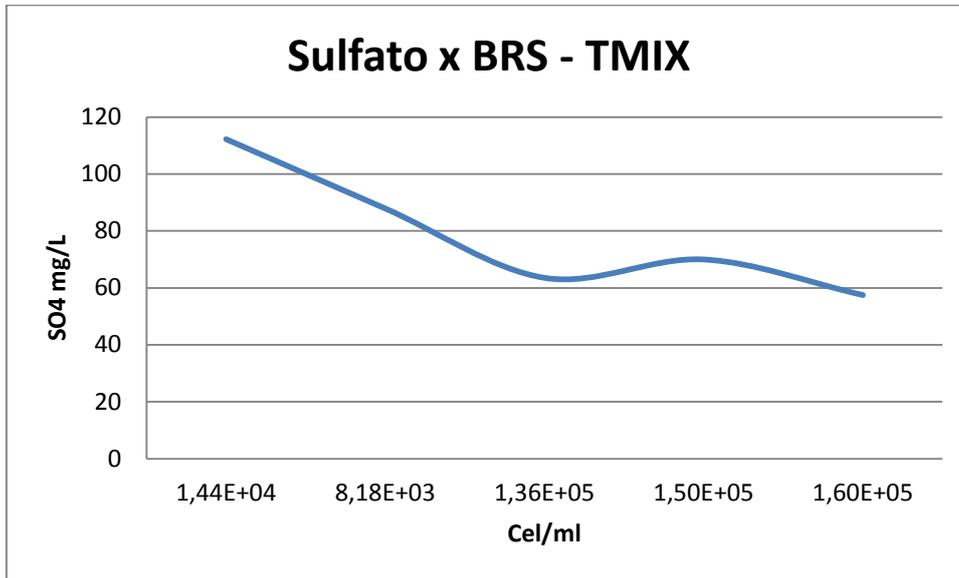


FIGURA 9 – Consumo de sulfato X crescimento de BRS (TMIX)

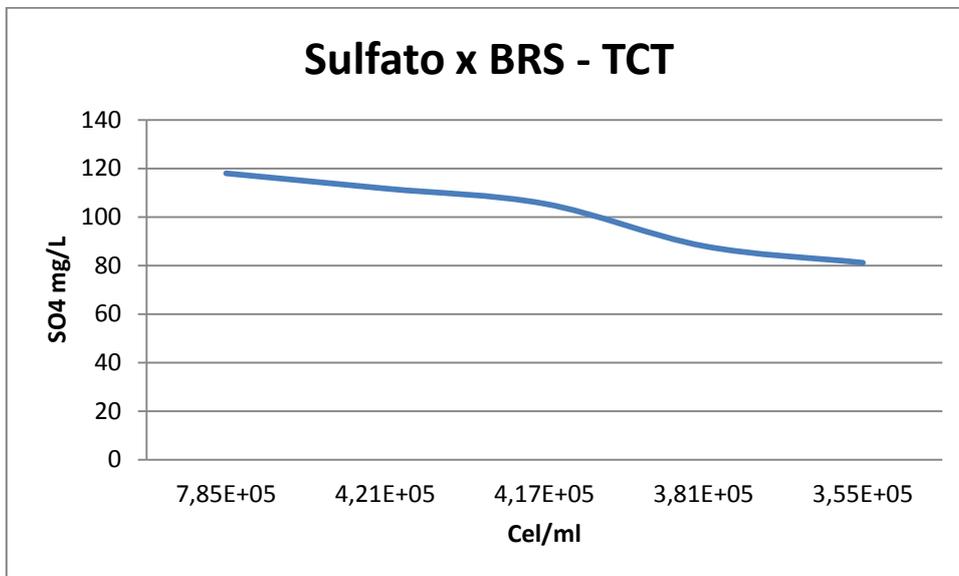


FIGURA 10 – Consumo de sulfato X crescimento de BRS (TCT)

Os resultados determinar se houve inibição da produção de sulfeto foi obtido pela adição de sulfeto no meio tendo como provável resultado a não formação do precipitado negro (sulfeto de ferro)



FIGURA 11 – Formação de sulfeto de ferro (precipitado negro), indicando a atividade das BRS na redução do sulfato.

Segundo Shen e Buick (2004) estudos isotópicos revelaram que a BRS evoluiu bem antes do advento do oxigênio atmosférico. Isto sugeriu que BRS não teria originalmente necessidade para desenvolver mecanismos para suportar o oxigênio e os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio, tais como os radicais superóxido e peróxido. No entanto observações de laboratório e campo demonstraram que algumas BRS podem tolerar oxigênio. A segunda teoria envolve termodinâmica. Considerações termodinâmicas sugerem que as BRS devem ser suplantadas na zona óxica, pois o metabolismo aeróbico apresenta um saldo de energia livre mais favorável do que os valores de energia livre necessário em reações anaeróbicas ($\Delta G^0 = -480$ e -64 kJ/mol de $[CH_2O]$, respectivamente). No entanto, sedimentos microbianos (marinhos ou inudados) são tipicamente anóxicos durante a noite, o que cria um ambiente devidamente apropriado para as BRS durante esse período (VISSCHER *et al.*; 2002). Isto permite que as BRS possam competir com micro-organismos heterotróficos aeróbicos, além disso, alguns pesquisadores acreditam que as BRS possam criar micronichos anóxicos dentro da zona óxica do sedimento que permitiria que as BRS superassem os micro-organismos heterotróficos aeróbicos.

Muitas pesquisas têm sido feitas com o objetivo de demonstrar a influência do oxigênio no crescimento das BRS (SASS & CYPIONKA, 2007). Algumas estirpes de redutores de sulfato são irreversivelmente inativadas por baixas concentrações de oxigênio, enquanto outros conseguem sobreviver em aeração, embora a redução do sulfato seja suprimida pelo oxigênio (DILLING & CYPIONKA, 1990).

Diferentemente da maioria das bactérias anaeróbias, as BRS são capazes de sobreviver na presença de quantidade limitada de oxigênio. Esta tolerância ao ar pode ser atribuída a presença de catalase e superóxido-dismutase (BARTON, 1995). Se a concentração de oxigênio dissolvido no meio estiver entre 0,1 e 1,0 mg/L, as BRS serão inibidas, mas conseguem sobreviver, permanecendo em estado latente. Em concentrações acima de 1,0 mg/L, ocorre a inibição da redução do sulfato, em consequência do aumento do potencial de oxi-redução do meio (SILVA, 2000). Estudos recentes mostram a influência do oxigênio no crescimento de BRS em especial cepas de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (WILDSCHUT *et al.*, 2012). Essas cepas apresentam um vasto leque de enzimas que são ativadas em situação de estresse oxidativo como resposta de defesa. Entre essas enzimas merecem destaque uma superóxido-dismutase DVU2410 e uma catalase DVUA0091 (WILDSCHUT *et al.*, 2012). Com base nos resultados obtidos podemos observar que os micro-organismos testes não foram capazes de inibir o crescimento de BRS. Talvez devido a alguns fatores: os micro-organismos escolhidos são tipicamente aeróbios sendo que com a diminuição de O₂ e uma acentuada queda do potencial redox (Eh), ficou difícil para os micro-organismos teste manter seu metabolismo eficiente, pois até a redução de nitrato fica comprometida em Eh tão baixo; outro fator está no fato de nos primeiros momentos micro-organismos testes efetuarem seu metabolismo de forma aeróbica tendo como resultado compostos orgânicos de baixo peso molecular (compostos de 3C – lactato, piruvato e propionato), preferidos das BRS; um terceiro fator seria com relação a enzima nitrato-redutase que é sintetizada em condições de total anoxia, sendo induzida pela presença de nitrato porém é reprimida pela presença de sulfato. Para que o sulfato iniba a enzima nitrato-redutase sua concentração deve ser entorno de seis vezes maior que a de nitrato o que pode ocorrer mediante a utilização do nitrato, abaixando seus níveis e fazendo com que a concentração de sulfato seja maior que a de nitrato, favorecendo assim o crescimento das BRS (NEMAT *et al.*; 2003; RINCÓN *et al.*; 2008). Guerra-Santos *et al.* (1984) verificaram que não houve produção de biosurfactante por *P. aeruginosa* quando a razão carbono/nitrogênio foi inferior a 11:1, isto é, quando o nitrogênio não é assimilado.

Ainda segundo Guerra-Santos *et al* (1984), o melhor pH para a produção de surfactante estaria entre 6,0 e 6,5. O tratamento TCT (controle) apresentou boa produção, indicando que na população nativa da água produzida há bactérias produtoras de surfactante, que foram estimuladas pelo aporte de nitrato.

Através dos resultados pode-se concluir que a metodologia adotada para avaliação da eficiência da inibição da biosulfetogênese, *in vitro*, não apresentou-se como uma técnica viável para selecionar bases ativas que atuem no controle de processos corrosivos relacionados à ação de BRS.

CONCLUSÃO

O glutaraldeído vem se mostrando um forte biocida com relação à inibição de BRS em poços maduros, porém devido ao seu grande poder ecotóxico, novas alternativas dever ser propostas a fim de minimizar os efeitos tóxicos dos biocidas convencionais no ambiente. Outro fator importante com relação ao glutaraldeído é a aquisição de resistência por parte de alguns micro-organismos (SUN *et al.*, 2012).

Os bioprodutos em especial os de origem microbiana parecem ser os melhores candidatos a essa função. Em artigos recentes já são demonstradas a ação de alguns biosurfactantes com agentes antimicrobianos em especial contra bactérias Gram positivas (MAGALHÃES & NITSCHKE, 2013; GOMAA, 2012).

5 – REFERÊNCIAS

ALCAMO, I.E. **Fundamentals of Microbiology**, Sixth edition, Jones and Bartlett Publishers Inc.; Sudbury, Massachusetts, 2001.

AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A.. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing mixed Microbial Population. **Applied and Environmental Microbiology**, 1990.

AMANN, R. I.; DEVEREUX, R.; KEY, R.; STAHL, D. A. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, 614-623, 1991.

AMANN, R. I.; ZARDA, B.; STAHL, D.A.; SCHELEIFER, K. H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, 3007-3011, 1992.

AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**. v. 59, p.143-169, 1995.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, New York, 1995.

ATLAS, R. M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: KLUG M.J.; REDDY C. A. Current Perspectives in Microbial Ecology. Washington: **American Society for Microbiology**, 1984. p.540-545.

ATLAS, R.M. **Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation**. Marine Pollution Bulletin, v.31,p.178-182, 1995.

AYRES, R. C.; PARKER, M. **Produced Water Waste Mangement**: Technical Report Canadian Association of Petroleum Producers, 2001.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**; v. 53, p. 495-508, 2000

BARTON, L. L. **Sulphate-reducing bacteria**. Biotechnology Handbooks, v. 8, New York, Plenum Express, 1995.

BEECH, I. B. Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion. **Microbiology Today** 30:115-117, 2003.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **Int. Microbiol.** 8:157-168,2005

BEN-DOV, EITAN, BRENNER, A. KUSHMARO, A. Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* Genes. **Microbial Ecology**, 54:439-451, 2007.

BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agro industrial waste enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiol.**; 54(6): 445-449, 2007.

BERNARDEZ, L. A.; LIMA, L. R. P. A.; SOUZA, E. R.; ALMEIDA, P. F. Seleção de materiais para bioreactores operando com bactérias redutoras de sulfato. (Salvador da Bahia): Boletim Técnico da Petrobrás. Technical Report, 2007.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: Melo, I. S. & Sanhueza, R. M. V. (Coords.). Métodos de seleção de micro-organismos antagonísticos a fitopatógenos. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, Manual Técnico, pp. 35-36, 1995.

BLAKEMORE, R.P. Magnetotactic bacteria. **Science** 190: 377–379, 1975.

BOETIUS, A.; RAVENSCHLAG, K.; SCHUBERT, C.J.; RICKERT, D.; WIDDEL, F.; GIESEKE, A.; AMANN, R.; JORGENSEN, B.B.; WITTE, U.; PFANNKUCHE, O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **Nature**, 407:623-626, 2000.

BOTHE, H.; FERGUSON, S.J.; NEWTON, W.E. **Biology of the nitrogen cycle**. Amsterdam, Cost, 2007.

BOTTRELL, S.H; NEWTON, R.J. Reconstruction of changes in global sulfur cycling from marine sulfate isotopes. **Earth-science reviews**, 75, 59-83, 2006

BRITSCHGI, T.B.; GIOVANNONI, S.J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. **Appl Environ Microbiol** 57:1707–1713, 1991.

BROCK, T.D. The study of microorganisms in situ: progress and problems. **Symp Soc Gen Microbiol** 41:1–17, 1987.

BRYUKHANOV, A.L.; KORNEEVA, V.A.; KANAPATSKII, T.A.; ZAKHAROVA, E.E.; MEN'KO, E.V.; RUSANOV, I.I; PIMENOV, N.V. Investigation of the sulfate-reducing bacterial community in the aerobic water and chemocline zone of the Black Sea by the FISH technique. **Mikrobiologiya**, Vol. 80, No. 1, pp. 112–120, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: artmed, 255p 2007.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **Fems Microbiology Ecology** 31(1): 1-9, 2000.

CHAN, K. Y.; XU, L. C.; FANG, H. H. P. Anaerobic Electrochemical Corrosion of Mild Steel in the Presence of Extracellular Polymeric Substances Produced by a Culture Enriched in Sulfate-Reducing Bacteria. **Environ. Sci Technol.** 36:1720-1727, 2002.

COX, M.; NELSON, D; LEHNINGER, L. Principles of Biochemistry. PalgraveMacmillan, 2004.

CRAVO JR.; W. B.; FRANÇA, F. P. Efeito da desaeração parcial do fluxo aquoso em sistema dinâmico na formação de biofilmes. In. 2º Congresso brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo.** Piracicaba, 2002. 84p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz.

CURY, J. C. **Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma.** Piracicaba, 2006. 151. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz.

CYPIONKA, H. Solute transport and cell energetics.Sulfate-reducing bacteria. L.L. Barton. New York, Plenum Press: 152-184, 1995.

DILLING, W.; CYPIONKA, H. Aerobic respiration in sulphate-reducing bacteria. **Arch. Microbiol.** 71, 123–128, 1990.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**, vol. 2, 3rd ed.; Springer, New York, pp. 985–1011, 2006,

EBENHÖH, O.; HEINRICH, R. Evolutionary optimization of metabolic pathways. Theoretical reconstruction of the stoichiometry of ATP and NADH producing systems. **Bull Math Biol** 63(1): 21–55, 2001.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and *In Situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Appl. Environ. Microbiol**, 66:3044-3051, 2000.

EKINS, P.; VANNER, R.; FIREBRACE, J. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications. **J. Clean. Prod.** 15 1302–1315, 2007.

GANA, M. L., KEBBOUCHE-GANA, S., TOUZI, A., ZORGANI, M. A., PAUSS, A., LOUNICI, H., & MAMERI, N. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an Algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 391-404, 2011.

GARDNER, L. R.; STEWART, P. S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 354-360, 2002.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Bio/Technology** 10:60–65, 1990.

GIBSON, G. R. Physiology and Ecology of the Sulfate-Reducing Bacteria. **Journal of Applied Bacteriology** 69(6): 769-797, 1990.

GOMAA, E.Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. African. **Journal of Microbiology Research** Vol. 6(20), pp. 4396-4403, 2012.

HAMILTON, W. A. Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact. **Biodegradation**. v. 9, p. 201-212, 1998.

HARRISON, L. A.; LETENDRE, L.; KOVACEVICH, P.; PERSON, E.; WELLER, D. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var. tritici produced by a biocontrol agent, *Pseudomonas aureofaciens*. **Soil Biol. Biochem.**; v. 25, p. 215-221, 1993.

HESHAM, A.L.; ALAMRI, S. A. Application of fluorescence in situ hybridization(fish) to the analysis of sulfate reducing bacterial community in an oily bench scale reactor. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 44, p. 10221-10226, 2012.

HUBERT, C; NEMATI, M; JENNEMAN, G; VOORDOUW, G. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.272-282. 2005

ICGEN, B.; MOOSA, S.; HARRISON, S. T. L.A Study of the Relative Dominance of Selected Anaerobic Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous Bioreactor by Fluorescence *In Situ* Hybridization. **Microbial Ecology** 53:43-52, 2006.

ICGEN, B.; HARRISON, S.. Exposure to sulfide causes populations shifts in sulfate reducing consortia. **Research in Microbiology**, 784-791, 2006.

ICGEN, B.; HARRISON, S..Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate.**Research in Microbiology**, 922-927, 2006.

ITO, T.; OKABE, S.; SATOH, H.; WATANABLE, Y. Successional Development of Sulfate-Reducing Bacterial Populations and Their Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic Conditions.**Appl. Environ. Microbiol.** 68(3):1392-1402, 2002.

JAN-ROBLERO, J.; ROMERO, J. M.; AMAYA, M.; BORGNE, S. Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64:862-867, 2004.

JASS J.; WALKER, J. T. Biofilms and biofouling. In: Walker, J. T.; Surman, S.; Jass, J.; editors. Industrial biofouling - detection, prevention and control. New York: John Wiley & Sons. p. 1-12, 2000.

KAKSONEN, A. H.; PLUMB, J. J.; *et al.* "The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal- and sulfate-containing wastewater." **Hydrometallurgy** 83(1-4): 204-213, 2006.

KAUR, G.; MANDAL, A. K.; NIHLANI, M. C.; LAL, B. Control of sulfidogenic bacteria in produced water from the Kathloni oilfield in northeast India. **International Biodeterioration Biodegradation**, 63: 151–155, 2009.

KJELLERUP, B. V.; THOMSEN, T. R.; NIELSEN, B. H.; OLESEN, B. H.; FROLUND, B.; NIELSEN, P. H. Microbial diversity in biofilms from corroding heating systems. **Biofouling** 21(1):19-29, 2005.

KORONELLI, T. V.; KOMAROVA, T. I.; DENISOV, Y. V. Chemical composition and role of peptidoglycolipid of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiologiya*, 52:767–770, 1993

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN T.; FRANK, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **J. Colloid Interface Sci.** 204, 1–8, 1998.

KUMARASWAMY, R.; EBERT, S.; GRAY, M.R.; FEDORAK, P.M.; FOGHT, J.M. Molecular- and cultivation-based analyses of microbial communities in oil field water and in microcosms amended with nitrate to control H₂S production. **Appl Microbiol Biotechnol** 89:2027–2038, 2011.

LÜCKER, S.; STEGER, D.; KJELDSEN, K. U.; MACGREGOR, B. J.; WAGNER, M.; LOY, A. Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence *In Situ* hybridization. **Journal of Microbiological Methods** 69:523-528, 2007

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P.. *Brock Biology of Microorganisms*. 12 ed.; New Jersey, Prentice Hall, 2010.

MANEERAT, S. Production of biosurfactant from renewable resources. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.*; 27:675-83, 2005.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHEIFER, K.H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593-600, 1992.

MATIAS, P. M.; PEREIRA, I. A. C. "Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibriobacteria*: a structural biology overview." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 89: 292–329, 2005.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Empraba-CNPMA, 488p, 1998.

MONTEIRO, S.A. **Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*** UFPEDA 614. UFPR, 2007. (TESE) disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/11333/safi%20amaro%20monteiro.pdf;jsessionid=02600e587273588d38a30761aee971fa?sequene=1>.

MOTER, A.; GOBEL, U.L. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiology Methods*, 41, p. 85-112, 2000.

MOTHÉ, C.G.; CORREIA, D.Z.; FRANÇA, P.F.; RIGA, A. Thermal and rheological study of polysaccharides for enhanced oil recovery. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 85, 1-6, 2006.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SWACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants properties, commercial production and application. *Current Sci.*; 94:6, 2008.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59(3):695-700,1993.

MUYZER, G.; TESKE, A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Arch. Microbiol.** 164:165–172, 1995.

MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE; WAWER, C. Denaturing gradient gel eletrophoresis of PCR- amplified 16S rDNA - A new molecular apptoach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular Methods Ecology Manual** - Cap 3.4.4, p 1-23, 1996.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology** 6(6): 441-454, 2008.

NAGL, Gary, Controlling H2S emissions. **Chemical Engineering**, March, p.125-131, 1997.

NEMATI, M.; JENNEMAN, G.E.; VOORDOUW, G. Impact of nitratemediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion. **BiotechnolBioeng** 17: 852-859, 2001.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M.; Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and theirsynergistic interaction with nisin. **Food Control**, v29, p. 138-142, 2012.

MAGALHÃES, F. C. M.; PENNA, M. O.; ANDRADE, C. A. Manual de especificação de qualidade de água de injeção : Fatores associados à ação de microorganismos. Rio de Janeiro: PETROBRAS. CENPES. SEBIO, 1998.

ORPHAN, J.; TAYLOR, L.; HAFENBRADL, D.; DELONG, E. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. **Appl. Environ. Microbiol.** 66. 700–711, 2000.

PERES, F. Tratamento de águas de resfriamento com peróxido de hidrogênio (Tese de Mestrado). (Rio de Janeiro): PUC, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, 2006.

PERFUMO, A.; RANCICH, I.; BANAT, I.M. Possibility and challenges for biosurfactant uses in petroleum industry. **Advances in Exploratory and Med. Biol.**; 672:135-145, 2010.

PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F. O.; SCHÖNHUBER, W.; AMANN, R. Fluorescence *In Situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: Paul, J.; editor. **Methods in Microbiology: Marine Microbiology**, p. 207-226, 2001.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol.** 51:553–563, 1999.

POSTGATE, J. R. – The sulphate-reducing bacteria – Cambridge: Cambridge University Press, 1984.

PRICE, N.; STEVENS, L. Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins. Oxford University Press, 1999.

REINSEL, M. A.; SEARS, P. S.; STEWART, M. J. Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. **J. Ind. Microbiol.** 17:128–136, 1996.

RINCÓN, J.R.T.; GÓMEZ, D.M.C.; CARABALLO, A.E.S.; ÁLVAREZ, J.H.P. Evaluación del molibdato y nitrato sobre bacterias sulfato-reductoras asociadas a procesos de corrosión en sistemas industriales. **Revista Argentina de Microbiología** 40: 52-62, 2008.

ROSA, A. J.; CARVALHO, R. S.; XAVIER, J.A.D.; **Engenharia de Reservatórios de Petróleo**. Editora Interciência, 2006.

SARTI, E. L. **Influência do oxigênio no crescimento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios em batelada**. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo –Hidráulica e Saneamento, 2007.

SANTOS, SIDNEI C. **Prospecção de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactantes com potencial biotecnológico no semi-árido baiano**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.

SASS, H.; CYPIONKA, H.; BABENZIEN, H. D. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. **FEMS Microbiol. Ecol.** 22(3):245-255, 1996

SASS, A.; CYPIONKA, H. in *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems* (eds Barton, L. L. & Hamilton, W. A.) 167–183 (Cambridge Univ. Press, 2007).

SHEN, Y; BUICK, R. The antiquity of microbial sulfate reduction. **Earth-Science Reviews** 64, 243–272, 2004.

SMITH, E.; MOROWITZ, H. Universality in intermediary metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101 (36): 13168-73, 2004

STEPHENSON, M.T. Components of produced water: a compilation of industry studies. **Journal of Petroleum Technology**, p. 548-603, 1992.

SUN, M.J.; SHI, H.D; ZHENG, S. Resistance mechanism of microbial fouling in circulating water to bactericide. **Advanced Materials Research**, v. 347, p. 931-936, 2012.

TABATABAEE, A.; MAZAHERI ASSADI, M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Iranian Journal of Environmental health, Science and Engineering**, 2 (1): 6-12, 2005.

TELANG, J.A.; EBERT S.; FOGHT, J.M.; WESTLAKE, D.W.S. Effects of two diamine biocides on the microbial community from an oil field. **Can J Microbiol** 44:1060–1065, 1998.

TELLEZ, G.T.; NIRMALAKHANDAM, N.; TORRESDEY-GARDEA, J.L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p. 455-470, 2002.

THOMAS, J. E. Fundamentos da engenharia do petróleo. Rio de Janeiro, Interciência: PETROBRAS , 271 p.; 2004.

VEIL, J. A.; PUDER, M. G.; ELLCOCK, D.; REDWEIJK,, Jr.. R. J. A White Paper Describing Produced water From Production of Crude Oil , Natural Gas, and Coal Bed Methane. U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory, 2004.

VIDELA, H. A.; CORROSÃO MICROBIOLÓGICA, 2ª EDIÇÃO, 2003;

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. **Int. Microbiol.** 8:169-180, 2005.

VIVIAN, C.M.; CABELLO, P.; LUQUE, M.M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573-6584, 1999.

WIDDEL, F. Microbiology and Ecology of Sulfate and Sulfur-Reducing Bacteria. In *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. Alexander J. B. Zehnder, John Wiley & sons, Inc.; EUA, 469 – 586, 1988.

WILDSCHUT, J.D.; CAFFREY, S.M.; VOORDOUW, J.K.; VOORDOUW, G. Oxygen exposure increases resistance of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to killing by hydrogen peroxide. **Antonie van Leeuwenhoek** 101: 303-311, 2012.

ZARDA, B.; HANN, D.; CHATZINOTAS, A.; SCHONHUBER, W.; NEEF, A.; AMANN, R. I.; ZEYER, J. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. **Arch. Microbial**, 1997.

ZHAO, Z., WANG, Q., WANG, K.; BRAIN, K.; LIU, C.; COU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* in vitro and identification of its antifungal component. **Biores. Technol.**

