



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

LUCIANA REIS LIMA

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO,
UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* (FISH) E qPCR, EM AMOSTRAS DE ÁGUA PRODUZIDA EM
POÇOS DE PETRÓLEO MADUROS.**

DISSERTAÇÃO

Salvador-BA

Junho, 2016

LUCIANA REIS LIMA

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO,
UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE
in situ (FISH) E qPCR, EM AMOSTRAS DE ÁGUA PRODUZIDA EM
POÇOS DE PETRÓLEO MADUROS.**

*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 grau de
Mestre em Biotecnologia.*

*Orientadora: Dr.^a Josilene Borges Torres Lima
Matos*

Coorientador: Dr. Paulo Fernando de Almeida

Salvador-BA

Junho, 2016

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Reis Lima, Luciana

Quantificação de bactérias redutoras de sulfato, utilizando as técnicas de Hibridização Fluorescente in situ (FISH) e qPCR, em amostras de água produzida em poços de petróleo maduros. / Luciana Reis Lima. -- Salvador, 2016.

86 f. : il

Orientadora: Josilene Borges Torres Lima Matos.

Coorientador: Paulo Fernando de Almeida.

Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde., 2016.

1. Biomassa. 2. Biotecnologia - Métodos. 3. Hidrogênio - Metabolismo. 4. Petróleo. 5. Biotecnologia . I. Matos, Josilene Borges Torres Lima. II. Almeida, Paulo Fernando de. III. Título.

LUCIANA REIS LIMA

Quantificação de bactérias redutoras de sulfato, utilizando as técnicas de hibridização *in situ* (FISH) e qPCR, em amostras de água produzida em poços de petróleo maduros

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

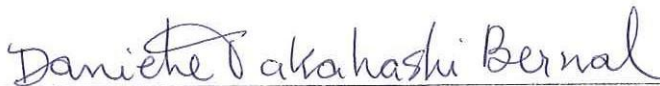
Aprovada em 21 de junho de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Josilene Borges Torres Lima Matos – Orientadora
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Daniele Takahashi Bernal
Doutora em Agronomia (Microbiologia Agrícola) pela Universidade de São Paulo,
USP, Brasil
Universidade Federal da Bahia.



Adailson Feitoza de Jesus Santos
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana,
UEFS, Brasil
Universidade do Estado da Bahia



*Dedico este trabalho a Deus, por nos conceder a força motivadora,
a serenidade e disposição para a realização do mesmo.
A minha família, em especial aos meus pais (Antônio Bartolomeu e
Maria de Lourdes), pelo amor infinito e pela base educacional que
nos foi proporcionada.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me permitido chegar até aqui, por me fazer acreditar que tudo é possível para aquele que tem fé e por me conceder a graça de estar viva.

Aos meus pais Antônio Bartolomeu e Maria de Lourdes, por ter dedicado as suas vidas a mim e aos meus irmãos, por ter nos ensinado a lutar pelos nossos objetivos e a valorizar o trabalho e a conquista.

A Prof.^a Josilene minha orientadora, pelo incentivo, pela paciência, pela compreensão e por possibilitar o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Paulo Almeida, por me acolher no LABEM e por ter me proporcionado essa experiência profissional.

À Estudante de Iniciação Científica Mariane Gonçalves, pela parceria, pelo comprometimento e profissionalismo.

A equipe de BIOPROSPECTOR, sobretudo a Aldinéia e a Brena, pelo carinho, respeito e incentivo nos momentos mais difíceis.

A toda equipe do LABEM em especial a Sueli, Pedro Fróes e Luiz, que contribuíram com as discussões para o desenvolvimento da nossa pesquisa, ao Jacson e a Joalene pela ajuda para a obtenção da água produzida.

A todos os professores que fazem parte do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, pela troca de conhecimentos proporcionados.

A Fundação Osvaldo Cruz- Bahia, por ter viabilizado o sequenciamento do produto da clonagem.

E por fim, mas não menos importante ao meu esposo Juarez por ter suportado os momentos mais difíceis dessa minha caminhada, pelo respeito e amor dedicados a mim.

*Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.*

Charles Chaplin

Lima, Reis Luciana. Quantificação de bactérias redutoras de sulfato, utilizando as técnicas de Hibridização Fluorescente in situ (FISH) e qPCR, em amostras de água produzida em poços de petróleo maduros. 96 f. 2016. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

A acidificação e a Corrosão Microbiologicamente influenciada (CMI) são os principais problemas associados às Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) dentro da indústria de petróleo. Como forma minimizar os problemas citados, a indústria recorre a métodos de controles diversos, dentre os quais se destaca a utilização de biocidas, que por apresentar baixa eficiência e um custo elevado nem sempre são suficientes para conter a ação corrosiva das BRS. Compreender a dinâmica populacional das BRS em campos de petróleo é fundamental, tendo em vista a possibilidade de esclarecer os processos de acidificação e corrosão que acometem os reservatórios e os sistemas de transporte. Deste modo, métodos de cultivo tradicionais são utilizados e apesar da sua importância por vezes subestimam populações complexas. Por outro lado, métodos independentes de cultivo já promoveram uma compreensão destas comunidades em ambientes extremos, quando empregados em paralelo aos métodos tradicionais. O objetivo deste estudo foi testar e validar técnicas moleculares para monitorar em tempo real BRS em amostras de água produzida (AP), a partir de quatro poços (A, B, C e D) em diferentes pontos na região do Recôncavo Baiano, utilizando os métodos FISH, DAPI e NMP (número mais provável). Os dados obtidos evidenciaram a reunião de baixas populações de BRS nos poços pesquisados, e por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Scott Knott, foi observada a significância estatística ($p \leq 0,05$), entre as médias avaliadas para o poço de petróleo C, quando os três métodos (DAPI, FISH e NMP) foram comparados. Os métodos DAPI e FISH também apresentaram um $p \leq 0,05$ para a avaliação do poço D, sugerindo que as limitações encontradas pelo método NMP, para o respectivo poço, foram supridas pelos métodos independentes de cultivo. O qPCR foi empregado no referido estudo para quantificar o número de cópias do gene *dsrA*, responsável pela redução do sulfato, através da quantificação absoluta. Entanto, foi necessário previamente bioestimular uma amostra de AP em três concentrações diferentes (20%, 40% e 60%). Os resultados evidenciaram que a amostra de AP na concentração de 60% permitiu a amplificação do DNA extraído e a validação da metodologia, uma vez que a análise de qPCR mostrou um slope -3,32, uma eficiência de 100,081% e um R^2 de 0,999.

Palavras- chave: Bactérias Redutoras de Sulfato; Técnicas Moleculares; Amostras Ambientais

Lima, Reis Luciana. Quantifying sulfate-reducing bacteria by using the techniques of fluorescence in situ hybridization (FISH) and qPCR in samples of water produced from oil fields. 96 f. 2016. Dissertation (Master) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Acidification and Microbiologically influenced corrosion (MIC) are the main problems associated with Sulfate Reducing Bacteria (SRB) within the oil industry. In order to minimize these problems, the industry refers to methods of controls, among which stands out the use of biocides, which have low efficiency and high cost are not always sufficient to contain the corrosive action of SRB. Understand the population dynamics of SRB in oil fields is essential, given the possibility to clarify the processes of acidification and corrosion that affect reservoirs and the transport systems. Thus, traditional cultivation methods are used and despite its importance sometimes underestimate complex populations. Moreover, independent culture methods have promoted an understanding of these communities in extreme environments when used in parallel to traditional methods. The aim of this study was to test and validate molecular techniques to monitor real-time SRB in produced water samples (AP) from four wells (A, B, C and D) at different points in the Recôncavo Baiano region, using the FISH methods, DAPI and MPN (most probable number). The data obtained demonstrate the meeting of low populations of SRB in the wells oil estimated, through analysis of variance (ANOVA) using the Scott Knott test was observed statistically significant ($p \leq 0,05$) between the average evaluated for the oil well C, when the three methods (DAPI, FISH and NMP) were compared. The methods DAPI and FISH also showed $p \leq 0, 05$ for the assessment, for oil well D suggesting, that the limitations encountered for NPM method, at the respective oil well, were misted by the independent cultivation methods. The qPCR was used in reefed study to quantify the number of copies of DSRA gene responsible for sulfate reduction, using absolute quantification. However, it was previously necessary biostimulation one AP sample at three different concentrations (20%, 40% and 60%). The results showed that the PA sample at a concentration of 60% allowed the amplification of DNA extracted and validation the method, since the qPCR analysis showed a slope -3.32, an efficiency 100.081% and a R^2 0.999.

Key words: Sulfate-Reducing Bacteria; Molecular techniques; Environmental sample

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Bioquímica da redução do sulfato. Esquemas das reduções assimilatória e dissimilatória, em que duas formas de sulfato ativas podem ser reduzidas: adenosina 5- fosfosulfato (APS) e fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS).</i>	23
Figura 2– <i>Representação das interações de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) com o meio ambiente.</i>	25
Figura 3- <i>Amostras de água produzida, originadas de campos de petróleo, de 2014 a 2016.</i>	37
Figura 4– <i>Fluxograma representativo da primeira etapa realizada no experimento (Quantificação da população das BRS (FISH) e população global (DAPI) em comparação com o mé todo dependente de cultivo (NMP)).</i>	38
Figura 5- <i>Fluxograma representativo da segunda etapa realizada no experimento (Quantificação do número de cópias dos genes dsrA, a partir da sequência parcial do genoma do Desulfovibrio vulgaris, através da real time qPCR, para a validação da técnica em amostras de AP).</i>	39
Figura 6 - <i>Mapa do Vetor (pCR™4-TOPO® TA), utilizado para a clonagem do Desulfovibrio vulga- ris.</i>	53
Figura 7- <i>Porcentagens das células que não hibridizaram com a sonda na contagem total com o DAPI e das células que hibridizaram através da técnica de FISH, para as amostras de água produzida, dos poços A, B, C e D.</i>	57
Figura 8 - <i>Parâmetros físico-químicos das amostras de água produzida, dos poços A (ES), B (CP), C (CP) e D (TS), entre os meses de Outubro de 2014, Março e Junho de 2015 e Março 2016.</i>	59
Figura 9 – <i>Comparação entre as médias populacionais obtidas, para os poços A, B, C e D, utilizando o método DAPI.</i>	62
Figura 10– <i>Comparação entre as médias populacionais obtidas, para os poços A, B, C e D, utili- zando o método FISH.</i>	63
Figura 11– <i>Comparação entre as médias populacionais obtidas, para os poços A, B, C e D, utilizando o método NMP.</i>	63
Figura 12– <i>Comparação entre os métodos DAPI, FISH e NMP, empregando o teste Scott Knott.</i>	64
Figura 13 – <i>Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos clones do Desulfovibrio vulgaris purificados com o Pure Link Quick Pasmid Miniprep Kit.</i>	66

Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos clones, após o corte com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> , para o DNA plasmidial do <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .	67
Figura 15 – Amplificação da curva de eficiência, para os primers desenhados <i>RTdsrAF</i> e <i>RTds- rAR</i> , na concentração de 10 μ M, em cinco pontos, por triplicata.	69
Figura 16 – Curva de eficiência dos primers desenhados <i>RTdsrAF</i> e <i>RTdsrAR</i> , para a concen- tração de 10 μ M, em cinco pontos, por triplica..	70
Figura 17 – Curva de Melting dos primers <i>RTdsrAF</i> e <i>RTdsrAR</i> , para a concentração de 10 μ M, em cinco pontos.	71
Figura 18 – Perfil eletroforético das amostras de AP bioestimuladas, para as concentrações de 20%, 40% e 60%.....	72
Figura 19 -Curva padrão da amostra bioestimulada (AP 60%) no experimento A, para a quantifi- cação do alvo <i>dsrA</i> , através da real time qPCR.....	74
Figura 20 - Quantificação do gene alvo (<i>dsrA</i>), a partir de 2 μ L da amostra de água produzida bioestimulada (AP 60%) experimento B, em real time qPCR.....	75
Figura 21 -Amostra bioestimulada AP 40% que não apresentou amplificação para a análise em.....	76
Figura 22 - Sequência E09-1 <i>DSR1F</i> editada pelo programa da Embrapa (<i>Electropherogram qalyty analysis</i>).....	95

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** *Descrição dos poço, pontos e periodos em que ocorreram as coletas para as amostras de AP. 58*
- Quadro 2-** *Comparação entre as espécies de Desulfovibrio identificadas, a partir dos clones DSV1, DSV2 e DSV3, que apresentam similaridade entre as demais sequências dos micro- organismos catalogados no Gen Bank 68*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Concentração de G e C (%), <i>TM</i> e <i>Harping</i> descritos para o desenho dos primers (<i>RTdsrA F eRTdsrAR</i>).....	45
Tabela 2 - Reagentes utilizados para a reação de PCR, com um volume final igual a 25µL. ..	47
Tabela 3 – Composição da solução utilizada na AP para a bioestimulação	50
Tabela 4 – Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos (<i>pH</i> e <i>Eh</i>), das amostras bioestimuladas, em diferentes concentrações (20%, 40% e 60%) de água produzida (AP). .	51
Tabela 5 - Determinação do número de moléculas existentes no plasmídeo <i>pCR™ 4-TOPO® TA</i> , para a confecção da curva padrão em <i>real time qPCR</i>	55
Tabela 6 - Resultados das contagens entre os métodos (<i>DAPI</i> , <i>FISH</i> e <i>NMP</i>), referentes aos pontos A, B, C e D, entre os meses de Outubro de 2014, Março e Junho de 2015 e Março de 2016.	61
Tabela 7 – Quantificação dos plasmídeos originados da clonagem, a partir da cultura do <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	67
Tabela 8 – Quantificação do DNA extraído, para amostras de água produzida bioestimuladas (AP 20%, AP 40% e AP60%), no <i>NanoDrop</i>	72
Tabela 9 – Quantificação do gene alvo (<i>dsrA</i>), a partir de 2µL da amostra de água produzida bioestimulada (AP 60%) experimento A, em <i>real time qPCR</i>	74
Tabela 10 Quantificação do gene alvo (<i>dsrA</i>), a partir de 2µL da amostra de água produzida bioestimulada (AP 60%) experimento B, em <i>real time qPCR</i>	75
Tabela 11 – Diluição seriada do DNA plasmidial do <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , em que foi utilizando o vetor <i>pCR™ 4-TOPO® TA</i> , com os valores de títulos e concentrações para a confecção da curva padrão em <i>real time qPCR</i>	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP (Adenosina Monofosfato)
AP (Água Produzida)
APS (Adenosina Phospho- Sulfate)
ATCC (American Type Culture Collection)
ATP (Adenosina 5'-fosfosulfato)
BLAST (Basic Local Alignment Editor)
BRN (Bactérias Redutoras de Nitrato)
BRN-OS (Bactérias Redutoras de Nitrato capazes de Oxidar Sulfeto)
BRS (Bactérias Redutoras de Sulfato)
CMI (Corrosão Microbiologicamente Influenciada)
Cq (Ciclo de quantificação)
Ct (Cycle threshold)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) DNA (Ácido Desoxirribonucleico)
DQO (Demanda Química de Oxigênio)
FISH (Hibridização Fluorescente in situ)
IDT (Integrated DNA Technology)
MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)
mL (Mililitro)
mM (Milimolar)
NCBI (National Center for Biotechnology Information)
NMP (Número Mais Provável)
PASPS (Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)
pb (pares de bases)
PCR (Polymerase Chain Reaction)
PI (Iodeto de Reatem)
PIB (Produto Interno Bruto)
PPi (Pirofosfato)
PRS (Procariontes Redutores de Sulfato)
RDML (Real-Time PCR Data Markup Language Real time PCR Polymerase Chain Reaction Real time)
rRNA (Ácido Ribonucleico ribossomal)
μL (Microlitro)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Importância do estudo da biosulfetogenese e da corrosão na indústria de petróleo	21
2.2	Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS): Considerações Gerais	22
2.3	Métodos utilizados para o controle das BRS na indústria de petróleo	27
2.4	Métodos moleculares para quantificação e identificação do grupo das BRS	28
2.4.1	Utilização da <i>real time qPCR</i> e Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) para quantificação e identificação de BRS	30
2.5	Problemas relacionados à extração do DNA microbiano em amostras água produzida (AP)	32
2.6	Utilização de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> como micro-organismo padrão para a identificação do grupo das BRS	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Geral	36
3.2	Específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Delineamento experimental	37
4.2	Quantificação da população de BRS a partir da hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	39
4.3	Protocolo FISH	39
4.3.1	Preparação e fixação da amostra	40
4.3.2	Preparação das Lâminas	40
4.4	Número Mais Provável (NMP)	42
4.5	Análises estatísticas	43
4.6	Quantificação dos genes <i>dsrA</i> e validação da técnica <i>real time qPCR</i> para amostras de água produzida	43
4.6.1	Extração do DNA genômico de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> e amostras de água produzida (AP)	43
4.6.2	Análises de bandas de DNA por eletroforese em gel de agarose	44
4.6.3	Quantificação e pureza do DNA extraído	44
4.6.4	Primers de genes específicos	44
4.7	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	46
4.8	Clonagem	47
4.8.1	Confirmações das células transformadas	48
4.9	Sequenciamento e identificação	48
4.10	Eficiência dos primers RTdsrAF e RTdsrAR	49
4.11	Bioestimulação da água produzida	50
4.12	Confecção da curva padrão para a <i>real time qPCR</i>	52
4.12.1	Estabelecimento da curva padrão para a quantificação absoluta	54
4.12.2	Determinação do número de moléculas plasmidial	54
4.13	<i>real time qPCR</i>	55

4.13.1	<i>Análise dos dados</i>	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	<i>Quantificação das BRS através dos métodos FISH, DAPI e NMP.</i>	57
5.1.1	<i>Quantificação das populações de BRS através dos métodos FISH e DAPI.</i>	57
5.1.2	<i>Comparação entre os métodos DAPI, FISH e NMP.</i>	61
5.1.3	<i>Comparação entre os métodos (DAPI, FISH e NMP), empregando o teste Scott- Knott.</i>	62
5.2	Quantificação dos genes relacionados com a redução do sulfato (dsrA) e validação da técnica real time qPCR.	64
5.2.1	<i>Extração do DNA para as amostras de AP e para a cultura de Desulfovibrio vulgaris.</i>	64
5.2.2	<i>Padronização da temperatura de anelamento (TA) dos primers (DSR1F e DSR4R).</i>	65
5.2.3	<i>Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a cultura de Desulfovibrio vulgaris</i>	66
5.2.4	<i>Clonagem da cultura de Desulfovibrio vulgaris</i>	66
5.2.5	<i>Sequenciamento dos clones de Desulfovibrio vulgaris</i>	68
5.2.6	<i>Otimização dos primers (RTdsrAR e RTdsraF)</i>	68
5.2.7	<i>Análise das amostras bioestimuladas através da real time qPCR</i>	71
5.2.8	<i>Interpretação dos resultados para as amostras bioestimuladas (AP 40% e AP 60%).</i>	73
6	CONCLUSÃO	77
7	REFERÊNCIAS	78
8	APÊNDICES	94
9	ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

A indústria de petróleo e gás natural têm sofrido prejuízos econômicos que estão associados às atividades deletérias das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), sendo as mesmas ocasionadas através da acidificação (souring) dos reservatórios ou por processo da Corrosão Microbiologicamente Influenciada (CMI) (BØDTKER et al., 2009).

A acidificação ocorre em função do acúmulo de gás sulfídrico (H₂S) podendo também ser denominada de biossulfetogênese (CARVALHO et al., 2007; DAVIDOVA et al. 2001). Já CMI ou Biocorrosão é caracterizada como o processo corrosivo que tem início com a formação de biofilmes microbianos presentes nas estruturas metálicas dos sistemas de transporte e armazenamento do petróleo (BEECH, 2003; BEECH, 2004; SOUSA, 2009).

Tanto a acidificação quanto a corrosão, na indústria de petróleo, pode ter origem a partir da recuperação primária do produto (PAULINO, 2007). No entanto, a ocorrência das BRS é mais frequente com a recuperação secundária, que utiliza métodos de injeção de água ou gás ou a reinjeção da água produzida (VIEIRA; SÉRVULO; CAMMAROTA, 2003).

Em campos marítimos, denominados offshore, a recuperação secundária do petróleo pode ser feita tanto através da reinjeção da água produzida; que de acordo com Motta e colaboradores (2013), é o efluente resultante dos processos de separação existentes em estações coletoras e de tratamento na produção de petróleo, sendo esta utilizada a partir de poços próximos aos produtores; ou através da utilização da água do mar, devido a sua disponibilidade e baixo custo (BØDTKER et al., 2009).

Segundo Souza (2009), os fluídos injetores oriundos da recuperação secundária apresentam concentrações de sulfato (SO₄⁻²) em torno de 3.000 mgL⁻¹, o que favorece o crescimento das BRS, por si só, ocasionando a redução de sulfato e gerando a produção do gás sulfídrico (H₂S), este por sua vez reagirá com metais formando precipitados metálicos, o que proporcionará uma incrustação que irá limitar ou bloquear a formação do

petróleo, representando um inconveniente para indústria petrolífera (SOUSA, 2009).

A alta toxicidade do H₂S compromete a segurança da indústria e acarreta riscos significativos para o meio ambiente e para os trabalhadores nos campos de petróleo (CORD-RUWISCH; KLEINITZ; WIDDEL, 1987). Além disso, a produção de sulfeto aumenta o teor de enxofre do óleo bruto diminuindo o seu valor e aumentando os custos de refino (ALMEIDA et al., 2006).

Para prevenir os problemas causados à indústria de petróleo, em função da acidificação e da CMI, métodos de controle e inibição das BRS são utilizados (BEECH, 2004; YANG et al., 2014). Dentre estes métodos os biocidas são definidos como produtos químicos que apresentam baixa efetividade e um alto custo, além de poder gerar cepas de BRS resistentes (JACK; WESTLAKE, 1995; WEN et al., 2009).

Já os métodos de inibição seletiva, empregados para conter a ação das BRS, são menos agressivos ao meio ambiente e foi por esta razão que a utilização do nitrato tornou-se uma prática comum na indústria petrolífera. Por outro lado, conforme exposto por Sousa (2009), o nitrato apresenta uma efetividade temporária, não inibindo determinadas espécies de BRS que são capazes de utiliza-lo com o aceptor final de elétrons, resultando apenas na não formação do sulfeto biogênico.

Para a identificação e quantificação das BRS, a indústria de petróleo geralmente recorre aos métodos tradicionais (dependentes de cultivo), porém a contagem dos micro-organismos isolados apresenta resultados discrepantes quando comparada com a contagem direta de micro-organismos no ambiente, e isto ocorre devido à sensibilidade das células bacterianas ao cultivo, uma vez que há dificuldade de reproduzir *in vitro* as condições físico-químicas ambientais (SANTOS 2011).

Os resultados obtidos pelos métodos tradicionais por vezes são complementados pela análise dos métodos moleculares (TORRES, 2001), e a utilização de ferramentas de biologia molecular tais como: Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e a real time qPCR em pesquisas que se destinam à identificação e quantificação das BRS tornam-se justificáveis, uma vez que possibilitam a avaliação da dinâmica destas comunidades presentes em

amostras ambientais, como no caso da AP originada de poços de petróleo com problemas de CMI (LIMA; ALMEIDA; MATOS, 2016).

O referido trabalho teve como objetivo testar e validar técnicas moleculares para monitorar em tempo real BRS presentes em amostras de AP durante a recuperação de poços maduros, como alternativa aos métodos dependentes de cultivo. Para tanto, os métodos, FISH e DAPI combinados e o método do Número Mais Provável (NMP) foram empregados com o intuito de quantificar populações de BRS existentes nas amostras de AP de quatro poços que foram selecionados com problemas de corrosão.

*Já a real time qPCR foi utilizada para quantificar cópias do gene *dsrA*, responsável pela redução do sulfato, a partir de uma amostra de AP, com a pretensão de validar o método para este tipo de amostra. É importante salientar que pesquisas como esta poderão contribuir para o entendimento dos processos de acidificação e corrosão, uma vez que visa à compreensão da dinâmica populacional das BRS em amostras de AP.*

Em contrapartida este entendimento poderá minimizar os prejuízos econômicos ocasionados à indústria de petróleo, bem como viabilizar a difusão das técnicas moleculares, a partir do momento que disponibiliza informações atualizadas. Ademais, tais estudos visam o desenvolvimento de métodos rápidos para detecção e quantificação das BRS com o intuito de fornecer resultados mais próximos das contagens encontradas em ambientes naturais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do estudo da biosulfetogênese e da corrosão na indústria de petróleo

O acúmulo de gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio (H_2S), produzido por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) tem sido cada vez mais reconhecido como um problema mundial que acomete a indústria de petróleo e gás natural (DUQUE et al., 2013).

Bastin e colaboradores (1926) forneceram os primeiros indícios de que sulfato poderia ser reduzido a H_2S (gás sulfídrico) através da ação de bactérias viáveis em campos de petróleo. Contudo, o que permaneceu como um enigma por muitos anos foi à dúvida sobre a origem destas bactérias. Os pesquisadores questionavam se as BRS faziam parte da microbiota autóctone (introduzidas nos reservatórios de águas descendentes a partir da superfície), ou se eram introduzidas através de operações na produção do petróleo (MAGOT et al., 2000).

As informações obtidas ao longo dos anos revelaram que as BRS presentes na indústria de petróleo, em sua maioria, fazem parte da microbiota autóctone originada do movimento de fluido superficiais em reservatórios, podendo também ser introduzidas por operações de perfuração e pela recuperação secundária do petróleo (ALMEIDA et al., 2006).

Já a acidificação (souring) passou a ser estudada como um fenômeno comum que ocorre tanto em campos terrestres (onshore) e marítimos (offshore); quanto em reservatórios e em superfícies de instalações de processamento (GIEG et al., 2011). Concomitantemente a Corrosão Microbiologicamente Influenciada (CMI) tem promovido impactos ambientais que são evidenciados na forma exacerbada da corrosão do ferro e do aço inoxidável em tanques, dutos e equipamentos de produção, onde milhões de dólares são gastos anualmente (NEMATI; JENNEMAN; VOORDOUW, 2001).

Um estudo realizado nos Estados Unidos (“Os custos da corrosão e de estratégias preventivas nos Estados Unidos”) pela NACE (National

Association of Corrosion Engineers), entre os anos de 1999 a 2001, demonstrou que os gastos com a corrosão poderia chegar a 3,1% do Produto Interno Bruto (PIB) americano à época, o que representava cerca de US\$ 276 bilhões (KOCH, G. H. et al., 2002).

De acordo com o jornal *Diário do Comércio* (2008), os gastos com a corrosão em vários países estariam estimados entre os percentuais de 1%-5% do PBI, o que representava na época para o Brasil algo em torno de 10 bilhões de dólares, sendo que grande parte destes prejuízos estariam associados à indústria de petróleo.

O primeiro estudo que descreveu a CMI foi no ano de 1930, através de uma pesquisa pioneira realizada pelos cientistas Von Wolzogen Kuhr e Vander Klugt, em que os mesmos observaram a causa da aceleração da corrosão anaeróbia externa sobre dutos não protegidos em solos úmidos, associando-a a ação das BRS (VON WOLZOGEN KUHR; VANDER KLUGT, 1934).

A partir das observações iniciais sobre a CMI, propostas pelos pesquisadores supracitados, novas pesquisas em estruturas como: gasodutos, oleodutos e plataformas offshore, visando prevenir danos nos sistemas de transportes de petróleo, tornaram-se possíveis uma vez que essas observações serviram de base para o interesse da indústria petrolífera no desenvolvimento de novas técnicas de detecção, quantificação e controle das BRS (BEECH, 2003; BEECH et al., 2004; SOUSA; CAMMAROTA; SÉRVULO, 2010).

As observações mencionadas também promoveram estudos mais detalhados sobre a natureza e diversidade de bactérias que se desenvolvem em ecossistemas complexos, como é o caso das BRS, visando o entendimento das atividades metabólicas *in situ*, uma vez que estas atividades são amplamente ignoradas (SANTOS, 2011).

2.2 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS): Considerações Gerais

Por volta da década de 60, as BRS foram classificadas em dois grupos distintos, aos quais se encontravam: as bactérias formadoras de esporos, que

deram origem ao gênero *Desulfotomaculum* e as não formadoras de esporos, do gênero *Desulfovibrio* (CAMPBELL; POSTGATE, 1965). Todavia, segundo Madigan e colaboradores (2010), somente em 1895, ao formular a técnica de cultura de enriquecimento, Martinus Beijerinck conseguiu isolar as primeiras BRS.

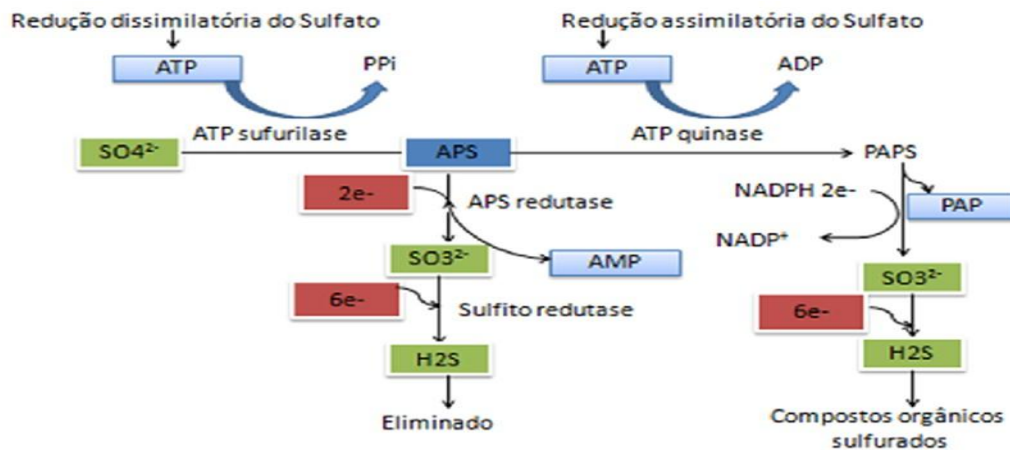
Entretanto, somente após os avanços da *Biologia Molecular*, que possibilitaram as análises das sequências do rRNA, foi possível a classificação das BRS em quatro grupos distintos (BRS mesófilas Gram-negativas; BRS formadoras de esporos Gram-positivas; BRS bactérias termófilas e BRS *Archaea* termofílica), em que foi levando em consideração as características fisiológicas particulares de cada grupo (CASTRO; WILLIAMS; ORGAM, 2000).

Vale salientar que o fato do grupo das BRS estar inserido no domínio *Archaea* tem levantado discussões sobre a nomenclatura utilizada, para a qual alguns pesquisadores preferem se referir as BRS como *Procariontes Redutores de Sulfato (PRS)* (MEYER; KUEVER, 2007; FAN et al., 2012). Sabe-se atualmente, que estes micro-organismos possuem em comum fisiologia única, por ter a capacidade de utilizar sulfato como último aceptor de elétrons na respiração anaeróbia (BARTON; TOMEY, 1995).

O sulfato pode ser reduzido na respiração anaeróbia: em um processo denominado de redução dissimilatória do sulfato, em que os íons de sulfato são reduzidos a sulfeto de hidrogênio (H_2S) pelas BRS e em seguida são excretados (KLEKEMPER, 2005; POSTGATE, 1979).

Outra forma de redução do sulfato ocorre através da respiração aeróbia, pelo processo da redução assimilatória, que pode ser realizada por fungos, plantas superiores e pela maioria dos procariotos. Neste processo os íons de sulfato são utilizados como fonte de enxofre para a realização da biossíntese sendo deste modo, incorporados a várias moléculas orgânicas como aminoácidos e coenzimas (CARVALHO; CEDRAZ; SANTOS, 2015; MADIGAN et al., 2010).

Figura 1-Bioquímica da redução do sulfato. Esquemas das reduções assimilatória e dissimilatória, em que duas formas de sulfato ativas podem ser reduzidas: adenosina 5'-fosfosulfato (APS) e fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS).



Fonte: Adaptado de Quizlet Inc©, 2016.

A redução do sulfato (SO_4^{2-}) a sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um processo complexo visto que os íons de sulfato são estáveis e não podem ser reduzidos antes de serem ativados. Prioritariamente tanto para a redução dissimilatória, quanto para a redução assimilatória, a ativação dos íons de sulfato ocorre por intermédio da enzima ATP sulfurilase, que origina o composto adenosina 5-fosfosulfato (APS, do inglês adenosine phosphosulfate) e o pirofosfato (PPi), que é hidrolisado por pirofosfatase (MUYZER; STAMS, 2008; MADIGAN et al., 2010) (Figura-1).

Ainda de acordo com Madigan e colaboradores (2010), na redução dissimilatória, o sulfato presente no composto APS é reduzido diretamente a sulfito (SO_3^{2-}) pela ação da enzima APS redutase, liberando desta forma a AMP (adenosina monofosfato). Já na redução assimilatória outro fosfato é incorporado ao composto APS, formando a fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS, do inglês phosphoadenosine phosphosulfate).

Alguns representantes do grupo das BRS podem fazer uso do nitrato como aceptor final de elétrons (CYPIONKA, 2000). E isso ocorre em função das mudanças na cadeia alimentar anaeróbia, quando há escassez de sulfato. A partir deste momento as BRS irão competir com bactérias metanogênicas por substratos como: hidrogênio, formiato acetato, propionato e butirato (MUYZER; STAMS, 2008).

Outra situação pela qual as BRS podem crescer sem a presença do sulfato ocorre em alguns casos quando há uma associação simbiótica (syntrophic) com bactérias metanogênicas e bactérias acetogênicas, o que

irá depender das condições ambientais prevalentes (concentração relativa de SO_4^{-2} em relação à concentração da Demanda Química de Oxigênio- DQO) (BRYANT et al., 1967; MCINERNEY; MACKIE; BRYANT, 1981; MUYZER; STAMS, 2008).

De modo mais frequente a presença das BRS está associada a uma ampla disponibilidade de sulfato, geralmente presente em ambientes naturais e na indústria (MUYZER; STAMS, 2008), a exemplo de ambientes como: solo de mangue (PRADA- GAMERO et al., 2004), sedimentos marinhos (LOVLEY et al.1993; LU et al., 2012), águas em estações de tratamento (BEN-DOV; BRENNER; KUSHMARO, 2007), lagos permanentemente congelados (KARR et al., 2005), em campos e reservatórios de petróleo (GIEG et al., 2010; RAJASEKAR et al., 2009; GIEG; JACK; FOGHT, 2011), dentre outros ambientes.

Deste modo as BRS são descritas como seres ubíquos que contribuem para uma variedade de funções essenciais em ambientes anóxicos, como por exemplo: em associação com animais e águas residuais de pântanos, para a biocorrosão e bioremediação, nos ciclos ambientais (tendo papel importante no ciclo do enxofre e do carbono), na deterioração de alimentos, em transformações geoquímicas e para a produção de combustíveis (Figura-2) (BARTON; TOMEY, 1995).

Figura 2– Representação das interações de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) com o meio ambiente.



Fonte: Adaptado de Barton e Tomey, 1995.

A maioria das BRS são consideradas como anaeróbias estritas, o que faz das mesmas incapazes de crescerem na presença de oxigênio, que por sua vez, desempenha o papel de inibidor de crescimento (ALMEIDA et al., 2006). Porém, como citado anteriormente, a natureza microaerófila das BRS tem sido discutida em espécies que utilizam o nitrato como aceptor final de elétrons²⁶ (CYPIONKA, 2000).

O crescimento ótimo para a maioria das BRS ocorre entre 25 e 40 °C, sendo deste modo classificadas como mesófilas. Porém, existem algumas espécies que suportam temperaturas inferiores a -5°C (psicrófilas) ou ainda há as que possuem crescimento em temperaturas elevadas, 75°C (hipertermófilas) (LEANS et al., 2002).

Parâmetros físico-químicos, como o pH (Potencial de Hidrogênio) e o Eh (potencial de Óxido-redução) também podem determinar os tipos metabólicos emergentes em comunidade bacteriana, o que os tornam significativos para a avaliação da atividade biológica (BILLEN, 1973). O pH ótimo para o crescimento das BRS que ocorre em torno de 7,2 (neutrofílicas) existem espécies que toleram ambientes ácidos (pH 4,0) e alcalinos (pH 9,5) confirmando a capacidade deste grupo de micro-organismos para crescer em condições extremas e a sua adaptabilidade a vários ambientes naturais (LEANS et al., 2002; MUYZER; STAMS, 2008).

Já o Eh influencia claramente no desenvolvimento dos micro-organismos que estão presentes em um ambiente (HUSSON, 2012), visto que o crescimento microbiano está diretamente ligado com as mudanças do Eh (KIMBROUGH et al., 2006). De acordo com Ramos (2013), o Eh favorável para as principais BRS encontra-se entre -100 mV e -500 mV.

Levando-se em consideração as condições ambientais encontradas nos campos de petróleo, que apresenta uma ampla disponibilidade de compostos orgânicos, temperatura, pH e Eh favoráveis, justifica-se a regularidade para a presença das BRS em sistemas de transporte e armazenamento neste ambiente (CORD-RUWISCH; KLEINITZ; WIDDEL, 1987).

Há relatos da origem microbiológica do sulfeto na indústria petrolífera á aproximadamente oito décadas (KJELLERU et al., 2005). Como efeito, os danos causados pelas BRS fez com que este grupo de micro-organismos se

tornasse o mais estudado em águas originadas de campos de petróleo (MAGOT et al., 2000).

2.3 Métodos utilizados para o controle das BRS na indústria de petróleo

Os biocidas têm sido descritos, pela literatura, como métodos primários para atenuar o controle de BRS com o intuito de evitar processos de corrosão e na prevenção da acidificação dos reservatórios (WEN et al., 2010). Por essa razão, alguns autores descrevem a sua utilização como parte de uma estratégia global de controle químico, ao qual estão inseridos inibidores de corrosão, aditivos anti-incrustantes, sequestrantes de oxigênio, dispersantes, agentes quelantes e condicionadores de superfície (JACK; WESTLAKE, 1995).

De acordo com a European Commission (1998), “os produtos biocidas podem pôr em risco os seres humanos, os animais e o ambiente de diversas formas, devido às suas propriedades intrínsecas e aos padrões de uso associados”.

Além disso, a indústria de petróleo esbarra em alguns problemas diante da utilização dos biocidas, como por exemplo: custo elevado, baixa eficiência e dificuldade na forma de aplicação, devendo o mesmo ser empregado na dosagem e frequência correta de modo a não favorecer o crescimento de microorganismos resistentes (CAPELLETTI, 2006). Somando-se a isto, o desempenho do biocida poderá ser comprometido por fatores químicos e físicos do ambiente (ARAÚJO, 2013).

Já a inibição seletiva das BRS, através da aplicação do nitrato, se tornou uma medida comum entre as empresas de grande porte no ramo petrolífero. Sabe-se que o nitrato favorece a atividade de Bactérias Redutoras de Nitrato (BRN) e Bactérias Redutoras de Nitrato capazes de Oxidar Sulfeto (BRN-OS), uma vez que a sua utilização assegura um ganho energético maior do que a redução do sulfato, resultando na remoção do sulfeto já formado no ambiente com o aumento do potencial redox (Eh), este fator irá inibir o metabolismo das BRS e conseqüentemente a produção de H₂S (GREENE et al., 2003; SOUSA et al., 2010).

A aplicação do nitrato tem apresentado algumas vantagens relatadas pela literatura, quando comparados com a utilização dos biocidas, visto que o mesmo proporciona a diminuição nos custos com aplicação, além de ser menos agressivo ao meio ambiente. Contudo, a forma de uso do nitrato depende principalmente do modo de aplicação, devendo considerar que células microbianas sésseis se encontram imersas em uma matriz exopolimérica, o que dificulta a difusão do nitrato (DUNSMORE, 2006; SOUSA et al., 2010).

Chama-se ainda a atenção para a existência de espécies de BRS que são capazes de utilizar o nitrato com o acceptor final de elétrons, e este é um fator que compromete a eficiência na utilização do nitrato diante da inibição seletiva, uma vez que com o esgotamento dos íons de nitrato ocorrerá o aumento significativo na população das BRS e isso irá desencadear novamente a produção do sulfeto (SOUSA, 2009; KORTE et al., 2015).

2.4 Métodos moleculares para quantificação e identificação do grupo das BRS

A identificação e, em especial, a quantificação de BRS em instalações onde há a produção de petróleo tem ocorrido em particular através de métodos clássicos, ditos também como dependentes de cultivo. Todavia, apesar da importância de métodos clássicos em análises realizadas a partir do grupo das BRS, estes podem levar a erros de contagem e conseqüentemente a erros na identificação da microbiota (KJELLERUP et al., 2005); isso em função da dificuldade de se reproduzir in vitro as interações microbianas naturais e as condições físico-químicas do ambiente (SANTOS, 2011).

O método clássico que tem sido bastante utilizado para a quantificação do grupo das BRS é o Número Mais Provável (NMP) (VESTER; IGVORSEM, 1998; MELGAÇO, 2015), que de acordo com Silva e colaboradores (2007), consiste em um método de análise quantitativa que possibilita a determinação do número mais provável de um micro-organismo alvo em uma amostra após a sua inoculação em uma série de tubos contendo meio de cultura líquido e adequado ao crescimento deste micro-organismo.

Por outro lado, métodos moleculares também foram integrados à microbiologia do petróleo para a análise de micro-organismos (ORPHAN et al., 2000), tendo como base a análise do DNA, RNA e cDNA bacterianos com o intuito de auxiliar na abordagem microbiológica convencional. Os métodos moleculares, por sua vez, têm sido utilizados com maior frequência a fim de determinar a presença e distribuição espacial de espécies bacterianas individuais, incluindo as BRS, em comunidades complexas como aquelas formadas em biofilmes bacterianos (AMANN et al., 1990; RAMSING et al., 1993; SANTEGOEDS et al., 1998).

Conforme o exposto por Zwirgmaier (2005), a identificação das BRS através de métodos moleculares, tem suprido as restrições encontradas nos métodos clássicos, isso porque os métodos moleculares dispensam o cultivo prévio dos micro-organismos avaliados, o que permite a análise in situ.

Tecnologias como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a PCR em tempo real quantitativo (real time qPCR) e a Hibridização Fluorescente in situ (FISH) tem se mostrado como métodos promissores para estudos que visam à detecção e quantificação de bactérias em ambientes extremos (VIDELA; HERRERA, 2005).

A maior parte das abordagens moleculares envolve inicialmente a amplificação através da PCR baseando-se na investigação dos gene 16S rRNA em bactérias e 18S rRNA em fungos (LAUE et al., 2001; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; CORTEZ, 2009). Com os avanços da Ecologia Microbiana e o desenvolvimento dos métodos moleculares atualmente, encontra-se disponível um grande banco de dados para a sequência do gene 16S rRNA de micro-organismos diversos (VIDELA; HERRERA, 2005).

Dhillon e colaboradores (2003) reiteram que a amplificação por PCR para a análise das sequências do gene 16S rRNA fornece um quadro abrangente em estudos sobre a diversidade microbiana natural e abundância populacional. Somente desta forma é possível identificar e associar os micro-organismos avaliados, como no caso das BRS que foram agrupadas em sete linhagens filogenéticas, sendo estas: Cinco subdivisões pertencentes ao Domínio Bactéria (Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Clostridia, Thermodesulfobacteriia e Thermodesulfobacteria), além de duas

subdivisões pertencentes ao Domínio Archaea (*Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*) (MUYZER; STAMS, 2008).

Vale salientar que a análise baseada apenas no gene 16S rRNA não estabelece uma relação com a fisiologia ou capacidades metabólicas do micro-organismo pesquisado, principalmente em linhagens filogenéticas descobertas, sem isolados de cultura ou fenótipos conhecidos (DHILLON et al., 2003).

Como alternativa ocorre à utilização de genes denominados de funcionais, responsáveis por codificar enzimas importantes, citando caso análogo, a enzima sulfito redutase dissimilatória (DSR), que no caso das BRS, tem sido amplamente estudado (LAUE et al., 2001; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; CORTEZ, 2009; PELIKAN et al., 2016).

A utilização dos genes *dsrA* e *dsrB* para a identificação dos micro-organismos redutores de sulfato e alguns redutores de enxofre ocorre em função destes genes estarem presentes em todas as BRS o que os torna, assim como a enzima DSR, marcadores funcionais viáveis para estudos ambientais. Além disso, o fato de haver poucos eventos de transferências laterais para os genes *dsrA* e *dsrB* o que reafirma a ideia dos mesmos serem marcadores úteis por permanecerem conservados ao longo da evolução (MÜLLER et al., 2014).

Em função disso, a abordagem dos genes funcionais, *dsrA* e *dsrB* para as BRS, têm favorecido o conhecimento da diversidade deste grupo de micro-organismos e também a descoberta de novas linhagens filogenéticas, antes não cultivadas (RAMPINELLI, 2007; MÜLLER et al., 2014).

A exemplo de estudo realizado por Pérez-Jiménez, Yung e Kerkhof (2001), para o qual os autores utilizam primers (indicadores específicos) para os genes *dsrA* e *dsrB*, promoveu a amplificação dos mesmos, o que permitiu a identificação de cepas de BRS em culturas puras e em consórcios microbianos obtidas a partir de sedimentos contaminados por petróleo.

2.4.1 Utilização da real time qPCR e Hibridização Fluorescente in situ (FISH) para quantificação e identificação de BRS

O emprego do método real time qPCR em pesquisas que visam à quantificação de genes funcionais presentes na via metabólica da redução

do sulfato tem sido evidenciado pela literatura (PEREYRA et al., 2010; BENDOY; BRENNER; KUSHMARO, 2007; BISWAS et al., 2014); bem como a análise sobre a dinâmica das comunidades microbianas antes e após a utilização de métodos de controle, através da técnica de FISH (KJELLERUP et al., 2005; HERNDL et al. 2005; LÜCKER et al., 2007).

Contudo, o desenvolvimento dos métodos moleculares só foi impulsionado com o surgimento da técnica da PCR aperfeiçoada por Kary Mullis em 1983. A PCR é uma técnica que permite a amplificação do DNA, RNA e cDNA, *in vitro* e que tem como princípio uma reação enzimática catalisada pela enzima Taq DNA polimerase (COX; DUNDA; O' DONNELL, 2012).

A PCR é uma técnica que apresenta algumas variações dentre as quais se encontra a real time qPCR (PCR em tempo real quantitativo), também é conhecido como qPCR (PCR quantitativo) e que se baseia na detecção e quantificação de compostos fluorescentes diferindo da PCR convencional por monitorar o produto recém-sintetizado ao final de cada ciclo (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; BUSTIN; MUELLER, 2005; BUSTIN et al., 2009).

A técnica real time qPCR utiliza moléculas químicas diversificadas (fluorocromos ou sondas específicas) empregando um composto fluorescente cujo sinal pode ser detectado por um laser presente no termociclador (aparelho responsável por realizar os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão) ao longo do processo (OLIVEIRA, 2010).

É importante destacar que os fluorocromos e as sondas atuam de maneiras diferenciadas: Os fluorocromos intercalam a dupla cadeia de DNA permitindo a sua detecção; já as sondas requerem fluorocromos adicionados às mesmas, com o intuito de detectar uma sequência específica em todos os produtos da PCR.

Atualmente, o fluorocromo mais utilizado para a análise da real time qPCR é o SYBR® Green. Este fluorocromo liga-se a dupla cadeia de DNA e quando excitadas emitem uma fluorescência verde. Já as sondas TaqMan® são oligonucleotídeos marcados e destinam-se à detecção de sequências específicas de DNA amplificados através da real time PCR (OLIVEIRA, 2010; WOZNEY, WILSON, 2012).

Em oposição à técnica real time QPCR, a Hibridização fluorescente in situ - FISH permite a visualização de fragmentos ou amostras de microorganismos em ambientes naturais (ZWIRGLMAIER, 2005); não havendo desta forma a extração do DNA ou até mesmo amplificação dos fragmentos de nucleotídeos (NISHIO, 2010).

A técnica de FISH tem como princípio a construção de sondas de oligonucleotídeos que complementam a região específica do rRNA no microorganismo de interesse, permitindo a contagem diferencial entre as células que hibridizam com a sonda e as células que não apresentam a região alvo (MACHADO, 2006; ZHANG, et al., 2010; NEVES; GUEDES, 2012).

Métodos de coloração inespecíficos podem ser associados à FISH, como é o caso do fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e/ou laranja de acridina, que intercalam o DNA, quando expostos a radiação ultravioleta, corando todas as células a fim de fornecer estimativas populacionais totais da amostra pesquisada (GODINHO, 2010; MOREIRA; LINS, 2010; MADIGAN et al., 2010).

Segundo Zhang e colaboradores (2010), a técnica de FISH também pode ser vinculada a métodos de coloração que possibilitam o acompanhamento do estado fisiológico das comunidades microbianas, sendo o fluorocromo Iodeto de Próprio (PI) um dos mais utilizados para corar ácidos nucleicos de células caracterizadas com defeitos na integridade, emitindo fluorescência, porém quando as membranas citoplasmáticas destas células estão intactas o PI não consegue associar-se ao DNA, não ocorrendo desta forma a emissão da radiação por fluorescência (MARTINS, 2013).

2.5 Problemas relacionados à extração do DNA microbiano em amostras água produzida (AP)

Segundo Motta e colaboradores (2013), Água Produzida (AP) é a água que tem origem de formações subterrâneas trazidas à superfície juntamente com o petróleo e o gás durante a atividade de produção, em que fatores como: a formação geológica, a localização do reservatório, o tempo de vida do reservatório e a produção de hidrocarbonetos podem influenciar de forma

significativa nas características físicas, químicas e biológicas deste tipo de amostra (STEWART; ARNOLD, 2011).

Os principais constituintes da AP são: óleos, minerais dissolvidos da formação, compostos químicos residuais da produção, sólidos da produção e os micro-organismos. Contudo, poucos micro-organismos como o grupo das BRS são evidenciados em amostras de AP devido ao aparecimento da acidificação e da CMI, e isso ocorre em função da elevada presença de agentes tóxicos (DAVIDOVA et al.2001; BEECH, 2003; BEECH, 2004; CARVALHO, 2007; BØDTKER et al., 2009; FAKHRU'LRAZI et al., 2009; SOUSA, 2009).

Para a avaliação do grupo das BRS existentes em amostras de AP muitos pesquisadores optam pela execução de métodos moleculares como a PCR ou a real time qPCR, que são utilizados para a detecção e quantificação destes micro-organismos (ZAPATA-PEÑASCO et al., 2015; BEN-DOV; BRENNER; KUSHMARO, 2007; TANG et al. 2004).

Todavia a extração do DNA ou RNA, requeridos antes da realização dos métodos supracitados, demandam a concentração e a pureza adequada dos ácidos nucleicos, o que pode ser um fator limitante quando se tem a intenção de utilizar os métodos PCR ou real time QPCR (NERIA-GONZÁLEZ et al., 2006), visto que impurezas residuais, tais como hidrocarbonetos, comuns em amostras de AP poderão inibir enzimas de restrição ou a reação de amplificação por PCR (CESPIM, 2008; BRASIL, 2012).

Outro fator que limita a aplicação da PCR ou da real time qPCR, quando a amostra empregada é a AP, são as substâncias utilizadas pela indústria de petróleo com a finalidade de conter a ação das BRS. Dentre estas substâncias estão os biocidas e o nitrato (empregado na inibição seletiva), que são adicionados à amostra a fim de promover a eliminação ou a redução da carga microbiana, o que compromete a real condição populacional encontrada nos poços avaliados (SOUSA; CAMARROTA; SÉRVULO, 2010; GREENE et al., 2003; CAPELLETTI, 2006).

Diante do exposto, o que poderia ser uma alternativa para a degradação de inibidores da PCR e real time qPCR, em particular os hidrocarbonetos, e também para o desenvolvimento de populações microbianas em amostras de AP submetidas aos métodos de controle e

inibição, são as técnicas de bioestimulação, que por sua vez são proporcionadas pela a adição de nutrientes como doadores de elétrons (BENTO et al., 2005; KJELLERUP et al., 2005), visto que as mesmas poderão melhorar as condições das amostras e a qualidade DNA ou RNA após a extração.

Segundo Watkinson e Moegan (1991), em função da complexidade química do petróleo e seus derivados, uma só espécie de micro-organismo não é capaz de promover a degradação completa dos componentes existentes nestes produtos. Deste modo, ainda de acordo com os autores, somente através da atuação dos consórcios microbianos, munidos de uma ampla variedade enzimática, a degradação das moléculas de hidrocarbonetos será realizada.

2.6 Utilização de *Desulfovibrio vulgaris* como micro-organismo padrão para a identificação do grupo das BRS

*O gênero *Desulfovibrio* foi isolado por Martinus Beijerinck no ano de 1895, a partir da contaminação gerada em esgotos na cidade de Delft na Holanda, motivada pela produção do sulfeto de hidrogênio (H₂S) que ocorria em grandes quantidades, com maior predominância durante os meses do verão. As colônias de *Desulfovibrio* isoladas foram caracterizadas morfológicamente por possuir precipitados negros, típicos de sulfeto de ferro e bactérias em forma de bastonetes curvos (VOORDOUW, 1995; CYPIONKA, 2000).*

*Desde então os estudos realizados motivaram progressos singulares no que diz respeito ao metabolismo das BRS,, e em especial da espécie modelo *Desulfovibrio vulgaris* (PECK, 1966; ODOM; PECK, 1981; AUBERT et al., 2000; HEIDELBERG et al. 2004), sobretudo após a divulgação do genoma do mesmo. (HEIDELBERG et al., 2004), o que incentivou uma série de análises transcritômicas e proteômicas associadas ao crescimento do *Desulfovibrio vulgaris* em condições de estresse (CHHABRA et al., 2006; CLARK. et al., 2006; HE et al., 2006; MUKHOPADHYAY et al., 2006, 2007;*

ZHANG et al., 2010; BENDER et al., 2007; TANG et al., 2006; PEREIRA et al., 2008; WALKER et al., 2009; WHANG et al., 2015).

A sequência cromossomal do genoma do *Desulfovibrio vulgaris* apresenta 3.570,858 pares de bases (pb), em que 63,2% são constituídos pela concentração das bases nitrogenadas Guanina (G) e Citosina(C). Já a sequência de codificação, promovida por 3.395 genes, codificam 1.894 proteínas conhecidas (HEIDELBERG et al., 2004).

Por este motivo, segundo Pereira e colaboradores (2008), o metabolismo do *Desulfovibrio* é flexível, contudo bastante complexo, e deste modo estudos mais aprofundados sobre o Gênero são necessários. Por outro lado, as pesquisas que vem sendo realizadas tem promovido o entendimento dos mecanismos de transferência de elétrons e do sistema de conservação de energia do *Desulfovibrio vulgaris*, favorecendo o entendimento dos processos de acidificação dos reservatórios de petróleo e da CMI (WALKER et al., 2009; KORTE et al., 2015, ZAPATA-PEÑASCO et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Testar e validar técnicas moleculares para monitorar em tempo real Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) presentes em amostras de água produzida (AP) durante a recuperação de poços maduros.

3.2 Específicos

Quantificar populações de BRS a partir da hibridização fluorescente in situ (FISH), combinado com a contagem total do fluorocromo DAPI e com o método dependente de cultivo (Número Mais Provável - NMP) em amostras de poços de petróleo;

*Quantificar o número de cópias dos genes dsrA a partir da sequência parcial do genoma do *Desulfovibrio vulgaris*, relacionado com a redução de sulfato, através da real time qPCR;*

Validar a técnica real time qPCR para amostras de água produzida, visando à identificação in situ e pelo processo de bioestimulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Diversos campos de petróleo apresentam problemas de CMI, inclusive poços presentes na região da Bahia. Nesta perspectiva foram avaliadas as amostras de água produzida (AP) dos campos de petróleo, situados no Recôncavo Baiano. As análises foram realizadas nos meses de Outubro de 2014, Junho e Março de 2015 e Março de 2016, para os poços A (ET), B (CP), C (CP) e D (TS) respectivamente, representando os pontos Estação de tratamento- ET, Cabeça de Poço- CP e Tanque de Separação- TS.

As amostras de AP foram transportadas em frascos de borosilicato âmbar (Figura- 3), refrigerados até chegar à unidade laboratorial (LABEM - Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos), onde foram registradas as condições físico-químicas (pH e Eh), seguidas das avaliações pelos métodos FISH, DAPI, NMP e qPCR.

Figura 3- *Amostras de água produzida, originadas de campos de petróleo, de 2014 a 2016.*



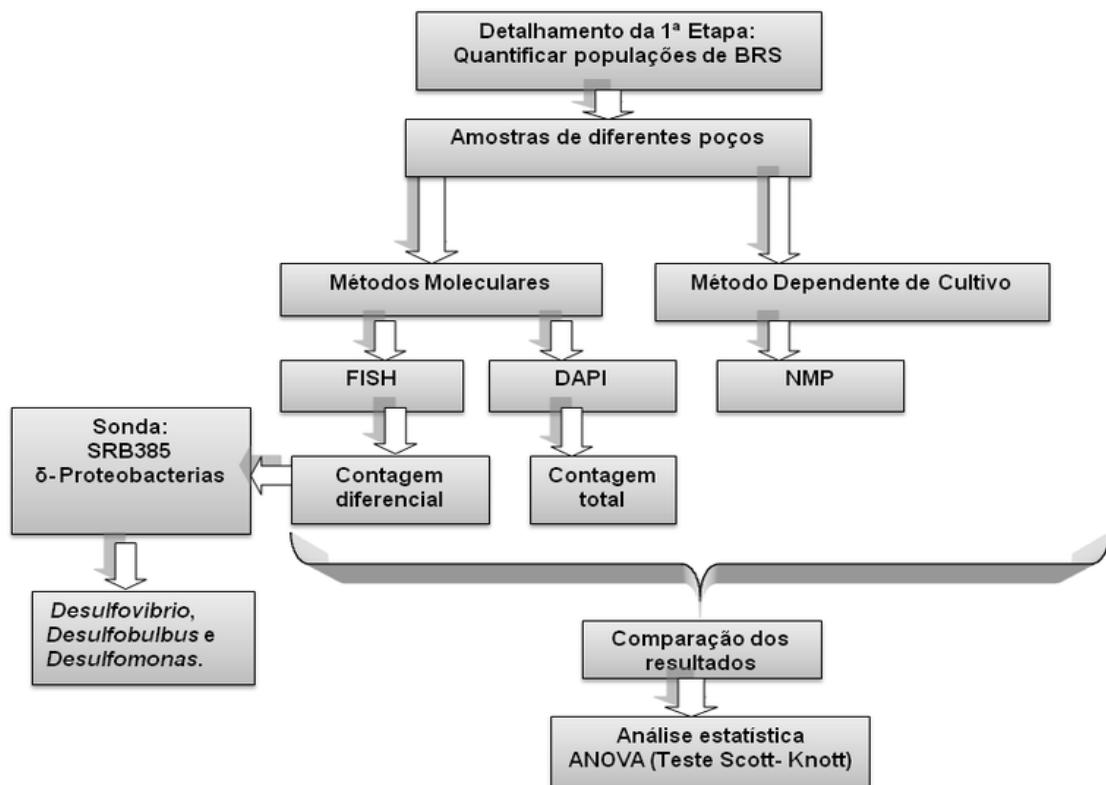
Fonte: Autoria própria, 2016.

4.1 Delineamento experimental

Este trabalho foi dividido em duas etapas, sendo que a primeira etapa compreendeu a quantificação das BRS através da Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em paralelo com a quantificação total da população através do fluorocromo DAPI. Os resultados obtidos dos métodos DAPI e FISH foram comparados com a contagem do método dependente de cultivo NMP.

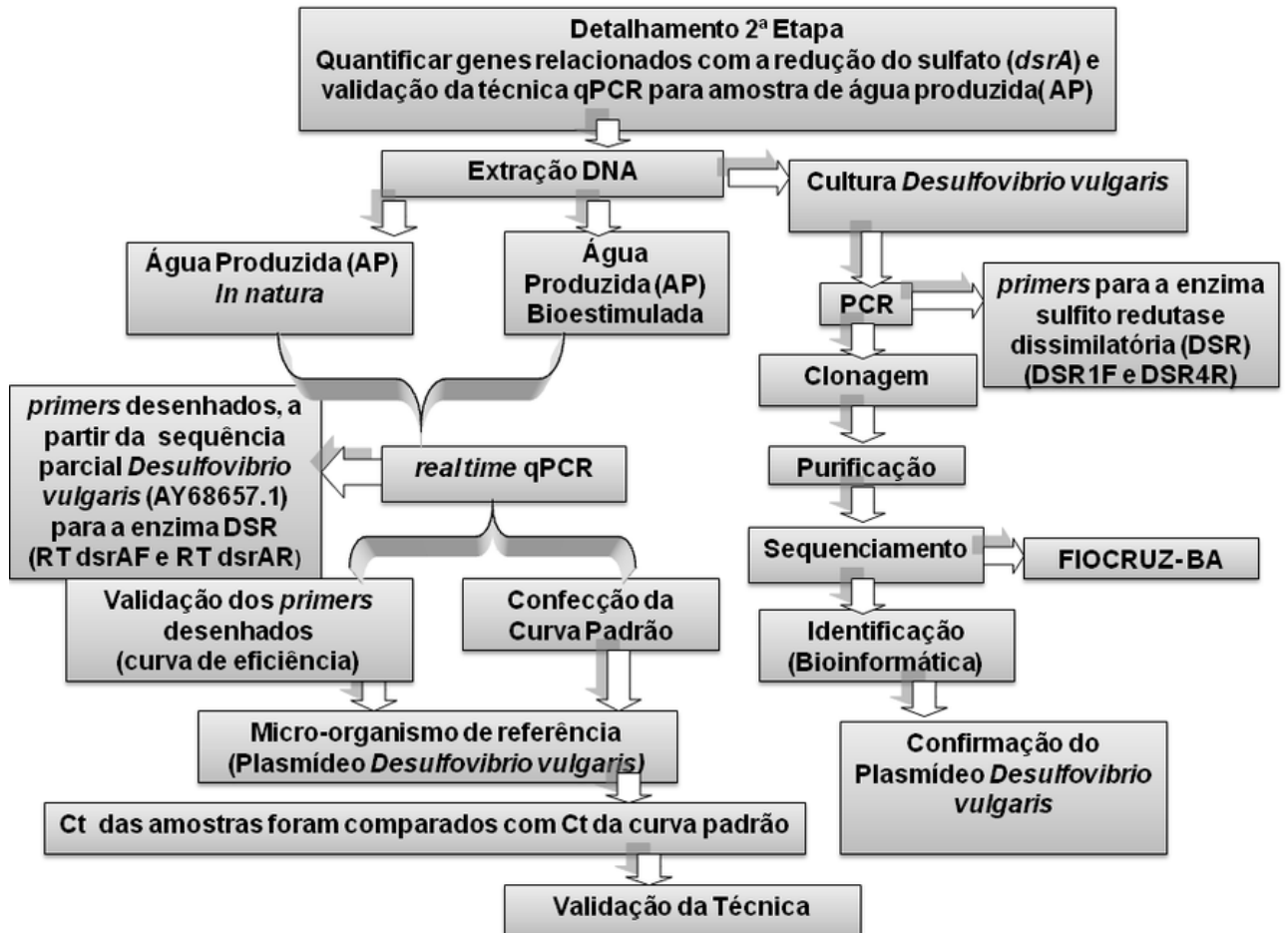
Já a segunda etapa do experimento correspondeu à quantificação do número de cópias dos genes *dsrA*, relacionados com a redução do sulfato, utilizando a real time qPCR que foi validada para amostras de AP, conforme descrito nos fluxogramas (Figura 4 e Figura 5) que sintetizam todas as etapas dos procedimentos experimentais.

Figura 4– Fluxograma representativo da primeira etapa realizada no experimento (Quantificação da população das BRS (FISH) e população global (DAPI) em comparação com o método dependente de cultivo (NMP)).



Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura 5- Fluxograma representativo da segunda etapa realizada no experimento (Quantificação do número de cópias dos genes *dsrA*, a partir da sequência parcial do genoma do *Desulfovibrio vulgaris*, através da real time qPCR, para a validação da técnica em amostras de AP).



Fonte: Autoria própria, 2016.

4.2 Quantificação da população de BRS a partir da hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

4.3 Protocolo FISH

O protocolo utilizado para esta etapa do experimento, que visava à utilização da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) combinado com o DAPI para a quantificação de BRS em amostras de AP, foi descrito por Amann (1990).

4.3.1 Preparação e fixação da amostra

Foram centrifugados 150 ml de AP para cada poço selecionado com problemas de CMI, em duplicata, em velocidade de 10000 rpm por 10 minutos, com o intuito de se formar pellets. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram submetidos à lavagem com PBS 1X (Tampão Fosfato Salino- 8 g/L de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄ e 0,24g/L g de KH₂PO₄) por duas vezes com a finalidade de reduzir artefatos que também poderiam emitir fluorescência induzindo a leitura errônea ao microscópio (backgroud).

Após a lavagem com PBS 1X as amostras foram submetidas à centrifugação por 1 minuto a 10000 rpm. Em seguida, os pellets formados foram ressuspensos em 200 µL de PBS (1X) e 600µL de tampão de fixação com paraformaldeído a 4% em PBS 1X (1mL de PFA 30% diluído em 9 mL de PBS1X + 1mM de Mg₂Cl, pH7,2) e mantidos a 4°C de 12 a 16 horas. Após o período de fixação, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS 1X seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos para a centrifugação anterior (1 minuto a 10000 rpm) para retirar o PFA. Posteriormente, os pellets foram ressuspensos em PBS 1X / etanol (1:1, v/v) e armazenados a -20°C até a sua utilização.

4.3.2 Preparação das Lâminas

Lâminas para imunofluorescência com 12 poços, 6mm de diâmetro cada da marca Perfecta, foram previamente preparadas e tratadas em solução de gelatina a 0,1%, como descrito por Zarda e colaboradores (1997), para aumentar a hidrofobicidade.

4.3.2.1 Hibridização

A metodologia foi descrita por Perntholer (2002) e adaptada por Sampaio (2014), em que alíquotas de 10µL das amostras foram colocadas sobre os poços das lâminas de vidro, em duplicata, e levadas para secar em estufa a

50 °C por 15 minutos, com o intuito de favorecer a fixação das células nas lâminas. Após este período, as amostras foram desidratadas em séries gradativas de etanol 50%, 80% e 100% por 3 minutos, para cada etapa, seguidos da secagem a temperatura ambiente.

Durante o período da secagem das lâminas, foi preparado um ambiente climatizado constituído de uma caixa plástica pequena com papel filtro embebido com 2mL do tampão de hibridização acrescido da sonda de ácido nucleico utilizada (**SRB385- 5-CGGCGTC GCTGCGTCAGG-3**) com concentração de formamida específica para a mesma (25ng/μL).

O tampão de hibridização foi composto por: 360 μL de NaCl 5M, 40 μL de TRIS 1M, 40 μL de EDTA 0,5M, 600 μL de formamida, 2 μL de SDS 10% e 958 μL de água mili-Q autoclavada. Ao final da desidratação foi adicionado a cada poço 9μL do tampão de hibridização e cerca de 1μL da sonda SRB-385. Em seguida as lâminas foram incubadas em estufa bacteriológica Tecnal modelo TE-392/2 a 50°C / 2 h.

4.3.2.2 Lavagem

As lâminas com as amostras já hibridizadas foram então lavadas delicadamente com o tampão de lavagem (mesma composição do tampão de hibridização, sem formamida para retirar o excesso da sonda (**SRB-385**)). A partir deste ponto, as mesmas foram mergulhadas em um tubo de centrífuga com 50 mL contendo o mesmo tampão de lavagem e incubadas (estufa bacteriológica Tecnal modelo TE-392/2) a uma temperatura de 48°C por 20 minutos, com o mínimo de luz possível. Para o procedimento seguinte o tampão foi descartado e as lâminas enxaguadas com água milli-Q para retirar os sais e o SDS (detergente).

4.3.2.3 Coloração com DAPI

As lâminas foram coradas com 10uL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) na concentração de 200ng/ μL durante 20 minutos, na ausência de

luz. Após este período foram lavadas com água milli-Q e secas em temperatura ambiente.

4.3.2.4 Montagem e Visualização

Depois de secas, cada poço da lâmina recebeu 4 µL de solução anti-fading e foram cobertas com uma Hybridization Coverslipe, para preservar a fluorescência emitida pelo fluorocromo (DAPI) e depois foram cobertas com lamínulas.

As lâminas foram então analisadas utilizando filtros específicos para a sonda citada, marcadas com o fluorocromo ALEXA555, 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.

4.3.2.5 Contagem dos micro-organismos

Para a contagem dos micro-organismos foram analisados 20 campos, aleatórios em zig-zag e tirado a média aritmética das duplicatas para calcular o número de bactérias existentes nas amostras.

$$\text{Cálculo: Bactérias (células/mL)} = (g \times A \times D) / (a \times V)$$

g = média do nº de células por campos em 20 campos **A**= área de espalhamento da amostra (lâmina em mm²) **D** = Fator de diluição (=1)

a = área do campo da objetiva (0,2 mm²)

V = volume da amostra (10 µL=0,01 mL)

Vale salientar, que o cálculo empregado foi adaptado do protocolo para análises de solo (ALEF; NANUPIERI, 1995), e o mesmo vem sendo utilizado por outros pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos (LABEM).

4.4 Número Mais Provável (NMP)

O método NMP foi realizado em paralelo aos métodos DAPI e FISH, cuja metodologia empregada seguiu como descrito por Montes, Chinalia e Almeida (2015), realizada em diluições seriadas (10^1 a 10^{10}), em triplicata no meio Postgate modificado, em que a composição para um litro foi constituída dos seguintes reagentes: KH_2PO_4 , 0,5 g; NH_4Cl , 1,0 g; $CaCl_2$, 1,0 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1,83 g; lactato de sódio, 1,75 mL; extrato de levedura, 1,0 g; Na_2SO_4 , 1,0 g; ácido ascórbico, 0,1 g; tioglicolato de sódio, 0,013 g; citrato de sódio, 6,38 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5g; NaCl 1,5%, resazurina, 2,0 mL de 0,025% w/v. Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o pH ajustado entre 7,5-8,0 usando HCl 5 M ou NaOH 1M. O meio de cultura Postgate foi esterilizado a 121°C durante 15 min. e distribuído em frasco (9mL), que foram submetidos à purgação com nitrogênio.

Em seguida, 1 mL da amostra foi inoculado em um frasco contendo o meio Postgate, para a realização das diluições seriadas. As amostras foram incubadas a 37°C observando-se a precipitação do sulfato em um período de 20 dias. Os resultados obtidos com a realização do NMP foram confrontados com os resultados do DAPI e FISH através da análise estatística.

4.5 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas a ferramenta ANOVA, por meio do teste Scott- Knott foi utilizada tendo como base a comparação múltipla das médias, a fim avaliar se as médias encontradas para todos os métodos em questão (DAPI, FISH e NMP) iriam divergir significativamente ($p > 0,005$) diante dos diferentes poços de petróleo prospectados. Para a avaliação da análise estatística foi utilizado o software SISVAR 5.6.

4.6 Quantificação dos genes *dsrA* e validação da técnica *real time* qPCR para amostras de água produzida

4.6.1 Extração do DNA genômico de *Desulfovibrio vulgaris* e amostras de água produzida (AP).

Para a quantificação dos genes dsrA que estão relacionados com a redução do sulfato em amostras de AP e para a cultura de Desulfovibrio vulgaris foi realizada a extração do DNA utilizando o Power Water ® DNA isolation kit (MoBio), onde foram seguidas as recomendações do fabricante.

4.6.2 Análises de bandas de DNA por eletroforese em gel de agarose

Após a extração cerca de 3µL do DNA genômico foram analisados em géis de agarose a 1,0%, utilizando TAE 1x como tampão de corrida. Os géis foram corados com Syber safe (5µg/mL) e as amostras com Bluejuice (2 µg/mL), a uma carga elétrica de 100 V por 30 min. e visualizados com auxílio de um transluminador (Vilber Lourmat), sob luz UV, com o intuito de verificar a presença de bandas do DNA e conseqüentemente a eficiência da extração.

4.6.3 Quantificação e pureza do DNA extraído

O grau de pureza e a quantificação do DNA extraído foram determinados utilizando o equipamento Nanodrop Multiscan Spectrophotometer Specificationsque (Thermo Scientific) que avalia a concentração de DNA pela medida da absorbância a 260nm, na qual uma unidade de absorbância corresponde a 50µg de DNA/mL da solução. A pureza da preparação foi determinada através da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280nm e 260/230nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; BUSTIN et al., 2009). Cerca de 2µL da solução proveniente do DNA extraído foram utilizados para a leitura, sempre com uma avaliação em duplicata do branco (água milli-Q autoclavada) e da amostra.

4.6.4 Primers de genes específicos

4.6.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os primers **DSR1F** e **DSR4R**, cujo produto amplificado possui 1900 pb foram desenhados para o gene que codifica a enzima DSR, descritos na literatura e adquiridos comercialmente (CHIN et al., 2008; UNDERWOOD; et al., 2015).

Já os primers específicos (**RTdsrA F** e **RTdsrAR**) foram desenhados para os genes que codificam a enzima DSR, a partir da sequência parcial do *Desulfovibrio vulgaris* para o gene *dsrA* (AY68657.1) depositada no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015). Em seguida, a sequência foi alinhada no formato FASTA (FASTA, 2015), e copiada no programa da Integred DNA Technology (IDT, 2015), para o qual foram feitas observações referentes à concentração de Guanina e Citosina (%G e C), Temperatura de Melting (TM) e formação de harping, descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de G e C (%), TM e Harping descritos para o desenho dos primers (RTdsrA F e RTdsrAR)

Primers	% C e G	TM	Harping	Sequências originadas do programa IDT
Forward (RTdsrAF)	55%	62,2°C	0	5'-CCTGCTACGAACTGACCATG-3'
Reverse (RTdsrAR)	50%	62,7°C	0	5'-AGGCGTCGAACTTGAAGTTG-3'

Fonte: Autoria própria, 2016.

Os tamanhos das sequências deveriam estar entre 70 e 150 pares de bases (pb), e também foi levada em consideração a presença das bases nitrogenadas G ou C em uma das extremidades da sequência escolhida (BUSTIN et al., 2009). Por fim, os primers já desenhados foram submetidos ao programa Primer-BLAST (PRIMER- BLAST, 2015), utilizado com o intuito de avaliar a complementaridade entre todas as sequências depositadas no banco de dados.

A sequência escolhida para confecção dos primers apresentou complementaridade não apenas para as sequências parciais de algumas espécies e subespécies de *Desulfovibrio vulgaris*; como também para as sequências parciais das espécies: *Burkholderia* sp. RPE67 plasmid p3 DNA, *Fusobacterium* sp. SRBBR 3 sulfito redutase dissimilatória subunidade alfa

(*dsrA*), *Candidatus Desulforudis audaxviator* MP104C, para o *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* sulfito redutase dissimilatória subunidade alpha (*dsrA*) e sulfito redutase dissimilatória subunidade beta (*dsrB*), além de 15 sequências parciais de micro-organismos que não foram ainda cultivados.

Este fato confere uma maior especificidade às sequências dos primers escolhidos, uma vez que os mesmos conseguem amplificar com outros micro-organismos pertencentes ao grupo das BRS em não apenas com a espécie *Desulfovibrio vulgaris*. Por essa razão os primers **RTdsrAF** e **RTdsrAR** foram enviados para síntese comercial na Integred DNA Technology (IDT).

4.6.4.2 Determinação da temperatura de anelamento dos primers

Para a determinação da Temperatura de Anelamento (TA) dos primers **DSR1F** e **DSR4R** se fez necessário alguns ajustes a partir de testes com gradiente de temperatura, uma vez que as temperaturas de anelamento descritas como base nos artigos escolhidos variavam (WAGNER et al., 1998; BEN-DOV; BRENNER; KUSHMARO, 2007; CHIN et al., 2008; SAHL et al., 2010; UNDERWOOD; et al., 2015).

Já a temperatura de anelamento dos primers que foram desenhados, **RTdsrAF** (5'-CCTGCTACGAACTGACCATG-3') e **RTdsrAR** (5'-AGGCGTCGAACTTGAAGTTG-3'), foi determinada com base nos dados fornecidos pela empresa que realizou a síntese dos mesmos, na pagina Real Time qPCR Assay Entry (IDT, 2015). Os dados obtidos, após a confecção dos primers, determinaram a temperatura de Melting (TM) como sendo de 55,5°C entre o par de primers. Deste modo, a Temperatura de Anelamento (TA) (52°C) foi calculada com 3°C abaixo da TM. Entretanto, assim como ocorreu com os primers já descritos **DSR1F** e **DSR4R**, foram necessários ajustes através de um gradiente de temperatura, para obter a TA ideal no momento da análise da real time qPCR.

4.7 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Em um tubo tipo eppendorf, com capacidade para 200 μL , foi realizado o Mix para a reação de PCR com um volume final de 25 μL , utilizando o kit PCR Master Mix 2x (Promega) e os primers **DSR1F** e **DSR4R**. A reação foi incubada em um termociclador modelo Veriti 384-well Thermal Cycler (Applied Biosystems), a 95°C durante 3 minutos, para desnaturação inicial do DNA e ativação da Taq DNA polimerase (PRC Master Mix 2x - Promega) (Tabela-1).

Após a desnaturação inicial, a reação foi submetida a 35 ciclos compostos por mais uma etapa de desnaturação a 95°C por 45 segundos, seguidos da etapa de anelamento a 59 °C e uma etapa de extensão a 72°C durante 1 minuto. Ao finalizar os ciclos, a reação foi mantida a 72°C, durante 20 minutos, e então resfriada a 4°C.

Tabela 2- Reagentes utilizados para a reação de PCR, com um volume final igual a 25 μL .

Reagentes	Volume (25 μL)	Concentração Final	Primers
H2O milli-Q esterilizada	7,9 μL	N/A	
PCR Master Mix	12,5 μL	1x	
10 μM primer Forward	0,8 μL	0,02 μM	DSR1F (5'-ACSCACTGGAAGCACG-3')
10 μM primer Reverse	0,8 μL	0,02 μM	DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3')
Tamplate (DNA)	3 μL	N/A	

Fonte: Autoria própria, 2016.

Vale ressaltar que durante a reação de PCR foi feito em paralelo um controle negativo, que consistiu na adição de todos os reagentes, exceto DNA, para descartar qualquer tipo de contaminação externa. Em seguida, 3 μL do produto da reação e 3 μL do controle negativo foram analisados em gel de agarose a 2%, utilizando TAE 1x como tampão de corrida. Ao amplicon (produto da PCR) foi adicionado Bluejuice (Ivitrogen) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o gel de agarose foi corado com Syber Safe DNA gel Stain (Ivitrogen) (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após a corrida o amplicon foi visualizado com auxílio de um transluminador (Vilber Lourmat), através da luz ultravioleta (UV). Em paralelo, o tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com um padrão de massa molecular de 1Kb (1Kb DNA Ladder- Ivitrogen).

4.8 Clonagem

A clonagem foi realizada a partir dos produtos de PCR purificados, utilizando o TOPO® TA cloning Kit for sequencing (Invitrogen – Life Technology) obedecendo às recomendações do fabricante.

4.8.1 Confirmações das células transformadas

Para confirmar a transformação das células em plasmídeos foi utilizada a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen – Life Technology) seguindo as orientações do fabricante. A EcoRI é a enzima de restrição que corta uma fita de DNA dupla hélice em dois pontos diferentes e complementares (entre as bases G e A). Por outro lado, quando separadas as fitas simples possuem pontes coesivas que permitem uma perfeita recombinação com o DNA exógeno (NASCIMENTO et al., 2003).

4.8.2 Purificação e quantificação dos plasmídeos

As colônias originadas da clonagem, (item 4.8), que produziram o inserto foram submetidas à purificação através do kit comercial Pure Link Quick Plasmid Miniprep kit (Ivitogen), em que novamente foram seguidas as recomendações do fabricante. Em seguida foi confeccionado um gel de agarose a 2%, conforme descrito no item 4.6.2, para confirmar a presença de bandas do DNA plasmidial. Em uma etapa posterior ocorreu à quantificação das amostras utilizando o equipamento Nanodrop Multiscan Spectrophotometer Specifications (Thermo Scientific).

4.9 Sequenciamento e identificação

Para a realização do sequenciamento, os plasmídeos foram purificados, mais uma vez, utilizando a enzima ilustra ExoPro Star 1-Step (GE) e enviados para a plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) na Bahia.

Os fragmentos obtidos após o sequenciamento deram origem a seis sequências que foram analisadas a partir do programa gratuito da Embrapa (*Electropherogram quality analysis*), para o qual as sequências foram alinhadas (BRASIL, 2015).

As sequências resultantes após o alinhamento foram comparadas no NCBI do BLAST (BLAST, 2015), ao qual foi possível avaliar o nível de similaridade entre os vários fragmentos de bases das bactérias já descritas.

4.10 Eficiência dos primers RTdsrAF e RTdsrAR

Foram realizadas inicialmente duas reações da real time qPCR, com os primers na concentração de $10\mu\text{M}/\mu\text{L}$ e $1\mu\text{M}/\mu\text{L}$ onde o DNA plasmídial do *Desulfovibrio vulgaris*, originado da clonagem (Item-5. 6) foi submetido a uma diluição seriada em cinco pontos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). As análises foram realizadas em triplicata contendo controles negativos (mix da reação sem o DNA). Para cada reação da real time qPCR foram utilizados os seguintes volumes de reagentes: $0,4\mu\text{L}$ de cada um dos primers (**RTdsrAF** e **RTdsrAR** - na concentração de $10\mu\text{M}/\mu\text{L}$ e $1\mu\text{M}/\mu\text{L}$), $10\mu\text{L}$ de SYBR® Green Master Mix, $7,2\mu\text{L}$ de água milli-Q esterilizada e $2\mu\text{L}$ de DNA diluído (em água milli-Q esterilizada), totalizando um volume de $20\mu\text{L}$ de reação em cada poço. As reações mencionadas foram executadas em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate - Applied Biosystems), que foram seladas com adesivo óptico MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems).

Logo após as reações da real time qPCR foram incubadas no aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems) a uma temperatura de 50°C durante 2 minutos, com posterior elevação da temperatura para 95°C por 15 segundos a fim de ativar a enzima Taq DNA Polimerase. Posteriormente, 40 ciclos com as temperaturas de 95°C por 15 minutos e 60°C por 1 minuto, foram realizados. Ao finalizar os ciclos, as reações foram submetidas à curva de dissociação ou curva de Melting, onde a temperatura inicial foi de 95°C por 15 seg., seguido de um resfriamento a 60°C por 1 min., finalizando com um novo aquecimento de 95°C por 15 seg.

4.11 Bioestimulação da água produzida

Conforme exposto por Scow e Hicks (2005), a bioestimulação consiste na adição de receptores e doadores de elétrons, como fontes de nutrientes, que estimulam naturalmente as populações microbianas e que também pode ser empregados para promover a degradação de possíveis inibidores, como os hidrocarbonetos, presentes em amostras oriundas do petróleo.

Sendo assim, para a amostra coletada no mês de Março de 2016, além de realizar a extração da água produzida *in natura* (3L), optou-se pela execução do processo de bioestimulação. Para tanto foram reservados 300 mL da amostra coletada (AP *in natura*), em que inicialmente foi realizada a avaliação dos parâmetros físico- químicos, onde foram verificados os valores de PH (Potencial de Hidrogênio) e Eh (Potencial redox).

Uma solução bioestimuladora com volume total de 100 mL foi preparada e para tanto foram selecionados: uma fonte de sulfato, uma fontes de carbono, um fator de crescimento e uma fonte de nitrogênio (Tabela-3).

Tabela 3 – Composição da solução utilizada na AP para a bioestimulação

Solução Bioestimuladora	Reagentes	Volume final (100 mL)
Fonte de sulfato	Sulfato de ferro	0,05g
Fonte de carbono	Lactato de sódio Citrato de sódio	0,175 mL 0,638g
Fator de crescimento	Extrato de Levedura	0,1g
Fonte de Nitrogênio	Cloreto de amônio	0,1g

Fonte: Autoria própria, 2016.

Além disso, também foi preparada uma solução redutora contendo tioglicolato (0,013 g) e ácido ascórbico (0,1g) (para um volume final de 100 mL) a fim de corrigir variações do Eh, caso fosse necessário após as amostras serem bioestimuladas. A solução bioestimuladora foi distribuída em três frascos de 50 mL, entre os quais foram adicionados os volumes de 40 mL, 30 mL e 20 mL da mesma substância. Em seguida foi realizada a purgação com nitrogênio para a retirada do oxigênio e os frascos foram hermeticamente fechados e submetidos à autoclavação a 121°C durante 15

minutos. Após a autoclavação foram adicionados, aos referidos frascos, os seguintes volumes da AP (10 mL, 20 mL e 30 mL) com auxílio de uma seringa de 50 mL, em que os volumes finais resultariam nas respectivas concentrações (20%, 40% e 60%).

As amostras foram incubadas na estufa bacteriológica Tecnal modelo TE-392/2 a 38°C e após as primeiras 24 horas, foi retirada uma alíquota de 1mL com o auxílio de uma seringa para a avaliação do pH e do Eh no Phmetro portátil Orion 3 star da Thermo.

Para induzir a redução do oxigênio, em função do Eh inicialmente encontrado na amostra da AP in natura (-24 mV), foi adicionado 1mL da solução redutora. Após 48 horas foram feitas novas avaliações do pH e Eh e adicionado mais 0,5 mL da solução redutora. Porém, no decorrer das 72 horas, apenas as verificações do pH e Eh foram realizadas, bem como para as 96 horas seguintes. Contudo, somente após as 120 horas foram observadas as condições de pH e de Eh que possivelmente promoveria o crescimento das BRS (pH entre 5 e 9 e Eh entre - 100 mv e -500 mv), para a amostra em que a concentração de AP foi de 40%, demonstrados na tabela 4.

Tabela 4– Acompanhamento dos parâmetros físico-químicos (pH e Eh), das amostras bioestimuladas, em diferentes concentrações (20%, 40% e 60%) de água produzida (AP).

Tempo	Concentrações AP	Eh	pH	Solução Redutora
0	Inicial	- 24 mV	6,9	NA
24horas	20%	+26,0mV	7,04	1mL
	40%	-48,8mV	6,66	1mL
	60%	+13,5mV	6,60	1mL
48 horas	20%	-34,0mV	6,84	0,5mL
	40%	-83,7mV	6,85	0,5mL
	60%	-53,5mV	6,7	0,5mL
72 horas	20%	-65,3mv	6,83	NA
	40%	-97,6mv	7,0	NA
	60%	-85,0mV	6,9	NA
96 horas	20%	-82,6mV	6,81	NA
	40%	-104,7mV	7,0	NA
	60%	-93,4mV	6,75	NA
120 horas	20%	-83,5mV	6,79	NA
	40%	-116,9mV	7,3	NA
	60%	-98,5 mV	6,84	NA

Fonte: Autoria própria, 2016.

*NA - Não se aplica.

Logo após as extrações do DNA foram realizadas, como descrito no item 4.6.1, tanto para as amostras bioestimuladas, em que 45 mL das amostras foram utilizados (mesmo as que não apresentaram condições de *Eh* favoráveis para o desenvolvimento das BRS), quanto para a amostra da AP *in natura* (3L). Após a extração, foi realizado um gel de agarose a 1% (descrição do item 4.6.2) para a detecção de bandas de DNA. Entretanto, vale salientar que a amostra de AP *in natura* não apresentou banda de DNA após a observação no gel de agarose realizado.

Em um segundo momento, apenas o DNA extraído das amostras bioestimuladas foram quantificadas no equipamento NanoDrop Multiscan Spectrophotometer Specifications (Thermo Scientific), conforme a descrito no item 4.6.3.

4.12 Confeção da curva padrão para a *real time* qPCR

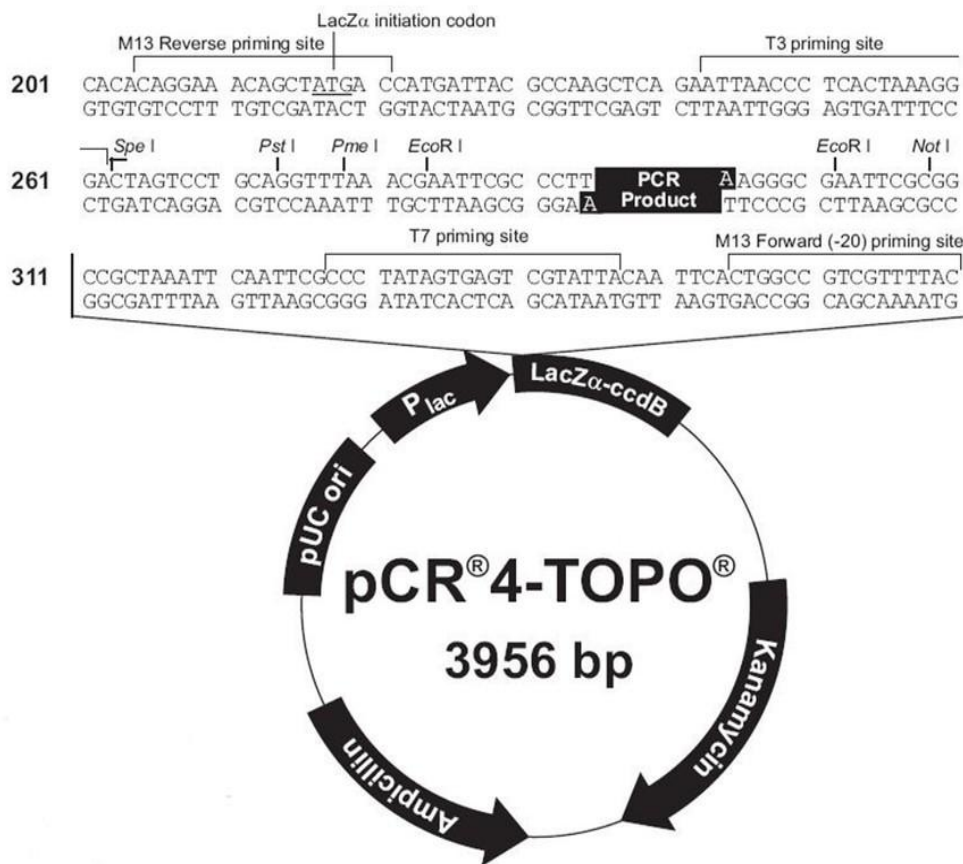
Conforme exposto por Stropa (2009), o método *real time* qPCR permite, através da quantificação absoluta, determinar a quantidade de uma sequência alvo de ácidos nucleicos em uma amostra desconhecida. Deste modo, os valores fornecidos pela *real time* qPCR para as amostras desconhecidas são comparadas com os valores da curva padrão, o que irá precisar a quantidade do número de cópias estabelecido nas amostras em função da curva.

A utilização de plasmídeos para preparação de um padrão absoluto é recomendado por um consórcio formado pelo RDML (Real-Time PCR Data Markup Language) e o MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (BUSTIN et al. 2009; RUIJTER et al., 2015), a fim de que haja uma padronização e normalização das informações empregadas nos experimentos que envolvem a *real time* qPCR e a RT qPCR (transcriptase reversa em tempo real por PCR quantitativo) (BUSTIN et al., 2009; TAYLOR et al. 2010).

Diante disto, o trabalho proposto promoveu a quantificação do vetor pCR™ 4-TOPO® TA que possui 3956 pb, sequências que circundam o sítio de clonagem (201, 261e 311), uma origem de replicação (PUCori), da região

lacZ α -*ccdB* (que permite a seleção de recombinantes) e os genes de resistência para os antibióticos kanamicina e ampicilina (úteis para selecionar os clones desejados). Vale salientar, que o vetor selecionado (pCR™ 4-TOPO® TA) foi concebido para posterior digestão com a enzima *EcoRI*.

Figura 6 -Mapa do Vetor (pCR™ 4-TOPO® TA), utilizado para a clonagem do *Desulfovibrio vulgari*.



Fonte: ThermoFisher Scientific®,
2016.

Após a quantificação do vetor pCR™ 4-TOPO® TA foram realizadas diluições seriadas para a concentração de 10X, em oito pontos (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} e 10^{-8}), conforme proposto por Taylor e colaboradores (2010), onde foram obtidos os valores de todas as concentrações e os títulos com os fatores de diluição promovendo ao final uma correlação entre estes valores e um valor de Ct (Cycle Threshhold) do início da amplificação na fase exponencial. O plasmídeo escolhido para a

análise da curva padrão foi o que apresentou a maior concentração após a quantificação (48,75 ng/μL).

4.12.1 Estabelecimento da curva padrão para a quantificação absoluta

A curva padrão gerada para a amplificação do gene dsrA, a partir do DNA plasmidial do Desulfovibrio vulgaris partiu da quantificação inicial do mesmo através do Nanodrop Multiscan Spectrophotometer Specifications. Com base na quantificação inicial do clone escolhido (DSV3- 48,75 ng/μL) foram estabelecidos os valores dos títulos de cada diluição e as respectivas concentrações em ng/μL (APÊNDICE-1, Tabela 11). Estes valores foram posteriormente inseridos na planilha “Sequence Detection Software” (SDS) do ABI 7500 (Applied Biosystems) com o intuito de se obter a curva padrão.

Os dados gerados pela curva padrão promoveram uma reta padrão através da regressão linear, constituída pelos valores de Ct (Cycle threshold) no eixo das ordenadas e o logaritmo da concentração de DNA no eixo das abscissas, tendo como referência a fórmula da regressão linear de uma reta padrão ($y = ax + b$) utilizada como base para os cálculos posteriores na determinação das amostras desconhecidas.

4.12.2 Determinação do número de moléculas plasmidial

É importante salientar a necessidade de se conhecer o número de moléculas do DNA plasmidial por microlitro de amostra, uma vez que cada plasmídeo contém um inserto, o que representa uma única cópia do gene inserido que codifica a enzima DSR. Deste modo, o número de moléculas plasmidial para pCR™ 4-TOPO® TA, utilizado para a confecção da curva padrão, também foi determinado (Tabela 5), com base na fórmula abaixo, adaptada de Staoscik (2004). Número de cópias = $(X \text{ g/ } \mu\text{L} \times 6,022 \times 10^{23}) / (\text{tamanho do plasmídeo} \times 10^9 \times 650\text{u})$, em que:

X = a concentração do DNA

$6,022 \times 10^{23}$ = número de moléculas existentes em um molde por grama (moléculas/g).

Tamanho do plasmídeo (pCR™ 4-TOPO® TA= 3596 pb + 1900 pb do gene 16S rRNA= 5856 pb).

109 = conversão de g em ng.

650 u = valor do pb em daltons.

Tabela 5- Determinação do número de moléculas existentes no plasmídeo pCR™ 4-TOPO® TA, para a confecção da curva padrão em real time qPCR.

Pontos da curva	Nº de moléculas ou cópias PCR™ 4-TOPO® TA	Fator de diluição calculado
Amostra referência	$8,26 \times 10^9$	0,1
P1	$8,26 \times 10^8$	0,01
P2	$8,26 \times 10^7$	0,001
P3	$8,26 \times 10^6$	0,0001
P4	$8,26 \times 10^5$	0,00001
P5	$8,26 \times 10^4$	0,000001
P6	$8,26 \times 10^3$	0,0000001
P7	$8,26 \times 10^2$	0,00000001
P8	$8,26 \times 10^1$	0,000000001

Fonte: Autoria própria, 2016.

4.13 real time qPCR

Para a quantificação da cópia dos genes *dsrA* presentes nas amostra de AP que foram bioestimuladas, oriundas dos poços de petróleo avaliados, foi necessária a realização da técnica real time qPCR. Para tanto, foram pipetados 0,4µL dos primers (na concentração de 10µM/µL), 10µL de SYBR® Green Master Mix, 7,2 2µL água milli-Q autoclavada e 2µL do DNA extraído foram diluídos em água milli-Q autoclavada (10^{-1}), totalizando um volume de reação para cada poço de 20 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para o gene avaliado, com o controle negativo (mix da reação sem DNA) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate Applied

Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film Applied Biosystems).

*Para esta etapa, foram utilizados os primers desenhados: (RTdsrAF e RTdsrAR) para enzima sulfito redutase dissimilatória (DSR) a partir do genoma parcial do *Desulfovibrio vulgaris*, com produto esperado de 84 pb. Para tanto, as condições dos ciclos que envolveram as etapas de desnaturação, anelamento e extensão, bem como a curva de dissociação seguiram como descrito no item 4.10.*

4.13.1 Análise dos dados

*Os resultados das amplificações das amostras desconhecidas (valores de Ct) pela real time qPCR foram avaliados através do software 7500 v2.3 (APPLIED BI- OSYSTEMS, 2015), em que os pontos dos Cts gerados pela curva padrão e para as amostras desconhecidas foram calculados através da equação de regressão linear da reta ($y=ax+b$), em que **y** corresponde ao Ct, **a** representa a inclinação da curva e **b** está associado ao ponto de intercessão dos eixos da curva. Os valores das amostras desconhecidas foram calculados em conformidade com as recomendações da Applied Biosystems (2013) e de Livack e Schmittge (2001).*

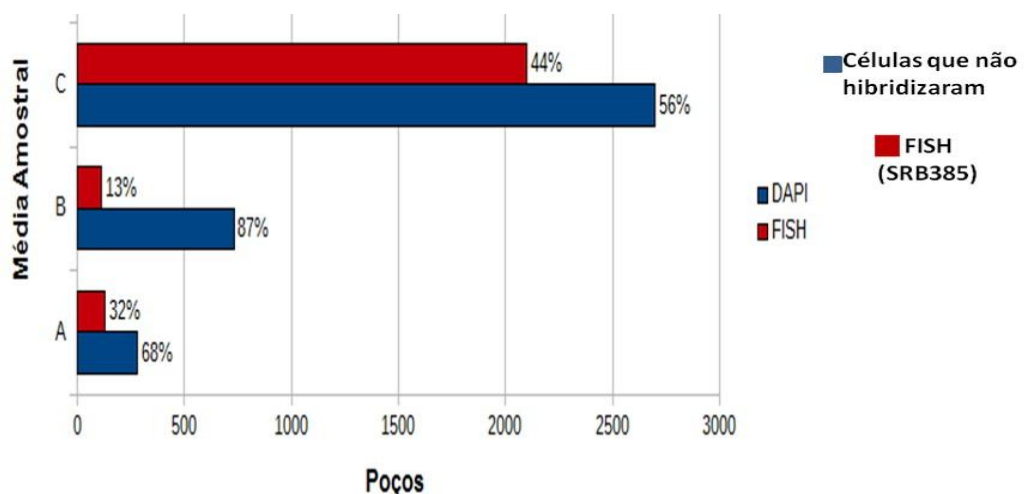
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação das BRS através dos métodos FISH, DAPI e NMP.

5.1.1 Quantificação das populações de BRS através dos métodos FISH e DAPI.

Os resultados obtidos para o trabalho em questão foram avaliados com base nas médias calculadas a partir da quantificação total com o DAPI, correspondente aos poços: A=280 cel/mL, B=730 cel/mL, C=270 cel/mL e D=241 cel/mL; e da contagem diferencial através do método de FISH, em que os micro-organismos hibridizaram somente com a sonda **SRB-385** (Figura- 7).

Figura 7- Porcentagens das células que não hibridizaram com a sonda na contagem total com o DAPI e das células que hibridizaram através da técnica de FISH, para as amostras de água produzida, dos poços A, B, C e D.



Fonte: Autoria própria, 2016.

A sonda **SBR385 (5-CGGCGTCGCTGCGTCAGG-3)** foi empregada para a hibridização na técnica de FISH porque de acordo com Llobet-Brossa, Rossello-Mora e Amann (1998), a mesma permite a identificação da maioria

das BRS conhecidas para a subdivisão δ - Proteobacterias. Através dos resultados verificou-se a presença de baixas populações de BRS nos diferentes poços pesquisados (A, B C e D), cujas avaliações ocorreram em períodos e pontos distintos, conforme exposto no quadro 1.

Quadro 1- Descrição dos poços, pontos e períodos em que ocorreram as coletas para as amostras de AP.

Poços	Pontos de coleta	Período
Poço A	Estação de Tratamento (ES)	Outubro, 2014
Poço B	Cabeça de poço (CP)	Junho, 2015
Poço C	Cabeça de poço (CP)	Março, 2015
Poço D	Tanque de separação (TS)	Março, 2016

Fonte: Autoria própria, 2016.

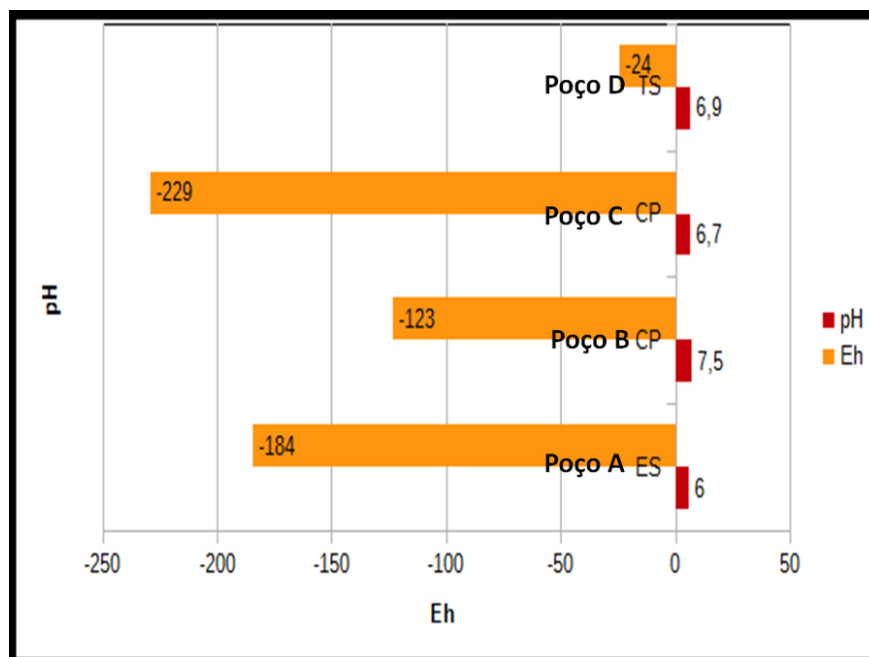
Deste modo, as amostras avaliadas, para os poços B e D, originadas dos pontos CP e TS, apresentaram 13% e 26%, respectivamente, dos microorganismos pertencentes à subdivisão das δ – Proteobacterias. Entretanto, é importante salientar que apesar da sonda **SBR385** possuir uma expressiva especificidade para todos os membros conhecidos dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* e *Desulfomonas*, uma vez que apresenta a sequência alvo completa para os mesmos, esta pode reduzir fortemente a intensidade de marcação quando os membros avaliados pertencerem aos gêneros *Desulfobacter* e *Desulfomicrobium*.

Para os demais membros conhecidos dos gêneros *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacula*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, e *Desulfomonile*, a redução na intensidade de marcação da fluorescência também é evidenciada isso em função de um único afastamento dentro da sequência alvo que comumente acontece devido à presença de uma adenina (A) ao invés de uma guanina (G) na posição **395** da sequência do gene 16S rRNA (RAMSING; KUHL; JORGENSEN, 1993; HALIM; WATKIN; GUBNER, 2012).

As avaliações das porcentagens populacionais foram então comparadas aos parâmetros físico-químicos (pH e Eh), que demonstraram para as amostras dos poços A (pH6, 0 e Eh -184) e C (pH6, 7 e Eh-229), as circunstâncias favoráveis para o desenvolvimento das BRS, devido às condições anaeróbias observadas (Figura 8).

Na avaliação do poço C enfatiza-se uma maior redução do oxigênio (Eh-229), quando comparados os demais poços avaliados, o que o elege como sendo o poço ideal para o desenvolvimento das BRS, encontrado neste trabalho.

Figura 8 - Parâmetros físico-químicos das amostras de água produzida, dos poços A (ES), B (CP), C (CP) e D (TS), entre os meses de Outubro de 2014, Março e Junho de 2015 e Março 2016.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Quando as porcentagens populacionais foram confrontadas com a avaliação dos parâmetros físico-químicos para os poços B (pH 7,5 e Eh-123) e D (pH 6,9 e Eh-24), foi possível caracterizar os ambientes em que houve uma menor redução do oxigênio. Este fato por si só poderia explicar o número reduzido de BRS nestes poços.

Contudo, no ponto de vista de Savi e colaboradores (2009), a variação populacional além de estar associada às condições ambientais encontradas

também pode estar correlacionadas à sazonalidade, visto que estes dois pressupostos estão intimamente ligados com a disponibilidade de nutrientes.

Um estudo realizado em amostras de sedimento do lago Kizaki no Japão, por exemplo, utilizando a sonda **SRB385** em comparação com a sonda **EUB 338** (eubactérias) pelo método de FISH, comprovou um aumento populacional das BRS no período da primavera (LI, et al., 1999).

Para a pesquisa em questão, a relação entre a sazonalidade e a variação populacional só foi observada quando comparados os poços A (32%- primavera), e B (13%- outono) em que houve um decréscimo da população de BRS. Para os demais poços, C (31%- inverno) e D (26%- outono), a variação populacional, levando em consideração à sazonalidade, não foi representativa.

Uma porcentagem similar à encontrada no poço C (31%- inverno) do respectivo trabalho também foi descrita por Sampaio (2014), (36%) quando o mesmo avaliou a estrutura de comunidades de BRS em amostras de AP, coletadas também no período do inverno, em campos de petróleo na região do Recôncavo Baiano.

Já as porcentagens descritas por Batista (2013), 21,30% e 29,16%, em pesquisa que utilizava a Hibridização Fluorescente *in situ* para a detecção de Eubactérias e BRS a partir de amostras de AP, em poços de petróleo na Bahia, apresentaram valores aproximados ao encontrado neste trabalho para o poço D (26%- outono), porém para a pesquisa realizada por Batista (2013), não houve relatos sobre período sazonal em que as coletas ocorreram.

De acordo com Beech (2003), é comum a presença de BRS em campos de petróleo com problemas de CMI, em função da disponibilidade de nutrientes. Todavia, com a utilização dos métodos de controle e inibição, que têm sido aplicados com maior frequência pela indústria petrolífera, a fim de conter a ação corrosiva das BRS, tem se observado a redução entre as populações deste grupo nestes ambientes (SAMPAIO, 2014).

No entanto, é conhecido que as BRS possuem uma grande capacidade de se adaptar a ambientes hostis desenvolvendo mecanismos de proteção aos biocidas utilizados, o que muitas vezes dificulta o controle de seu crescimento em longo prazo (ALMEIDA et al., 2005).

5.1.2 Comparação entre os métodos DAPI, FISH e NMP.

Contagens através do método dependente de cultivo (Número Mais Provável- NMP) também foram realizadas para as mesmas amostras de AP nos poços A, B, C e D. Deste modo, foi possível verificar que para a contagem total com o DAPI, nos poços A ($2,8 \times 10^2$ cel/mL), B ($7,3 \times 10^2$ cel/mL) e C ($2,7 \times 10^2$ cel/mL), apresentaram números superiores de microorganismos, quando comparados aos métodos FISH e NMP. O que não correspondeu na análise do poço D para o método NMP, uma vez que este apresentou um número maior de células ($2,4 \times 10^2$ NMP/ 100 mL) frente aos demais métodos (DAPI $< 1,0 \times 10^2$ cel/mL e FISH $< 1,0 \times 10^2$ cel/mL). Este dado está possivelmente relacionado a condição de que o método NMP baseia-se em estimativas de probabilidade, o que o torna um método menos preciso quando comparados aos métodos independentes de cultivo (SILVA et al.,2007) (Tabela -6).

Tabela 6- Resultados das contagens entre os métodos (DAPI, FISH e NMP), referentes aos poços A, B, C e D, entre os meses de Outubro de 2014, Março e Junho de 2015 e Março de 2016.

Amostras	DAPI nº total de células/mL	FISH nº de bactérias/mL hibridizadas	NMP\ 100mL
Poço A (ES)	$2,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	6×10 NMP\100 mL
Poço B (CP)	$7,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$ NMP\100mL
Poço C (CP)	$2,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$ NMP\100mL
Poço D (TS)	$< 1,0 \times 10^{2est}$	$< 1,0 \times 10^{2est}$	$2,4 \times 10^2$ NMP/ 100mL

Fonte: Autoria própria, 2016.

. * est. =contagem estimada.

Quando o método FISH foi comparado aos métodos DAPI e NMP, o mesmo apresentou resultados naturalmente mais próximos aos encontrados nos poços avaliados para a identificação do grupo das BRS (δ -

Proteobacterias), em função da utilização da sonda **SRB385**, assegurada pela sua especificidade.

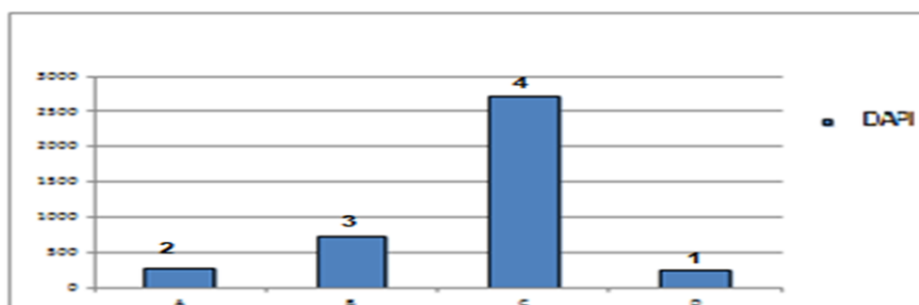
A pesquisa feita por Young-Tae, Nishimura e Ohwada (1996), utilizando os métodos DAPI e FISH combinados em comparação ao NMP observou que o FISH obteve resultados (2.7×10^7 cel/mL) com duas ordens de grandeza superior ao método NMP (1.5×10^5 NMP/mL) em ambientes marinhos.

Para o experimento em questão o aumento da ordem de grandeza entre os métodos DAPI, FISH e NMP, em um mesmo poço, não foi observado conforme descrito na tabela 7. O que possivelmente justificaria a diferença entre as populações encontradas pelos autores citados anteriormente e os resultados obtidos neste trabalho, seria a utilização das duas sondas (**SRB385** e a **Desulfobacter** - específica para o Gênero entre as posições 220 e 239) empregadas por eles na avaliação da população das BRS. Outra hipótese consiste no fato de haver espontaneamente uma menor população de BRS entre os poços avaliados para o respectivo trabalho.

5.1.3 Comparação entre os métodos (DAPI, FISH e NMP), empregando o teste Scott- Knott.

O teste Scott Knott foi empregado individualmente, em três análises para os métodos DAPI, FISH e NMP, respectivamente, com base nas médias obtidas dos poços A, B, C e D. A partir da avaliação dos resultados empregando o método DAPI, inicialmente, (Figura-9) foi possível observar a variação entre as médias dentro de cada poço pesquisado (A, B, C e D).

Figura 9 – Comparação entre as médias populacionais obtidas, para os poços A, B, C e D, utilizando o método DAPI.



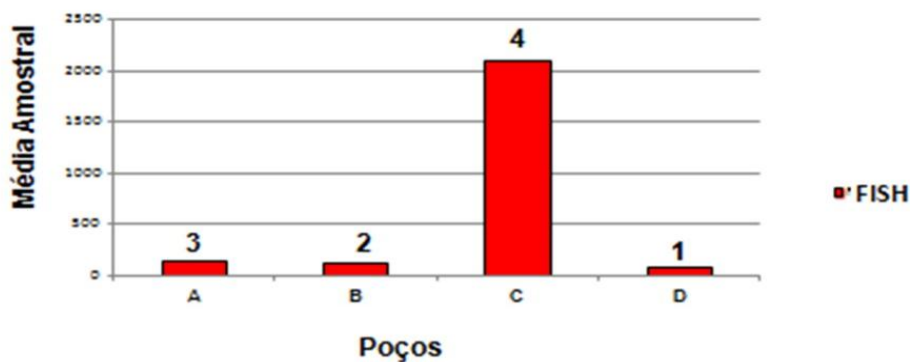
Fonte: Autoria própria, 2016.

*Médias seguidas pelos mesmos números, entre as barras, não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

As análises seguintes foram realizadas para os métodos FISH (Figura-10) e NMP, (Figura- 11), respectivamente. Em que houve um destaque para o poço C, por apresentar médias superiores aos demais poços, nos três métodos avaliados.

Vale salientar, que o poço C havia apresentado as condições favoráveis para o desenvolvimento das BRS na análise dos parâmetros físico-químicos, sendo o mesmo destacado neste trabalho entre os demais poços, o que corroboram com os resultados encontrados para esta avaliação.

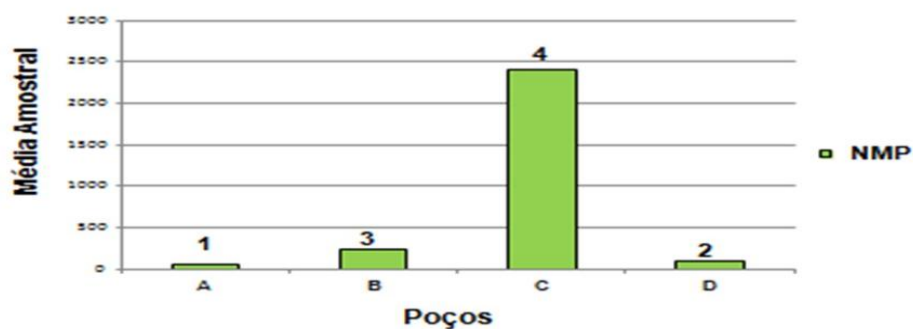
Figura 10– Comparação entre as médias populacionais obtidas, para os poços A, B, C e D, utilizando o método FISH.



Fonte: Autoria própria, 2016.

*Médias seguidas pelos mesmos números, entre as barras, não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Figura 11– Comparação entre as médias populacionais obtidas, para os poços A, B, C e D, utilizando o método NMP.

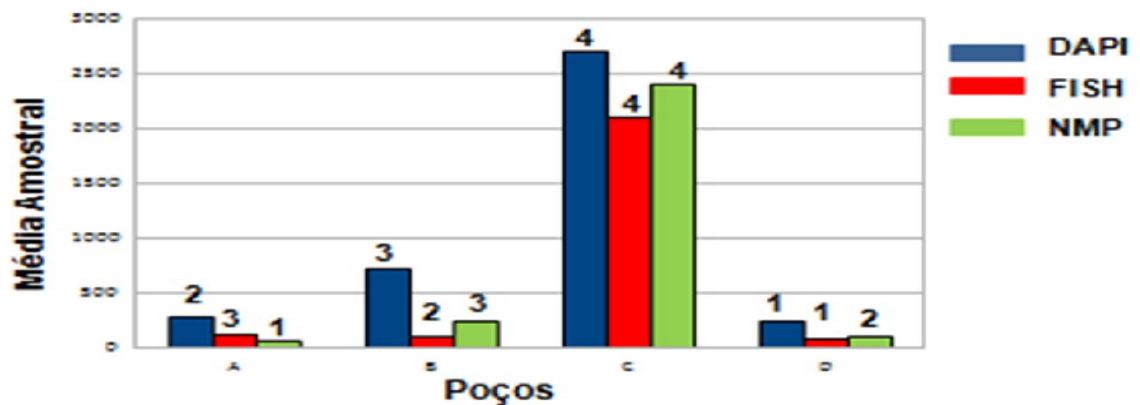


Fonte: Autoria própria, 2016.

*Médias seguidas pelos mesmos números, entre as barras, não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Uma análise comparativa, reunindo os métodos (DAPI, FISH e NMP), também foi realizada (Figura-12). E com base nos dados obtidos percebeu-se que os três métodos foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) quando, e apenas, o poço C foi avaliado.

Figura 12– Comparação entre os métodos DAPI, FISH e NMP, empregando o teste Scott Knott.



Fonte: Autoria própria, 2016.

*Médias seguidas pelos mesmos números, entre as barras, não diferem pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Os métodos DAPI e FISH também demonstraram significância estatística ($p \leq 0,05$) para a avaliação do poço D, conforme evidenciado na figura 12. Este dado reafirma o exposto por Zwirgmaier (2005), quando o autor relata que os métodos moleculares têm sido cada vez mais empregados para a identificação de BRS por suprir as restrições encontradas em métodos tradicionais, como no caso do NMP, apresentando resultados cada vez mais próximos ao encontrado em ambientes naturais.

5.2 Quantificação dos genes relacionados com a redução do sulfato (*dsrA*) e validação da técnica real time qPCR.

5.2.1 Extração do DNA para as amostras de AP e para a cultura de *Desulfovibrio vulgaris*

Inicialmente foram realizadas extrações do DNA para as amostras de água produzida *in natura* e para a cultura do *Desulfovibrio vulgaris*. Os resultados obtidos confirmaram a presença de bandas de DNA por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% apenas para a cultura de *Desulfovibrio vulgaris*.

Em seguida foi realizada a quantificação do DNA extraído para a cultura de *Desulfovibrio vulgaris* revelando uma concentração inicial de 89, 85 ng/ μ L. As razões para os comprimentos de ondas 260/280 nm foram avaliadas e apresentaram o resultado de 1,99. Vale ressaltar que os valores de referência são 1,8 para DNA e 2,0 para RNA, e que valores inferiores ao de referência são indicativos de contaminação por proteínas, fenol e outros contaminantes que são capazes de absorver comprimentos de onda próximos a 280 nm (TSB, 2007).

Já as análises das razões 260/230 apresentou um valor inferior aos comprimentos de onda 260/280 para a amostra da cultura de *Desulfovibrio vulgaris* (1,26) o que normalmente não é o esperado, já que os valores de referência correspondem a 2,0 para DNA e 2,2 para RNA quando os mesmos encontram-se “puros”. Valores inferiores correspondem à presença de contaminantes que absorvem o comprimento de onda de 230 nm (TSB, 2007).

5.2.2 Padronização da temperatura de anelamento (TA) dos primers (**DSR1F** e **DSR4R**)

Após a extração e quantificação da cultura do *Desulfovibrio vulgaris* foram realizadas análises utilizando a PCR convencional para a determinação da temperatura de anelamento (TA) dos primers (**DSR1F** e **DSR4R**) que amplificariam a sequência 16S rRNA. Para o ajuste da TA dos primers **DSR1F** e **DSR4R** um gradiente de temperatura entre 55°C e 59°C, obedecendo ao intervalo de 1°C foi realizado, em que a TA de 59°C apresentou apenas uma banda de DNA o que não ocorreu com as demais temperaturas, comprovando ser esta temperatura a ideal para a realização das análises da PCR convencional.

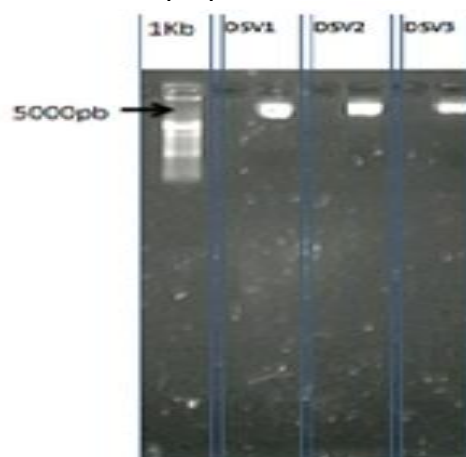
5.2.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a cultura de *Desulfovibrio vulgaris*

Após a padronização da TA para os primers **DSR1F** e **DSR4R** foi realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O produto da PCR promoveu a amplificação do gene responsável por codificar a enzima DSR com o produto esperado de 1900pb, assim como descrito por Ben-Dov, Brenner e Kushmaro (2007).

5.2.4 Clonagem da cultura de *Desulfovibrio vulgaris*

Três colônias contendo o produto ligado ao vetor pCR™4-TOPO® TA que foram inseridos nas células competentes *E. coli* TOP 10 foram selecionadas (DSV1, DSV2 e DSV3) e purificadas através do Pure Link Quick Pasmid Miniprep Kit. Após a purificação foi realizado um gel a 2%, por meio da eletroforese em gel de agarose, para o qual foi observada a integridade dos produtos clonados (Figura-13).

Figura 13 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos clones do *Desulfovibrio vulgaris* purificados com o Pure Link Quick Pasmid Miniprep Kit.



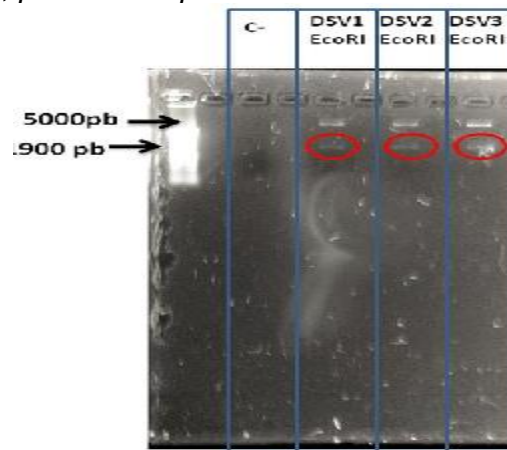
Fonte: Autoria própria, 2016.

Posteriormente, foi utilizada uma reação de restrição como intuito de verificar a presença do inserto. Deste modo, foi realizado o corte na fita do

DNA utilizando a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen – Life Technology) (ATTAR, 2016; KUSPA; LOOMIS, 1982). (Figura-14).

A enzima *EcoRI* também foi utilizada por Stropa (2009), quando a autora buscava selecionar clones de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 (1500 pb) a partir do vetor *pGEM-T Easy* (3015 pb).

Figura 14– Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos clones, após o corte com a enzima de restrição *EcoRI*, para o DNA plasmidial do *Desulfovibrio vulgaris*.



Fonte: Autoria própria, 2016.

* Círculos em vermelho destacam os cortes feitos pela enzima *EcoRI*.

Tabela 7– Quantificação dos plasmídeos originados da clonagem, a partir da cultura do *Desulfovibrio vulgaris*.

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO	A2 60	A260\230 nm
DSV1	41,9 ng\ μ L	1,	2,07
DSV2	40,55 ng\ μ L	1,	1,57
DSV3	48,75 ng\ μ L	2,	2,12

Fonte: Autoria própria, 2016.

Em seguida, as amostras clonadas (DSV1, DSV2 e DSV3) a partir do DNA plasmidial da cultura do *Desulfovibrio vulgaris* foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop Multiscan Spectrophotometer Specifications (Thermo Scientific), como demonstrado na tabela 8. Posteriormente os plasmídeos foram purificados mais uma vez, utilizando a enzima *ExoPro Star 1-Step* (GE) e enviados para a plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz - Bahia (FIOCRUZ).

5.2.5 Sequenciamento dos clones de *Desulfovibrio vulgaris*

Os resultados obtidos após as análises dos eletroferogramas, descritos pelo sequenciamento, deram origem a seis sequências (duas sequências forward e duas sequências reverse para cada clone) (ANEXO-1, figura 22). Para alinhamento e edição foi utilizando do programa da Embrapa.

A partir das sequências editadas foi possível compara-las no banco de dados GenBank do BLAST, com o intuito de avaliar a sua similaridade, correlacionando-as com as demais sequências de várias bactérias isoladas e já depositadas (Quadro-2).

Quadro 2– Comparação entre as espécies de *Desulfovibrio* identificadas, a partir dos clones DSV1, DSV2 e DSV3, que apresentam similaridade entre as demais sequências dos micro-organismos catalogados no Gen Bank

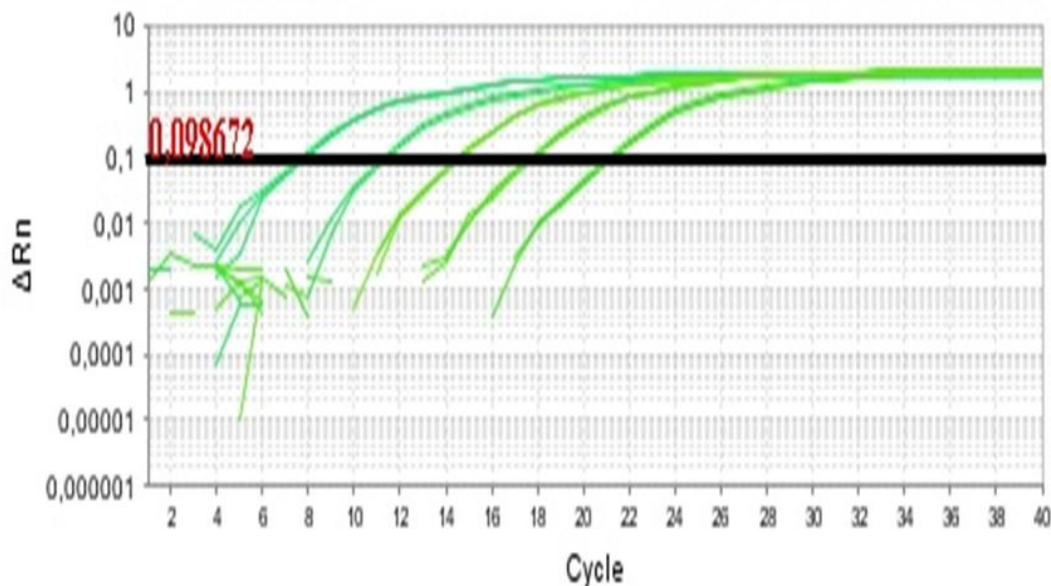
Amostras	Catalogados no GenBack	Total Score	Query Cover	e Value	Identidade	Acession
DSV1	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> RCH1, complete genome.	1228	100%	0.0	100%	CP002297.1
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DP4, complete genome.	1228	100%	0.0	100%	CP000527.1
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. <i>Hildenborough</i> , complete genome	1228	100%	0.0	100%	AE017285.1
DSV2	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> RCH1, complete genome.	566	100%	1e-157	100%	CP002297.1
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DP4, complete genome.	566	100%	1e-157	100%	CP000527.1
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. <i>Hildenborough</i> , complete	566	100%	1e-157	100%	AE017285.1
DSV3	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> RCH1, complete genome.	1418	100%	0.0	100%	CP002297.1
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DP4, complete genome.	1418	100%	0.0	100%	CP000527.1
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. <i>Hildenborough</i> , complete .	1418	100%	0.0	100%	AE017285.1

Fonte: BLAST, 2015.

5.2.6 Otimização dos primers (RTdsrAR e RTdsraF)

Os resultados obtidos para a curva de eficiência dos primers, **RTdsrAF** e **RTdsrAR** para a concentração de 10 μM , reproduziram ampliações satisfatórias, uma vez que de acordo com Taylor e colaboradores (2010), uma amplificação perfeita ocorre com um espaçamento das curvas de fluorescência, sendo esta determinada pela equação $2n = \text{diluição}$, em que n será o número de ciclos entre as curvas no limiar da fluorescência, ou seja, n será o ciclo de quantificação (C_q). (Figura- 15).

Figura 15– Amplificação da curva de eficiência, para os primers desenhados RTdsrAF e RTdsrAR, na concentração de 10 μM , em cinco pontos, por triplicata.



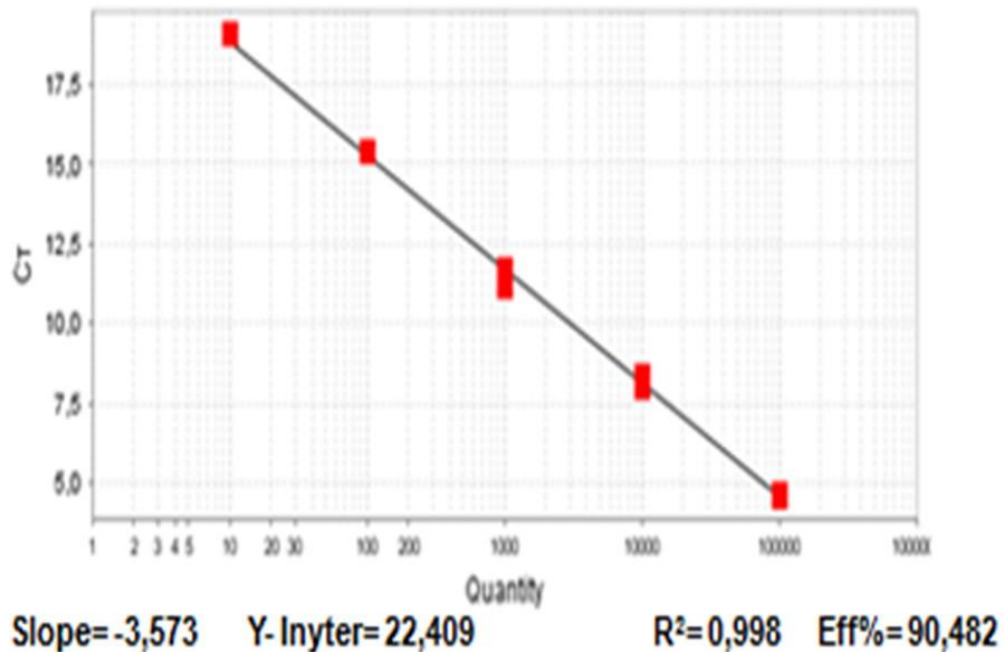
Fonte: Autoria própria, 2016.

A molécula intercalante Syber Green foi a responsável por emitir a fluorescência repórter determinada ao final de cada ciclo e o corante ROX foi utilizado paralelamente como referência passiva, essencial para normalizar a fluorescência presente no meio e a fluorescência repórter (SAFDAR et al., 2011).

Além disso, o desempenho da curva padrão, que teve como objetivo avaliar a linearidade da análise (BEN-DOV; BRENNER; KUSHMARO, 2007) também foi avaliado apresentando uma escala linear em que a inclinação da curva foi de -3,5, o que significa dizer que os valores de C_q foram separados a cada 3,5 ciclos (TAYLOR et al., 2010). A eficiência de 90,482 % foi determinada pela fórmula ($E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100\%$) (STROPA, 2009). E o

valor de R^2 (0,998) também foi observado com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da análise (BEN-DOV; BRENNER; KUSHMARO, 2007), como demonstrado a seguir na figura 16.

Figura 16– Curva de eficiência dos primers desenhados RTdsrAF e RTdsrAR, para a concentração de 10 μM , em cinco pontos, por triplica..



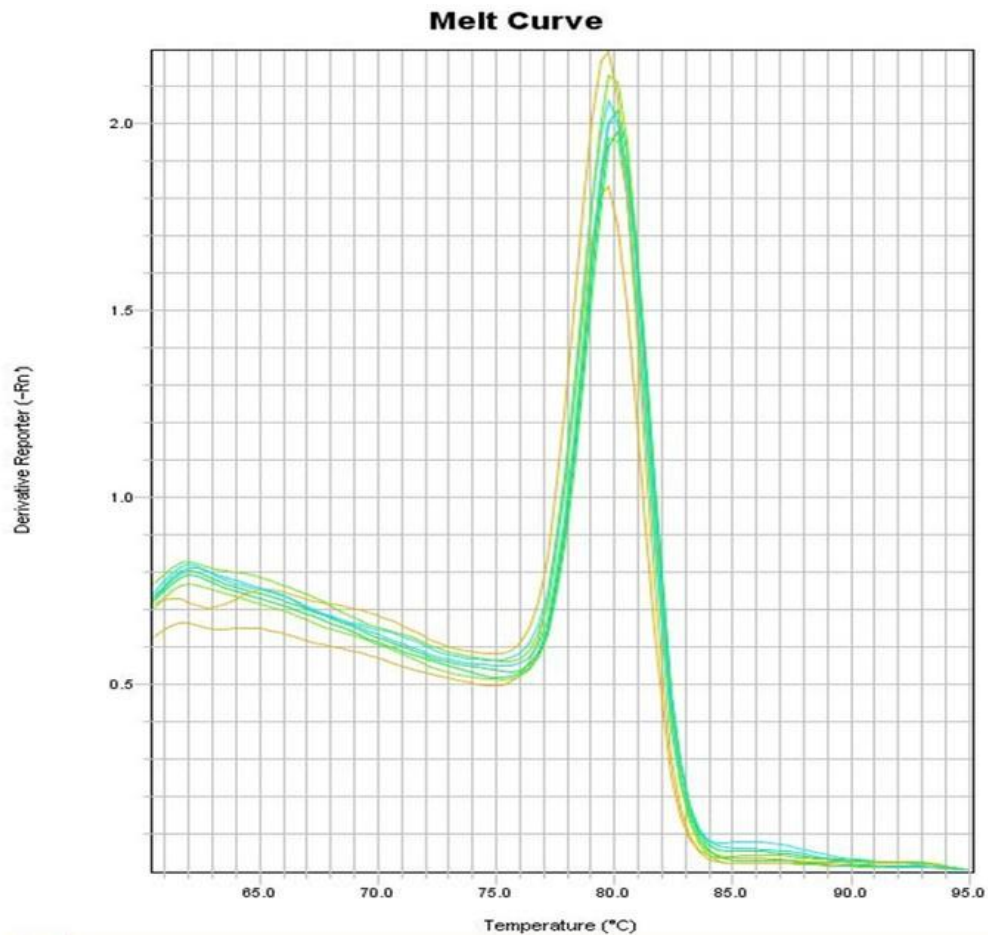
Fonte: Autoria própria, 2016.

Conforme exposto por Taylor e colaboradores (2010), a avaliação da eficiência das reações da real time qPCR é um indicativo de problemas que podem causar resultados artificiais, como por exemplo: primers mal concebidos, temperaturas de anelamento inconsistentes, Taq polimerase velha ou inativa e amplicons com estruturas secundárias. Por essa razão, a eficiência da reação em real time qPCR não deve ser inferior a 90% ou superior a 110% (BUSTIN et al., 2008).

A especificidade dos primers (RTdsrAF e RTdsrAR) para a concentração de 10 μM foi confirmada através da análise das curvas de dissociação ou curva de Melting (TM), que promoveu apenas um pico para cada diluição empregada. As TM ocorreram a 80°C (Figura-17), confirmando a especificidade do produto amplificado. De acordo com Damião (2012), uma

TM com valor inferior a 78°C está associada à formação de estruturas secundárias como os dímeros de primers ou a contaminações.

Figura 17– Curva de Melting dos primers RTdsrAF e RTdsrAR, para a concentração de 10 μ M, em cinco pontos.



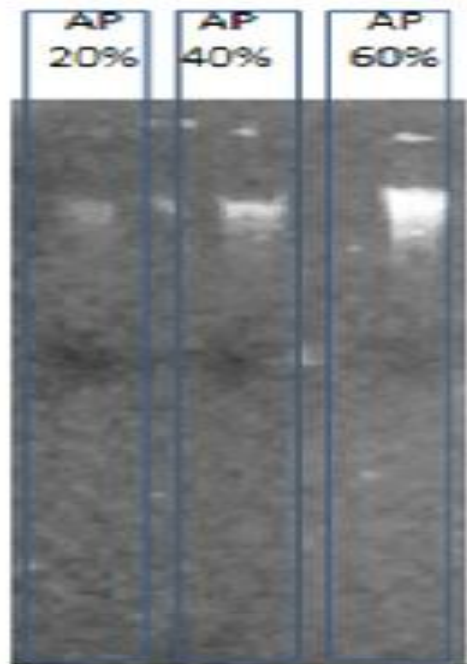
Fonte: Autoria própria, 2016.

Outros fatores que estão associados à eficiência da curva em real time qPCR é o slope, que representa a inclinação da curva, devendo este ser $\leq -3,6$ ou $\geq -3,3$, e o R^2 em que o limiar é desejado deve ser superior a 0,980 (TAYLOR et al., 2010; APPLIED BIOSYSTEMS, 2013).

5.2.7 Análise das amostras bioestimuladas através da real time qPCR

Devido à ausência de bandas de DNA referentes às amostras de AP coletadas, uma nova coleta foi realizada no mês Março de 2016. Para esta amostra além da extração do DNA da AP foi realizada a bioestimulação porque, mais uma vez não se obteve êxito na extração da AP in natura.

Figura 18– Perfil eletroforético das amostras de AP bioestimuladas, para as concentrações de 20%, 40% e 60%.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Tabela 8 – Quantificação do DNA extraído, para amostras de água produzida bioestimuladas (AP 20%, AP 40% e AP60%), no NanoDrop.

Concentração de AP	Concentração do DNA ng/ μ L	Razão 260/280 nm	Razão 260/230 nm
20%	17,55	2,24	1,068
40%	58,6	1,85	0,406
60%	203,55	2,48	2,02

Fonte: Autoria própria, 2016.

Após a extração foi realizado o perfil eletroforético das amostras bioestimuladas, exposto na figura 18 e a quantificação no equipamento NanoDrop, em que se observou que a amostra AP 20% apresentou uma

fraca banda de DNA no perfil eletroforético, confirmando o resultado encontrado para a quantificação descrita como a menor concentração de DNA (17, 55 ng/ μ L), quando comparada as outras amostras avaliadas (AP 40% e AP 60%) na tabela 8.

A análise do perfil eletroforético também revelou que a amostra AP 60% apresentou a banda de DNA com maior intensidade, seguida por rastros que possivelmente pode estar relacionada à hipertermia, onde ocorre um aumento da absorção da luz UV em função da elevação da temperatura, o que resulta desnaturação da fita de DNA (SOUZA et al., 2013).

Para a razão 260/280 nm as amostras AP 20% e AP 60% apresentaram os valores de 2,24 e 2,48 respectivamente, contrariando o esperado (1,8) para DNA (TAYLOR, 2010). Este resultado sugere uma contaminação por RNA. Na avaliação da razão 260/230 nm, apenas a amostras AP 60% apresentou valor (2,02) equivalente ao esperado para DNA (TSB, 2007).

5.2.8 Interpretação dos resultados para as amostras bioestimuladas (AP 40% e AP 60%).

Das três amostras que foram bioestimuladas apenas duas (AP 40% e AP 60%) foram submetidas à análise por real time qPCR, devido à qualidade do DNA extraído. Dos experimentos realizados para a amostra AP 60%, apenas dois apresentaram resultados foram considerados satisfatórios (experimento A e experimento B) no momento em que as amostras foram diluídas (10^{-1}), seguidos pela realização de ajustes no Ct (Cycle threshold) alcançado. Vale salientar que os experimentos A e B ocorreram em dias alternados, o que permitiu a realização da replica biológica para a amostra de AP.

No experimento A o valor do Ct correspondente a amostra (AP 60%) foi de 30,347, e após ser submetido à fórmula da equação da reta ($y = ax + b$) pelo próprio software (7500 v 2.3- Applied Biosystems) foi possível quantificar

o número de cópias do gene **dsrA** ($5, 25 \times 10^1 / 2\mu\text{L}$ da amostra), representados na tabela 9.

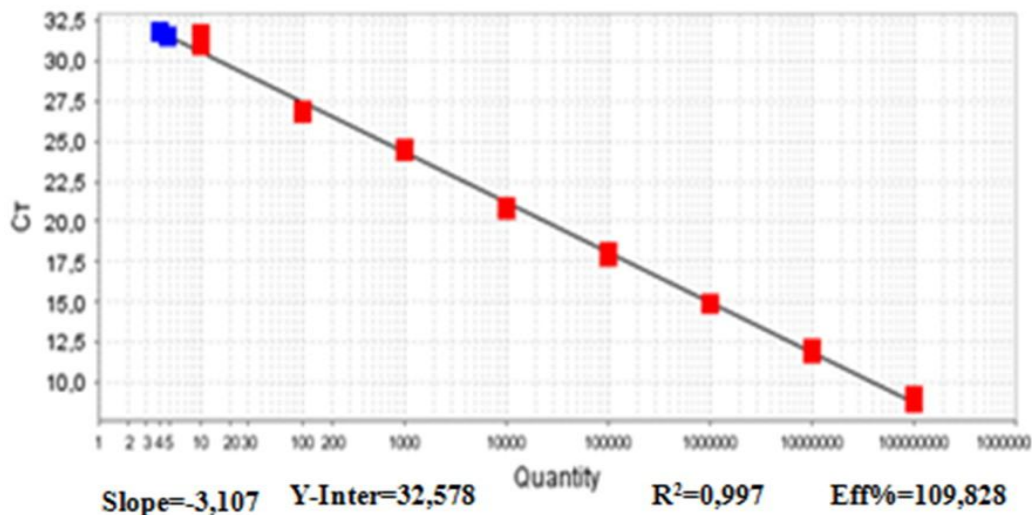
Tabela 9– Quantificação do gene alvo (**dsrA**), a partir de $2\mu\text{L}$ da amostra de água produzida bioestimulada (AP 60%) experimento A, em real time qPCR.

DNA total ng/ μL NanoDrop	DNA diluído (10^{-1}) ng/ μL	Ct	Nº cópias de gene dsrA /2ng/ μL
203, 55	20,35	30,347	$5,25 \times 10^{-1}$

Fonte: Autoria própria, 2016.

A eficiência da amplificação alcançada na reação da real time qPCR para o gene alvo (**dsrA**) do experimento A (amostra AP 60%) foi de 109,828%, o slope de -3,107 e o R^2 foi de 0,997 (Figura-19). Estes resultados estão em conformidade com o que é preconizado pela literatura, o que os torna confiáveis (BUSTIN et al., 2008).

Figura 19 -Curva padrão da amostra bioestimulada (AP 60%) no experimento A, para a quantificação do alvo **dsrA**, através da real time qPCR



Fonhte: Autoria própria, 2016.

Quando o experimento B foi executado os resultados obtidos, também realizados para a amostra AP 60% em diluição 10^{-1} , confirmaram através do Ct (28,033) o baixo número de cópias ($16, 68 \times 10^1 / 2\mu\text{L}$ da amostra) do gene **dsrA** presente na amostra (Tabela-10).

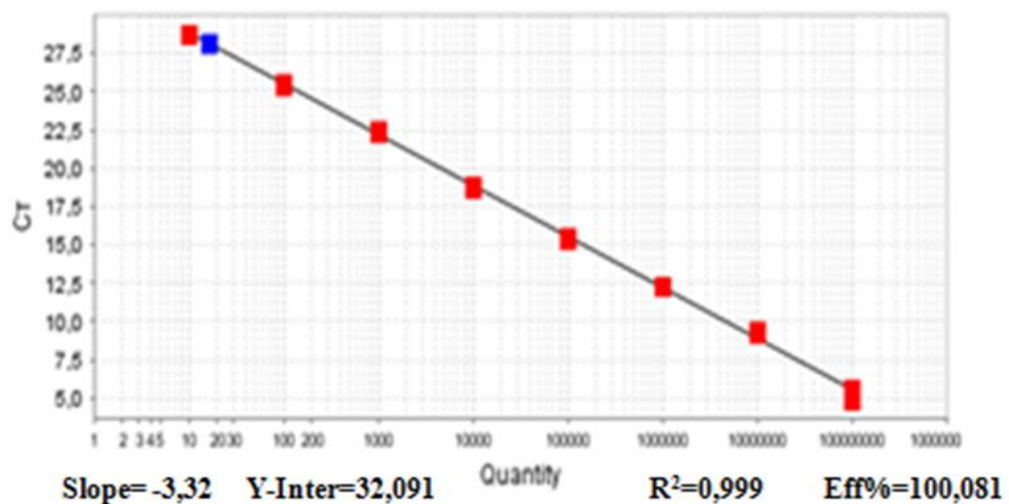
Tabela 10 Quantificação do gene alvo (*dsrA*), a partir de 2 μL da amostra de água produzida bioestimulada (AP 60%) experimento B, em real time qPCR.

DNA total ng/ μL Nanodrop	DNA diluído (10^{-1}) ng/ μL	Ct	Nº cópias de gene <i>dsrA</i> /2ng/ μL
203,55	20,35	28,033	$16,68 \times 10^{-1}$

Fonte: Autoria própria, 2016.

Contudo, os resultados supracitados mostraram-se mais precisos do que no experimento A, uma vez que a curva alcançou 100,081%, da eficiência e uma inclinação (slope) de -3,32, tendo a reprodutibilidade resguardada com um R^2 igual a 0,999, como demonstrado na figura 20.

Figura 20- Quantificação do gene alvo (*dsrA*), a partir de 2 μL da amostra de água produzida bioestimulada (AP 60%) experimento B, em real time qPCR

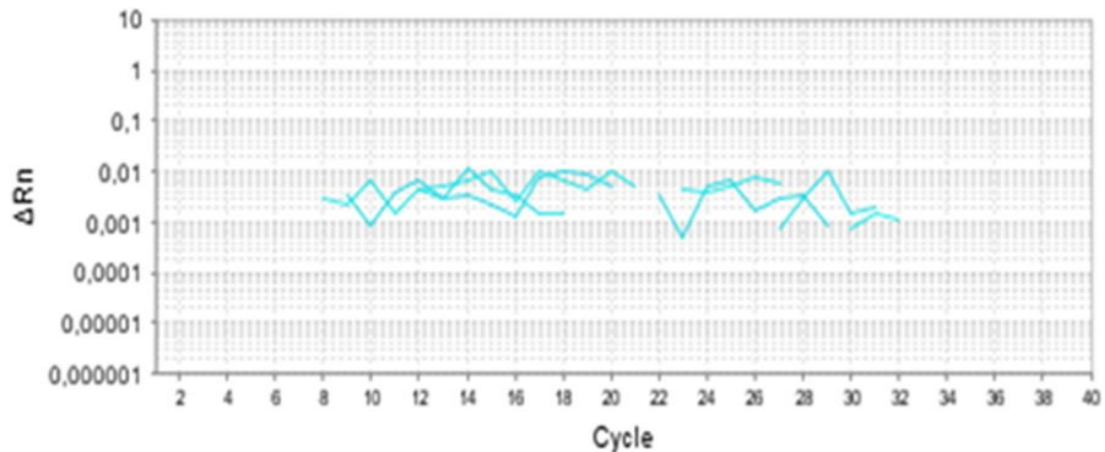


Fonte: Autoria própria, 2016.

Para a amostra AP 40%, após a realização de alguns ensaios, não foram apresentadas amplificações através da real time qPCR (Figura-21). Este dado pode estar relacionado com o resultado obtido para a quantificação realizada no NanoDrop, em especial a razão 260/230 nm, que sugeria a presença de outros contaminantes como hidrocarbonetos, visto que a

produção do mesmo pode influenciar de forma significativa nas características físico-químicas e biológicas deste tipo de amostra e interferir na amplificação quando o método real time qPCR é empregado (STEWART; ARNOLD, 2011).

Figura 21 - Amostra bioestimulada AP 40% que não apresentou amplificação para a análise em real time qPCR.



Fonte: Autoria própria, 2016.

Deste modo, possivelmente para esta concentração (AP 40%), assim como para a concentração de AP 20% o processo da bioestimulação não tenha se mostrado eficiente, como ocorreu para a amostra AP 60%.

6 CONCLUSÃO

Uma avaliação mais ampla das comunidades de BRS requer a utilização de mais de um método para que se possa entender a dinâmica destas populações. O trabalho em questão utilizou três métodos (DAPI, FISH e NMP), a fim de promover o refinamento da pesquisa, uma vez que cada método respondia a uma condição pré-estabelecida.

A partir das observações descritas, a pesquisa realizada comprovou que a utilização do método de FISH apresentou resultados mais próximos dos encontrados nos poços de petróleo pesquisados para o grupo das BRS, visto que o método DAPI tinha como objetivo a contagem global da população avaliada e o método NMP tinha como base a estimativa de probabilidade. Assim, foi possível traçar um perfil da população microbiana em cada ponto onde ocorreu a coleta, e este entendimento foi associando aos fatores ambientais existentes.

Outro fator avaliado tem como destaque a complexidade das amostras de água produzida (AP), em função das mesmas exigirem um tratamento prévio por ser um efluente da indústria de petróleo, onde há a ocorrência de contaminantes e inibidores. Como uma alternativa para este evento, o trabalho proposto sugere o tratamento da AP empregando a bioestimulação, que possivelmente poderá ser o caminho para a degradação dos contaminantes e inibidores, que tem influenciado diretamente na utilização de métodos mais sensíveis como a real time qPCR.

*Vale salientar que este trabalho conseguiu determinar uma concentração da AP (60%) capaz de promover a amplificação do DNA extraído e, por conseguinte a validação da metodologia para este tipo de amostra. Somente após a bioestimulação da AP, a amplificação do DNA extraído foi evidenciada nos dois experimentos que foram considerados satisfatórios e que tinham o gene **dsrA** como alvo. Estes resultados destacaram a importância deste trabalho, que poderá servir como base para estudos futuros, que tiverem como objetivo avaliar populações microbianas a partir de métodos independentes de cultivo em amostras que dependerem de tratamentos prévios.*

REFERÊNCIAS

ALEF, K; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Brioche misty**. San Diego: Academic Press. 1995. 576 p.

ALMEIDA, P. F. et al. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Rio de Janeiro, p. 183-195, 2006.

ALMEIDA, S. K et al. **Detecção de bactérias redutoras de sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio 2005.93 f.** Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais). Pós-graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. Belo Horizonte, 2005.

AMANN, R. I. et al. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. **Applied And Environmental Microbiology**. [s.l.], v. 56, n. 6, p.1919-1925, jun. 1990.

AMANN, R. I. et al. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.614-623, 29 out. 1991.

ANDERSON, I. C; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environ Microbiol**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.769-779, ago. 2004. Wiley-Blackwell. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x).

APPLIED BIOSYSTEMS. Thermo Scientifc. **Real-Time PCR Troubleshooting**. 2013. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/tutorials/realtime-pcr-trouble-shooting-guide.html>>. Acesso em: 13 maio 2015.

APPLIED BIOSYSTEMS. Thermo Scientifc. **7500 Fast Software v2.3 (Windows 7 64-bit ready) Registration required**. 2015. Disponível em: <www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/software-downloads/applied-biosystems-7500-fast-real-time-pcr-system.html>. Acesso em: 07 dez. 2015.

ARAÚJO, L. et al. Efeito de biocidas na corrosão induzida microbiologicamente do aço duplex em água de produção de petróleo. **Corros. Prot. Mater**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.108-114, maio 2013.

ATTAR, N. Cellular microbiology: Damage limitation after friendly fire. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.130-130, 15 fev. 2016. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.20>.

AUBERT, C. et al. A sequential electron transfer from hydrogenases to cytochromes in sulfate-reducing bacteria. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba)**

- **Protein Structure And Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1476, n. 1, p.85-92, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00221-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00221-6).

BARTON, L. L.; TOMEI, F. A. (Comp.). *Characteristics and Activities of Sulfate- Reducing Bacteria*. In: BARTON, Larry L. (Ed.). **BIOTECHNOLOGY HANDBOOKS: Sulfate- Reducing Bacteria**. New York: Springer Science, 1995. Cap. 1. p. 1-32.

BASTIN, E. S. et al. *The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters*. **Science**, [s.l.], v. 63, n. 1618, p.21-24, 1 jan. 1926. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.63.1618.21>.

BATISTA, L.L.F. **Estudo de comunidade de bactérias redutoras de sulfato in vitro com água produzida de petróleo- Artigo 2**. 2013, 72f. *Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)*. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

BEECH, I. B. *Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion*. **Microbiology today**. Portsmouth, v. 30, p. 115-117, 2003.

BEECH, I. B. *Corrosion of technical materials in the presence of biofilms— current understanding and state-of-the art methods of study*. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Portsmouth, v. 53, n. 3, p. 177-183, 2004.

BENDER, K. S. et al. *Analysis of a Ferric Uptake Regulator (Fur) Mutant of Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 17, p.5389-5400, 13 jul. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00276-07>.

BEN-DOV, E; BRENNER, A; KUSHMARO, A. *Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Using dsrA and apsA Genes*. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.439-451, 10 mar. 2007. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-007-9233-2>.

BENTO, F.M. et al. *Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 96, n. 9, p.1049-1055, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>.

BILLEN, G. *Etude de l'ecometabolisme du mercure dans un milieu d'eau douce*. **Hydrobiological Bulletin**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.60-68, jun. 1973. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02282199>.

BISWAS, K; TAYLOR, M. W; TURNER, S. J. *DsrAB-based analysis of sulphate- reducing bacteria in moving bed biofilm reactor (MBBR) wastewater treatment plants*. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 98, n. 16, p.7211-7222, 1 maio 2014. Springer Science+ Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5769-5>.

BØDTKER, G. et al. *Microbial analysis of backflowed injection water from a*

nitrate treated North Sea oil reservoir. Journal of industrial microbiology & biotechnology, Bergen, v. 36, n. 3, p. 439-450, 2009.

BLAST. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch>. Acesso em: 11 nov. 2015.

BRASIL. Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Electropherogram quality analysis. 2012. Disponível em: <asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>. Acesso em: 10 nov. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis, Diretoria de Licenciamento e Qualidade Ambiental, Escritório de Licenciamento das Atividades de Petróleo e Nuclear. Informação Técnica ELPN/IBAMA Nº012/03: Impactos Ambientais da Atividade de Prospecção Sísmica Marítima. 03. ed. Rio de Janeiro: Ministério do Meio Ambiente, 2012. 66 p. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/7336036-Informacao-elpn-ibama-no-012-03-resumo.html>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

BRYANT, M. P. et al. Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. Archiv Für Mikrobiologie, [s.l.], v. 59, n. 1-3, p.20-31, 1967. Springer Science + Business Media.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00406313>.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry, [s.l.], v. 55, n. 4, p.611- 622, 26 fev. 2009. American Association for Clinical Chemistry (AACC).
<http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

BUSTIN, S. A; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clin. Sci., [s.l.], v. 109, n. 4, p.365-379, 1 out. 2005. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20050086>.

CAMPBELL, L. L.; POSTGATE, J. R. Classification of the Spore-Forming Sulfate- Reducing Bacteria. American Society For Microbiology, Sussex, v. 29, n. 3, p.359- 363, 1965.

CAPELLETTI, R. V. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. 2006. 81f. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARVALHO, A. S.; CEDRAZ, V. M. A. S; SANTOS, W. F. Detecção e caracterização de microrganismos sulfetogênicos no solo do IFbaiano campus Catu: Diagnóstico preliminar. In: Congresso Nordeste de Pesquisa e Inovação- CONNEPI., 5º, 2010, Maceió. Anais CONNEPI2010. Maceió: Biblioteca Nacional, 2011. p. 1 - 6. Disponível em:<<http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/view/1357>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

CARVALHO, C. M. et al. Detecção de procariotos redutores de sulfato (PRS)

em amostras ambientais do manguezal de Diogo Lopes, bacia petrolífera potiguar. In: PEDEPETRO, nº IV 2007, Natal, **Anais...** Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p.1-7. 2007.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria1. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.1-9, jan. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00665.x>.

CRESPIM, E. **Detecção e quantificação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em amostras de petróleo utilizando primers grupo específicos**. 2008. 113f. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular). Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

CHHABRA, S. R. et al. Global Analysis of Heat Shock Response in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 188, n. 5, p.1817-1828, 15 fev. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.188.5.1817-1828.2006>.

CHIN, K. et al. Quantifying Expression of a Dissimilatory (bi) Sulfite Reductase Gene in Petroleum-Contaminated Marine Harbor Sediments. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.489-499, 5 set. 2007. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-007-9294-2>.

CLARK, M. E. et al. Temporal Transcriptomic Analysis as *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Transitions into Stationary Phase during Electron Donor Depletion. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 72, n. 8, p.5578-5588, 1 ago. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00284-06>.

CORTEZ, M. T. S. C. **Abordagem molecular na resolução de problemas com biocorrosão**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia). Pós-graduação em Microbiologia. Departamento de Biologia. Universidade Aveiro, Portugal, 2009.

CORD-RUWISCH, R.; KLEINITZ, W.; WIDDEL, F.. Sulfate-reducing Bacteria and Their Activities in Oil Production. **Journal Of Petroleum Technology**, [s.l.], v. 39, n. 01, p.97-106, 1 jan. 1987. Society of Petroleum Engineers (SPE). <http://dx.doi.org/10.2118/13554-pa>.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular- Princípios e Técnicas**. 1ª ed. Tradução por: Gaby Renard et al., Porto Alegre: Armtmed, 2012. 994 p. Título original: *Molecular Biology Principles and Techniques*.

CYPIONKA, H. Oxygen Respiration by *Desulfovibrio* Species1. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.827-848, out. 2000. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.827>.

DAMIÃO, A. O. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos**. 2012. 65f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia). Instituto de Ciências ad Saúde.

Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

DAVIDOVA, I. et al. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Edmonton, v. 27, n. 2, p. 80-86, 2001.

DHILLON, A. et al. Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 5, p.2765-2772, 1 maio 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.5.2765-2772.2003>.

DIÁRIO DO COMÉRCIO: Os danos da corrosão na economia. Belo Horizonte, 07 jun. 2008. Disponível em: <http://www.diariodocomercio.com.br/noticia.php?tit=os_danos_da_corrosao_na_economia_&id=101214>. Acesso em: 08 jul. 2016.

DUNSMORE, B. et al. Effects of nitrate treatment on a mixed species, oil field microbial biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.454-462, 21 fev. 2006. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-006-0095-2>.

DUQUE, Z. et al. Comparison of sulphide corrosivity of sulphate- and non-sulphate-reducing prokaryotes isolated from oilfield injection water. **Materials And Corrosion**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.314-320, 7 dez. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/maco.201106298>.

EUROPEAN COMMISSION. **31998L0008**:. Biocidal Products Directive. 8 ed. [s.l.]: Official Journal, 1998. 63 p. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX:31998L0008&qid=1470326584633>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

FAKHURU'L-RAZI, Ahmadun et al. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 170, n. 2-3, p.530-551, 30 out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.044>.

FAN, L. et al. Diversity and Composition of Sulfate- and Sulfite-Reducing Prokaryotes as Affected by Marine-Freshwater Gradient and Sulfate Availability. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.224-237, 23 jul. 2011. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9912-x>.

FASTA. **NCBI: National Center for Biotechnology Information.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/57903622?report=fasta>>. Acesso em: 05 jul. 2015.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 55, n. 402, p.1445-1454, 18 jun. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh181>.

GIEG, L. M. et al. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v.

12, n. 11, p.3074-3086, nov. 2010. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02282.x>.

GIEG, L. M.; JACK, T.R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 92, n. 2, p.263-282, 20 ago. 2011. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>.

GODINHO, V. M. **investigação de bactérias patogênicas por técnicas moleculares em um sistema de tratamento de esgotos composto por reator UASB e lagoas de polimento**. 2010. 185 f. Tese (Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

GREENE, E. A. et al. Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. **Environ Microbiol**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.607-617, jul. 2003. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00446.x>.

HALIM, A; WATKIN, E; GUBNER, R. Short term corrosion monitoring of carbon steel by bio competitive exclusion of thermophilic sulphate reducing bacteria and nitrate reducing bacteria. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 77, p.348-362, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.040>.

HE, Q. et al. Energetic Consequences of Nitrite Stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, Inferred from Global Transcriptional Analysis. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 72, n. 6, p.4370-4381, 1 jun. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02609-05>.

HEIDELBERG, J. F et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Nat Biotechnol**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.554-559, 11 abr. 2004. Nature Publishing Group.
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt959>.

HERNDL, G. J. et al. Contribution of Archaea to Total Prokaryotic Production in the Deep Atlantic Ocean. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 5, p.2303-2309, 1 maio 2005. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.5.2303-2309.2005>.

HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil Field Souring Control by Nitrate-Reducing *Sulfurospirillum* spp. That Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria for Organic Electron Donors. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 8, p.2644-2652, 16 fev. 2007. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/aem.02332-06>

HUSSON, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. **Plant Soil**, [s.l.], v. 362, n. 1-2, p.389-417, 8 set. 2012. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>.

IDT. **Integred DNA Technology**. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>>. Acesso em: 05 jul. 2015. IDT. **Integred DNA**

Technology: RealTime qPCR Assay. Disponível em: <[http:// www.idtdna.com/scitools/Applications/Rea](http://www.idtdna.com/scitools/Applications/Rea)> Acesso em: 13 ago. 2015.

JACK, R.T; WESTLAKE, D. W. S (Comp.). Control in Industrial Settings. In: BARTON, L.I. TOMEI, F. A. **BIOTECHNOLOGY HANDBOOKS: Sulfate-Reducing Bacteria**. 8. ed. New York: Springer Science, 1995. Cap. 10. p. 265-288. Disponível em:<http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-1582-5_10>. Acesso em: 20 mar. 2014.

KARR, E. A. et al. Diversity and Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in Permanently Frozen Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 10, p.6353-6359, 1 out. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.10.6353-6359.2005>.

KIMBROUGH, D. E. et al. The effect of electrolysis and oxidation reduction potential on microbial survival, growth, and disinfection. **International Journal of Environment and Pollution**, [s.l.], v. 27, n. 1/2/3, p.211-221, 2006. Inderscience Publishers. <http://dx.doi.org/10.1504/ijep.2006.010464>.

KJELLERUP, B. V. et al. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques. **J Ind Microbiol Biotech- nol**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.163-170, abr. 2005. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0222-5>.

KOCH, G. H. et al. **Corrosion cost and preventive strategies in the United States**. 2002. Disponível em:<<https://www.nace.org/uploadedFiles/Publications/ccsupp.pdf>> Acesso em: 08 de jul.2016

KORTE, H. L. et al. Independence of Nitrate and Nitrite Inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and Use of Nitrite as a Substrate for Growth. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.924-931, 20 jan. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es504484m>.

KUSPA, A.; LOOMIS, W. F. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 89, n. 18, p.8803-8807, 15 set. 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.18.8803>.

LAUE, H. et al. Dissimilatory Sulfite Reductase (Desulfovirdin) of the Taurine-Degrading, Non-Sulfate-Reducing Bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU Contains a Fused DsrB-DsrD Subunit. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 183, n. 5, p.1727-1733, 1 mar. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.183.5.1727-1733.2001>.

LENS, P. et al. Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. **Reviews In Environmental Science And Bio/technology**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.311-325, dez. 2002. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1023207921156>.

- LI, J. et al. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in freshwater lake sediment. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.31-39, jan. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00558.x>.
- LIMA, L. R.; ALMEIDA, P. F.; MATOS, J. B. T. L. Prospecção de técnicas moleculares (qPCR e FISH) a serem utilizadas em amostras ambientais para pesquisa na área de biotecnologia. **Cadernos de Prospecção**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.79-91, 30 mar. 2016. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/s.cprosp.2016.009.010>.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.402-408, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LLOBET-BROSSA, E; ROSSELLO-MORA, R; AMANN, R. Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 7, p.2691-2696, jun. 1988.
- LOVLEY, D. R. et al. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. **Marine Geology**, [s.l.], v. 113, n. 1-2, p.41-53, jul. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-3227\(93\)90148-o](http://dx.doi.org/10.1016/0025-3227(93)90148-o).
- LU, Z. et al. Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. **The ISME Journal**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.451-460, 4 ago. 2011. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.91>.
- LÜCKER, S. et al. Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence in situ hybridization. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.523-528, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.009>.
- MACHADO, S. P. A. **Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia do Ambiente)- Departamento de Ciências Biológicas. Escola de Engenharia. Universidade do Minho. Braga, 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Tradução de Cynthia Maria Kiaw. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p. MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAGOT, M. et al. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 77, n. 2, p.103-116, 2000. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1002434330514>.
- MARTINS, F. F. **Fisiologia e quantificação de lipídios por citometria de fluxo em *Yarrowia lipolytica***. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e

Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

MCINERNEY, M. J; MACKIE, R. I; BRYANT, M. P. Syntrophic Association of a Butyrate-Degrading Bacterium and Methanosarcina Enriched from Bovine Rumen Fluid. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.826-828, mar. 1981.

MELGAÇO, L. A. V. **Uso do fosfogesso como fonte de sulfato para Bactérias Redutoras de Sulfato em um reator contínuo**. 2015.63f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Escola de Minas. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2015.

MEYER, B.; KUEVER, J. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. **Microbiology**, [s.l.], v. 153, n. 7, p.2026-2044, 1 jul. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/003152-0>.

MONTES, D. C.; CHINALIA, F. A.; ALMEIDA, P. F. Monitoramento de bactérias redutoras de sulfato: **Consumo de aceptores de elétrons em condições anóxicas**. Saarbrücken: Novas Edições Acadêmicas. Salvador. 164p, 2015.

MOTTA, A. R. P. et al. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão. **Eng Sanit Ambient**. Salvador, Bahia. v. 18, n. 1, p. 15-26, 2013.

MOREIRA, D. S.; LINS, U. G. C. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA PARA QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO. **Saúde & Amb. Rev**, Duque de Caxias, v. 5, n. 2, p.1-11, dez. 201. Simestral.

MUKHOPADHYAY, A. et al. Salt Stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: an Integrated Genomics Approach. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 188, n. 11, p.4068- 4078, 17 maio 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01921-05>.

MUKHOPADHYAY, A. et al. Cell-Wide Responses to Low-Oxygen Exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 189, n. 16, p.5996-6010, 1 jun. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00368-07>.

MÜLLER, A. L. et al. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi) sulfite reductases. **The Isme Journal**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.1152-1165, 24 out. 2014. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.208>.

MUYZER, Gerard; STAMS, Alfons J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews | Microbiology**, S.l, v. 6, n. 6, p.441-454, jun. 2008.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em: 05 jul. 2015.

NASCIMENTO, A. A. C. et al. **TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE**. 2003.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Disponível em: <http://rbp.fmrp.usp.br/sites/default/files/apostilatd_2005.pdf>. Acesso em: 10 out. 2015.

NERIA-GONZÁLEZ, I. et al. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. **Anaerobe**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.122-133, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.02.001>.

NEMATI, M.; JENNEMAN, G.E.; VOORDOUW, G.. Impact of Nitrate-Mediated Microbial Control of Souring in Oil Reservoirs on the Extent of Corrosion. **Biotechnol. Prog.**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.852-859, 5 out. 2001. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1021/bp010084v>.

NEVES, S. M.N.; GUEDES, R. M.C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 79, n. 4, p.627-632, dez. 2012.

NISHIO, S. R; PELLIZARI, V. H. **Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de cargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa**. 2010. 38f. Tese (Doutorado em Ciências). Pós-graduação em Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas Universidade São Paulo. São Paulo, 2010.

ODOM, J.M.; PECK, H.D. Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.47-50, set. 1981. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1981.tb07609.x>.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111f. Dissertação (Mestre em Microbiologia). Pós-graduação em Microbiologia. Departamento de Biologia. Universidade Aveiro, Portugal, 2010.

ORPHAN, V. J. et al. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 66, n. 2, p.700-711, 1 fev. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.2.700-711.2000>.

PAULINO, L. C. **Estudo de sistemas microemulsionados utilizando água do mar na recuperação avançada de petróleo**. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

PRADA-GAMERO, R. M. et al. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do rio Iriri no canal de Bertioaga (Santos, SP). **Rev. Bras. Ciênc. Solo**,

[s.l.], v. 28, n. 2, p.233-243, abr. 2004. *FapUNIFESP (SciELO)*.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832004000200002>.

PECK, H. D. Phosphorylation coupled with electron transfer in extracts of the sulfate reducing bacterium, *Desulfovibriogigas*. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.112-118, jan. 1966. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(66\)90611-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(66)90611-5).

PELIKAN, C. et al. Diversity analysis of sulfite- and sulfate-reducing microorganisms by multiplexed dsrA and dsrB amplicon sequencing using new primers and mock community-optimized bioinformatics. **Environ Microbiol**, [s.l.], 26 jan. 2016. Wiley- Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13139>

PEREIRA, P. M. et al. Energy metabolism in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: insights from transcriptome analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 93, n. 4, p.347-362, 1 dez. 2007. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-007-9212-0>.

PEREYRA, L. P. et al. Detection and Quantification of Functional Genes of Cellulose- Degrading, Fermentative, and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 76, n. 7, p.2192-2202, 5 fev. 2010. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/aem.01285-09>.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.R; YOUNG, L.Y; KERKHOF, L.J. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (dsrAB) genes. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.145-150, abr. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00798.x>.

PRIMER-BLAST. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Acesso em: 05 jul. 2015.

POSTGATE, J.r. **The sulphate-reducing bacteria**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1979. 151 p.

QUIZLET INC ©. **Microbio Exam 3 Part C (Edit for final exam): Where does the branch occur for the two sulfate reduction pathways?**. 2016. Disponível em: <<https://quizlet.com/32271575/microbio-exam-3-part-c-edit-for-final-exam-flash-cards>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

RAJASEKAR, A. et al. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 85, n. 4, p.1175-1188, 21 out. 2009. Springer Science + Business Media.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2289-9>

RAMOS, C. L. S. **Avaliação da cinética de redução microbiológica de sulfato**. 2013. 71p. *Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)*. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

RAMPINELLI, L.R. **Isolamento e caracterização de uma nova espécie de**

bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina. 2007.85p. *Disser- tação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Pós-Graduação em Recursos Hídricos. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2007.*

RAMSING, N. B. et al. *Distribution of Bacterial Populations in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) Quantified by In Situ Hybridization and Related to Chemical Gradients in the Water Column.* **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 4, p.1391-1404, abr. 1996.

RAMSING, N. B; KUHL, M; JORGENSEN, B. B. *Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes.* **Appl Environ Microbiol**, [s.l.], v. 59, n. 11, p.3840-3849, nov. 1993.

RUIJTER, J. M. et al. *RDML-Ninja and RDMLdb for standardized exchange of qPCR data.* **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-7, 20 jun. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-015-0637-6>.

SAFDAR, A. et al. *Exercise Increases Mitochondrial PGC-1 Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis.* **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 286, n. 12, p.10605-10617, 18 jan. 2011. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m110.211466>.

SAHL, J. W. et al. *Novel Microbial Diversity Retrieved by Autonomous Robotic Exploration of the World's Deepest Vertical Phreatic Sinkhole.* **Astrobiology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.201-213, mar. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ast.2009.0378>.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 3 ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SAMPAIO, F. C.I. **Avaliação da estrutura de comunidade microbiana de bactérias presents em água produzida da indústria de petróleo, através da hibridização fluorescente *in situ*.** 2014. 51f. Monografia (Biotecnologia). Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

SANTOS, G. O. **Aplicação da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para a detecção de *Bacillus ssp.*** 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2011.

SANTOS, S. C. et al. *Crude Glycerol as a Substrate for Sulfate-reducing Bacteria from a Mature Oil Field and its Potential Impact on Souring.* **Journal Of Petroleum Science And Technology: Research Institute of Petroleum Industry (RIPI)**. [s.l.], p. 1-9. 20 fev. 2015.

SANTEGOEDS, C. M. et al. *Structural and Functional Dynamics of Sulfate-Reducing Populations in Bacterial Biofilms.* **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 10, p.3731-3739, out. 1998.

SAVI, C. et al. *Atenuação natural monitorada de hidrocarbontos totais do petróleo (TPH) em águas subterrâneas, estudo de caso*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEIO AMBIENTE SUBTERRÂNEO, 1. 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Biblioteca Nacional, 2009. p. 1 - 16. Disponível em: <https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/21962/14331>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 395 p. SCOW, K. M.; HICKS, A. K. *Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater*. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.246-253, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.009>.

SOUSA, K. A. **Avaliação da biogênese de sulfeto sob diferentes concentrações de bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e nitrato**. 2009. 143f. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

SOUSA, K. A.; CAMMAROTA, M. C.; SÉRVULO, E. F. C. *Efeito da aplicação de nitrato na redução biogênica de sulfeto sob diferentes concentrações iniciais de bactérias redutoras de nitrato e sulfato*. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.273-278, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000200008>.

SOUZA, S. D. et al. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Suprema Gráfica Editora. 2013, cap.2. p.133-185.

STAROSCIK, A. **URI Genomics & Sequencing Center: Calculator for determining the number of copies of a template**. 2004. Disponível em: <<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

STEWART, M; ARNOLD, K. *Produced Water Treating Systems*. In: STEWART, M; ARNOLD, K. **Produced Water Treatment Field Manual**. Canadá: Gulf Professional Publishing, 2011. Cap. 1. p. 1-134.

STROPA, K. C. **Enumeração celular pela quantificação absoluta por PCR em tempo real de culturas de bradimirzóbios**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, 2009.

TANG, Y. et al. *The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester*. **Water Research**, [s.l.], v. 38, n. 10, p.2537-2550, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.012>.

TANG, Y. et al. *Pathway Confirmation and Flux Analysis of Central Metabolic Pathways in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough using Gas Chromatography- Mass Spectrometry and Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 189, n. 3, p.940-949, 17 nov. 2006. American Society for Microbiology.

<http://dx.doi.org/10.1128/jb.00948-06>.

TAYLOR, S. et al. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.1-5, abr. 2010. Elsevier BV. [h ttp://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005](http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005).

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, without competent cells**. 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/450030>>. Acesso em: 03 maio 2016.

TSB- TECHNICAL SUPPORT BULLETIN. **T009. 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers**. 2007. Disponível em: <https://biosci-batzerlab.Biology.lsu.edu/Genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2016.

TORRES, E. S. **Cinética de parâmetros microbiológicos na formação de biofilmes**. 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Processamento, Gestão e Meio ambiente na Indústria de Petróleo e Gás). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química, Rio de Janeiro, 2001.

UNDERWOOD, S. et al. Microbial community structure and methane-cycling activity of subsurface sediments at Mississippi Canyon 118 before the Deepwater Horizon disaster. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, [s.l.], v. 129, p.148-156, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.01.011>.

WANG, J. et al. Integrated Analysis of Transcriptomic and Proteomic Datasets Reveals Information on Protein Expressivity and Factors Affecting Translational Efficiency. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.123-136, 2015. Springer Science + Business Media. http://dx.doi.org/10.1007/7651_2015_242.

WAGNER, M. et al. Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 180, n. 11, p.2975-2982, jun. 1998.

WALKER, C. B. et al. The Electron Transfer System of Syntrophically Grown *Desulfovibrio vulgaris*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 191, n. 18, p.5793-5801, 6 jul. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00356-09>.

WATKINSON, R. J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, [s.l.], v. 1, n. 2-3, p.79-92, 1990. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00058828>.

WEN, J. et al. Chelators enhanced biocide inhibition of planktonic sulfate-reducing bacterial growth. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.1053-1057, 11 dez. 2009. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0269-y>.

WOZNEY, K. M.; WILSON, P. J. Real-time PCR detection and quantification of elephantid DNA: Species identification for highly processed

samples associated with the ivory trade. Forensic Science International, [s.l.], v. 219, n. 1-3, p.106-112, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.12.006>.

VESTER, F; INGVORSEN, K. *Improved Most-Probable-Number Method To Detect Sulfate-Reducing Bacteria with Natural Media and a Radiotracer. Applied And Environmental Microbiology, [s.l.], v. 64, n. 5, p.1700-1707, fev. 1998.*

VIDELA, A. H; HERRERA, L. K. *Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. Research Review: INTERNATIONAL MICROBIOLOGY, [s.l.], v. 8, p.169- 188, abr. 2005.*

VIEIRA, D. S; SERVULO, E. F. C; CAMMAROTA, M. C. *Avaliação da Biodegradação anaeróbia no Tratamento de Água de produção. In: III Encontro ANP/UFRJ dos Programas de Formação de Recursos Humanos para o Setor de Petróleo e Gás, 2003, Rio de Janeiro. III Encontro ANP/UFRJ dos Programas de Formação de Recursos Humanos para o Setor de Petróleo e Gás - Resumos, 2003.*

VON WOLZOGEN KUHR, C.A.H.; VANDER KLUGT, I.S. *The graphitization of cast iron as an electrochemical process in anaerobic solid. Water, v 18, pp. 147– 165. 1934.*

VOORDOUW, G. *The Genus Desulfovibrio: The Centennial. Applied And Environmental Microbiology, [s.l.], v. 61, n. 8, p.2813-2819, ago. 1995.*

YANG, D.y. et al. *Inhibition of the activity of sulfate-reducing bacteria in produced water from oil reservoir by nitrate. Journal: “huan Jing Ke Xue”. [s.l.], p. 319-326. jan. 2014.*

YOUNG-TAE, P; NISHIMURA, M; OHWADA, K. *Detection and Enumeration of Marine Sulfate-reducing Bacteria Using in situ Hybridization with 16S rRNA Oligonucleotide Probes. Fisheries Science, [s.l.], v. 63, n. 1, p.99-104, jun. 1997.*

ZAPATA-PENASCOS, I. et al. *Bisulfite reductase gene expression of thermophilic sulphate-reducing bacteria from saline connate water of oil reservoirs with high temperature. International Biodeterioration & Biodegradation, [s.l.], v. 108, p.198-206, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.029>.*

ZARDA, B. et al. *Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. Archives Of Microbiology, [s.l.], v. 168, n. 3, p.185-192, 8 set. 1997. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s002030050486>.*

ZHANG, X. et al. *Rapid and multiple in situ identification and analyses of physiological status of specific bacteria based on fluorescent in situ hybridization. Journal Of Bioscience And Bioengineering, [s.l.], v. 110, n. 6, p.716-719, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.004>.*

ZWIRGLMAIER, K. *Fluorescence in situ hybridisation (FISH) â“ the next*

generation. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 246, n. 2, p.151-158, maio 2005.
Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.015>.

APÊNDICES

Tabela 11– Diluição seriada do DNA plasmidial do *Desulfovibrio vulgaris*, em que foi utilizando o vetor pCR™ 4-TOPO® TA, com os valores de títulos e concentrações para a confecção da curva padrão em real time qPCR.

Nome	Diluição	Concentração ng/ µL	Fator	Título
Clone DSV3 Amostra de referência para a curva	1 µL DSV3 +9 µL de água milli-Q autoclavada	48,75 ng/ µL	10X	0
Clone DSV3 (10 ⁻¹)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻¹) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,4875 ng/ µL	10X	1
Clone DSV3 (10 ⁻²)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻²) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,0487 ng/ µL	10X	10
Clone DSV3 (10 ⁻³)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻³) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,0048 ng/ µL	10X	100
Clone DSV3 (10 ⁻⁴)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻⁴) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,0004 ng/ µL	10X	1000
Clone DSV3 (10 ⁻⁵)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻⁵) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,00004 ng/ µL	10X	10000
Clone DSV3 (10 ⁻⁵)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻⁵) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,00004 ng/ µL	10X	100000
Clone DSV3 (10 ⁻⁶)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻⁶) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,000004ng/ µL	10X	1000000
Clone DSV3 (10 ⁻⁷)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻⁷) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,0000004ng/ µL	10X	10000000
Clone DSV3 (10 ⁻⁸)	1 µL Clone DSV3 (10 ⁻⁸) +9 µL de água milli-Q autoclavada	0,00000004 ng/ µL	10X	100000000

Fonte: Aatoria própria, 2016.

ANEXOS

Figura 22- Sequência E09-1 DSR1F editada pelo programa da Embrapa (Electropherogram quality analysis)



Fonte: Embrapa, 2016.