



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUIZ LÁZARO FRANCO BATISTA**

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E BIOPRODUTOS  
MICROBIANOS COM POTENCIAL ANTAGONISTA ÀS BACTÉRIAS  
REDUTORAS DE SULFATO**

Salvador - BA

Julho, 2018

**LUIZ LÁZARO FRANCO BATISTA**

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E BIOPRODUTOS  
MICROBIANOS COM POTENCIAL ANTAGONISTA ÀS BACTÉRIAS  
REDUTORAS DE SULFATO**

Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Salvador - BA

Julho, 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Batista, Luiz Lázaro Franco.

Avaliação de substâncias naturais e bioprodutos microbianos com potencial antagonista às bactérias redutoras de sulfato / Luiz Lázaro Franco Batista. - Salvador, 2018.

98 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Chinalia.

Coorientadora: Profa. Dra. Josilene Borges Torres Lima Matos.

Tese (Doutorado - Biotecnologia - Renorbio), Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2018.

1. Biossulfetogênese. 2. Bactérias redutoras de sulfato. 3. Bioprodutos. I. Chinalia, Fábio. II. Matos, Josilene Borges Torres Lima. III. Título.

A TESE:

**“Avaliação de substâncias naturais e bioprodutos microbianos com potencial antagonista às bactérias redutoras de sulfato”**

ELABORADA POR:

**LUIZ LÁZARO FRANCO BATISTA**

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de

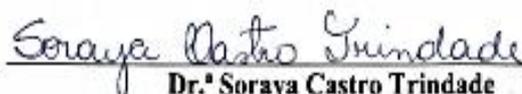
**DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 19 de julho de 2018

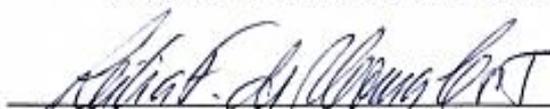
BANCA EXAMINADORA:



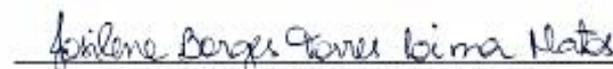
**Dr. Fábio Alexandre Chinalia**  
(Orientador)  
Universidade Federal da Bahia



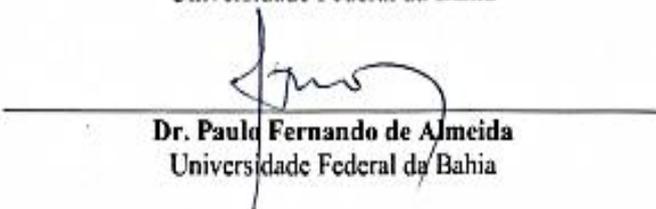
**Dr.ª Soraya Castro Trindade**  
Universidade Estadual de Feira de Santana



**Dr.ª Lilia Ferreira de Moura Costa**  
Universidade Federal da Bahia



**Dr.ª Josilene Borges Torres Lima Matos**  
Universidade Federal da Bahia



**Dr. Paulo Fernando de Almeida**  
Universidade Federal da Bahia

*“Toda dor pode ser suportada se sobre ela puder ser contada uma história.”*

Hannah Arendt

A D'us, à minha família e a grande e eterna amiga Sueli Carvalho.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos professores Paulo Almeida, por deixar abertas as portas do LABEM; a professora Josilene Matos que como sempre foi uma mãe para mim.

Gostaria imensamente de agradecer ao professor Fábio Chinalia, que na reta final conduziu um trabalho com muita maestria e inteligência

Aos meus irmãos de laboratório, Aldinéia Damião e Brena Moitinho e o caçula Pedro Fróes, que muito me ajudaram e me incentivaram a continuar quando eu achava que era o fim, e por me colocarem diante de grandes ideias.

A Fúlvia Sousa, que nas horas dos apertos estava sempre lá com uma palavra de conforto e motivação.

A Marcela Maiana e Flávia Marília que sempre estiveram à disposição para me ajudar nos experimentos.

Quero também agradecer a toda equipe do LABEM e do Moura Costa em especial: Leila Sousa, Roberta Santoro, Tatiana Oliveira, Gabriela Rodrigues entre outros, que de alguma forma me ajudaram a realizar esse trabalho.

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

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

Porém nada desse trabalho teria sentido se não fosse feito para ela, que tanto me ajudou, pesquisou e lutou lado a lado comigo para juntos superarmos todos os obstáculos que a vida colocou em nosso caminho. Sú esse trabalho não é só meu, é seu também, acho que mais seu do que meu. Em tua homenagem eu terminei a nossa tese.

**SHALOM**

*Ex nihilo nihil fit*

Batista, Luiz Lázaro Franco. Avaliação de substâncias naturais e bioprodutos microbianos com potencial antagonista às bactérias redutoras de sulfato. 98f.: il. 2018. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018

## RESUMO

As Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são responsáveis pela corrosão de tubos de metal e estruturas em estações de petróleo, devido à produção de sulfeto de hidrogênio, um fenômeno denomina de acidificação do óleo (*souring*). Para inibir a ação dessas bactérias, o glutaraldeído tem sido utilizado em poços de petróleo como biocida de forma sistemática, mas seu uso tem alguns inconvenientes à saúde humana e ao meio ambiente. A obtenção de novas moléculas através do processo de modelagem molecular (Docagem), a utilização de óleos essenciais além dos bioprodutos, vem se tornando uma alternativa promissora devido à grande aplicabilidade e aceitação ecológica. Essas substâncias foram utilizadas na inibição do crescimento de BRS. Os resultados obtidos foram bastantes promissores, utilizando como modelo a atividade da enzima desidrogenase. O óleo essencial de melaleuca mostrou um índice de inibição de 50% da atividade à uma concentração de 0,1%; o óleo de alecrim 0,4%; o liofilizado da cepa BCGP-01, apresentou inibição de 50% da atividade desidrogenase à uma concentração de 100ug/ml e o liofilizado da cepa LV-01 à uma concentração de 200ug/ml; as moléculas obtidas por docagem: o ácido oxálico e o HEDTA apresentaram redução da atividade desidrogenase em 50% nas concentrações de 265ug/ml e 125ug/ml respectivamente. Os resultados surgem como alternativas na busca de novos compostos com potencial antimicrobiano permitindo ensaios que possibilitam a criação de uma nova estratégia no controle microbiano em ambientes industriais. Diante do exposto, o presente trabalho tem finalidades: a detecção e quantificação e identificação de BRS em amostras de água produzida, de modo a avaliar inibição microbiana sobre a ação de compostos naturais obtidos através de dinâmica molecular e bioprodutos de origem vegetal e microbiana.

**Palavras-chave:** Biossulfetogênese, BRS, bioprodutos.

Batista, Luiz Lázaro Franco. Evaluation of natural substances and microbial bioproducts with potential antagonist to sulfate reducing bacteria. 98f: il. 2018. Thesis (Doctorate). Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2018.

### **ABSTRACT**

Sulphate reducing bacteria (SRB) are responsible for the corrosion of metal pipes and structures at oil stations due to the production of hydrogen sulfide, a phenomenon called souring. To inhibit the action of these bacteria, glutaraldehyde has been used in petroleum wells as a biocide in a systematic way, but its use has some drawbacks to human health and the environment. Obtaining new molecules through the process of molecular modeling (*Docking*), the use of essential oils in addition to bioproducts, has become a promising alternative due to the great applicability and also due to the ecological acceptance. These substances were used in inhibiting the growth of BRS. The results obtained were quite promising, using as model the activity of the enzyme dehydrogenase. Melaleuca essential oil showed an inhibition index of 50% of the activity at a concentration of 0.1%; rosemary oil 0.4%; the freeze-dried strain BCGP-01 showed 50% inhibition of the dehydrogenase activity at a concentration of 100 ug / ml and the lyophilizate of the LV-01 strain at a concentration of 200 ug / ml; The results appear as alternatives in the search for new compounds with an antimicrobial potential allowing tests that allow for the production of antimicrobial agents. creation of a new strategy in microbial control in industrial environments. In view of the above, the present work has the following objectives: the detection and quantification and identification of BRS in samples of water produced in order to evaluate microbial inhibitions on the action of natural compounds obtained through molecular dynamics and bioproducts of vegetal and microbial origin.

**Key words:** Biosulfetogenesis, SRB, bioproducts.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo. ....	20
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da ativação do sulfato como acceptor de elétrons pela APS-Redutase. ....	26
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da transferência de elétrons na redução dissimilativa do sulfato, com compostos carbônicos como fonte de energia e sulfato como acceptor de elétrons. ....	26
<b>Figura 4.</b> Fluxograma do teste de inibição em placas por sobrecamada. ....	48
<b>Figura 5.</b> Crescimento de BRS, água produzida, campo Taquipe. ....	50
<b>Figura 6.</b> NMP do inóculo para a realização dos testes com inibidores. ....	51
<b>Figura 7.</b> Contagem direta de células obtidas com a análise das amostras A e B de água produzida. O método utilizado foi o DAPI/FISH. ....	56
<b>Figura 8.</b> Árvore filogenética de distância (Neighbour Joining) comparando um segmento de 669 pb do 16S rRNA da Cepa BCGP-01 com as sequencias “tipo” obtidas no site “Silva RNA Database”. O alinhamento e análise de distância foi executado utilizando o programa MEGA IV, Kimura 2-parametros e bootstrap de 1000 repetições (valores, em percentagens, que são mostrados nas junções). A árvore foi enraizada utilizando as sequencias de <i>T. ammonificans</i> e <i>T. ruber</i> . ....	61
<b>Figura 9.</b> Índice de emulsificação das cepas LV-01 e BCGP-01. ....	63
<b>Figura 10.</b> Teste de antagonismo em placas por sobrecamada das cepas contra a cepa <i>Desulfovibrio</i> spp. ....	65
<b>Figura 11.</b> Efeito da ação inibitória do caldo livre de células do cultivo de BCGP-01 na atividade da desidrogenase de uma cultura mista de BRS que também foram isoladas de poço maduro de petróleo. ....	67
<b>Figura 12.</b> Efeito da ação inibitória do caldo livre de células do cultivo da cepa LV-01 na atividade da desidrogenase de uma cultura mista de BRS que também foram isoladas de poço maduro de petróleo. ....	68
<b>Figura 13.</b> Redução exponencial da atividade DH do OEM. ....	69
<b>Figura 14.</b> Redução exponencial da atividade DH do OEA. ....	70
<b>Figura 15.</b> Comparação da atividade desidrogenase OEA x OEM. ....	71
<b>Figura 16.</b> Resultado do teste de superfície de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de óleo (%OEM, v/v) e a concentração de etanol (% v/v). ....	73
<b>Figura 17.</b> Gráfico de contorno de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de óleo (%OEM, v/v) e a concentração de etanol (% v/v). ....	73
<b>Figura 18.</b> Gráfico normal dos efeitos padronizados mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de óleo (%OEM, v/v) e a concentração de etanol (% v/v). ....	74
<b>Figura 19.</b> Redução exponencial da atividade DH do ácido oxálico. ....	76

<b>Figura 20.</b> Redução exponencial da atividade DH do HEDTA.....	77
<b>Figura 21.</b> Avaliação da atividade desidrogenase. ....	78
<b>Figura 22.</b> Resultado do teste de superfície de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de Ácido Oxálico (w/v) e a concentração de HEDTA(w/v). ....	79
<b>Figura 23.</b> Gráfico de contorno de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de Ácido Oxálico (w/v) e a concentração de HEDTA (w/v). ....	80
<b>Figura 24.</b> Número de patentes sobre o tema do trabalho depositadas por banco de dados. ....	81
<b>Figura 25.</b> Número de patentes depositadas sobre o tema do trabalho por período. ....	82
<b>Figura 26.</b> Distribuição percentual dos detentores de patentes relacionadas à tecnologia pesquisada.....	82
<b>Figura 27.</b> Distribuição do número de patentes sobre o tema do trabalho depositadas por país de 1990-2017. ....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores da docagem para a enzima APS-redutase. ....	36
<b>Tabela 2.</b> Sequência das sondas para RNAr 16s utilizadas. ....	42
<b>Tabela 3.</b> Tabela de combinação concentração/volume dos inibidores. ....	51
<b>Tabela 4.</b> Grupos para classificação de patentes utilizados na prospecção. ....	53
<b>Tabela 5.</b> Quantidade patentes por grupo de classificação. ....	54
<b>Tabela 6.</b> Valores de Eh/pH encontrados nas amostras de água produzida. ....	58
<b>Tabela 7.</b> Perfil ecofisiológico das amostras de água. ....	59
<b>Tabela 8.</b> Resultado do auxanograma para a cepa LV-01. ....	60
<b>Tabela 9.</b> Resultado do zimograma para a cepa LV-01. ....	60
<b>Tabela 10.</b> Resultado do auxanograma para o nitrogênio da estirpe LV-01. ....	60
<b>Tabela 11.</b> Redução da Atividade desidrogenase pelas cepas BCGP-01 e LV-01. ....	67
<b>Tabela 12.</b> Planejamento fatorial 2x2 dos ensaios com OEM/etanol. ....	72
<b>Tabela 13.</b> Ação do ácido oxálico isolado e, em combinação, frente aos BRS. ....	75
<b>Tabela 14.</b> Planejamento fatorial 2x2 dos ensaios com HEDTA/Ác. oxálico. ....	79

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. Específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. O poço de petróleo e a água produzida</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Ecologia microbiana de poços de petróleo</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3. As bactérias redutoras de sulfato - BRS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4. A redução biológica do enxofre e a <i>APS-redutase</i> - A biossulfetogênese</b> .	<b>25</b>
<b>3.5. Biocorrosão</b> .....	<b>27</b>
3.5.1. Biofilmes .....	28
3.5.2. Metabólitos corrosivos .....	28
3.5.3. Despolarização catódica .....	29
<b>3.6. Biocidas convencionais</b> .....	<b>29</b>
3.6.1. Glutaraldeído .....	29
<b>3.7. Bioprocessos e bioprodutos</b> .....	<b>30</b>
<b>3.8. Óleos essenciais</b> .....	<b>33</b>
3.8.1. óleo essencial de melaleuca .....	33
3.8.2. óleo essencial de alecrim .....	34
<b>3.9. Biocidas não convencionais - análogos de sulfato</b> .....	<b>35</b>
3.9.1. Ácidos Orgânicos .....	36
3.9.1.1. Ácido gálico .....	36
3.9.1.2. Ácido salicílico .....	37
3.9.1.3. Ácido oxálico .....	37
3.9.2. Quelantes análogos de sulfato .....	38
3.9.2.1. HEDTA .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1. Local do estudo</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2. Detecção e quantificação micro-organismos sulfetogênicos</b> .....	<b>41</b>
4.2.1. Contagem direta de células - DAPI/FISH .....	41
<b>4.3. Determinação de parâmetros físico-químicos (Eh/pH)</b> .....	<b>42</b>
<b>4.4. Perfil ecofisiológico da água produzida de Taquipe</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5. Identificação dos micro-organismos</b> .....	<b>43</b>
4.5.1. Cepa LV-01 .....	43
4.5.2. Cepa BCGP-01 .....	44
4.5.2.1. Extração de DNA .....	44
4.5.2.2. Reação de PCR .....	45
4.5.2.3. Reação de sequenciamento .....	45
<b>4.6. Produção de bioprodutos com atividade antimicrobiana</b> .....	<b>46</b>
4.6.1. Índice de emulsificação (E24) .....	46

4.6.2. Tensão superficial .....	47
4.6.3. Atividade antimicrobiana .....	47
4.6.3.1. teste de inibição em placa .....	47
4.6.3.2. Teste de inibição em caldo .....	49
<b>4.7. Ensaio com os inibidores .....</b>	<b>50</b>
4.7.1. Padronização do inóculo .....	50
4.7.2. Teste qualitativo com os inibidores .....	51
4.7.3. Teste de toxicidade aguda contra a atividade da desidrogenase .....	52
<b>4.8. Prospecção tecnológica .....</b>	<b>52</b>
<b>4.9. Análise estatística .....</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Detecção e quantificação micro-organismos sulfetogênicos .....</b>	<b>56</b>
5.1.1. Contagem direta de células - DAPI/FISH .....	56
<b>5.2. Determinação de parâmetros físico-químicos (Eh/pH) .....</b>	<b>57</b>
<b>5.3. Perfil ecofisiológico - água produzida Taquipe .....</b>	<b>58</b>
<b>5.4. Prospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico .....</b>	<b>59</b>
<b>5.5. Identificação dos micro-organismos .....</b>	<b>59</b>
5.5.1. Cepa LV-01 .....	59
5.5.2. Cepa BCGP-01 .....	61
<b>5.6. Produção de bioprodutos .....</b>	<b>62</b>
5.6.1. Índice de emulsificação (E24) .....	62
5.6.2. Análise da tensão superficial .....	63
5.6.3. Atividade antimicrobiana .....	65
5.6.3.1 Teste em placa .....	65
5.6.3.2. Teste de toxicidade aguda por desidrogenase utilizando caldo livre de células (BCGP-01 e LV-01) .....	66
<b>5.7. Teste de toxicidade aguda contra a atividade da desidrogenase utilizando óleos essenciais .....</b>	<b>68</b>
5.7.1. Testes de toxicidade da desidrogenase com óleo essencial de melaleuca (OEM) .....	68
5.7.2. Teste de toxicidade da desidrogenase com óleo essencial de alecrim (OEA) .....	69
5.7.3. Teste de toxicidade aguda da desidrogenase para avaliar a interação OEM e etanol .....	72
<b>5.8. Testes de toxicidade aguda para desidrogenase com inibidores análogos de sulfato .....</b>	<b>75</b>
5.8.1. Ácido oxálico e HEDTA .....	76
5.8.2. Teste de toxicidade aguda da desidrogenase para avaliar a interação entre HEDTA e Ác. oxálico. ....	78
<b>5.9. Prospecção tecnológica .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de petróleo enfrenta problemas associados à presença de gás sulfídrico, que é tóxico e corrosivo, no processo de produção de óleo e gás. Uma das fontes de produção desse gás é a biosulfetogênese, que ocorre devido à presença de bactérias redutoras de Sulfato (BRS) nos poços de petróleo. A produção de sulfeto constitui sério problema econômico para a indústria de petróleo, já que afeta os sistemas de produção, transporte e armazenamento de óleos e a qualidade do petróleo produzido, além de risco para a saúde dos trabalhadores (KJELLERUP et al., 2005; HUPERT; VOORDOUW, 2007; ZHANG, 2010).

A reinjeção de água (recuperação secundária), consiste em adicionar água, nesse caso do mar, para aumentar a pressão do poço. Os maiores problemas associados à reinjeção de água para recuperação secundária de petróleo são o controle da corrosão e a minimização da produção de sulfeto de hidrogênio no reservatório. Esses processos corrosivos em sistemas de injeção de água podem ser tanto de natureza química (presença de oxigênio e produtos corrosivos) quanto induzida por micro-organismos (PENNA et al., 2002; MOTTA, 2013). O fenômeno de produção microbiológica de sulfeto ( $H_2S$ ), é conhecido há mais de 70 anos e sabe-se que sua presença no poço de petróleo pode causar tamponamento dos reservatórios, corrosão metálica dos equipamentos e toxicidade para os trabalhadores (EKINS et al., 2007).

Alguns estudiosos acreditam que os BRS foram introduzidos neste ambiente juntamente com a água de injeção que é utilizada na recuperação secundária do óleo, uma vez que, os efeitos da presença de BRS em poços de petróleo são mais intensos quando é utilizada a água do mar para aumentar a recuperação do óleo (BENKACOKER et al., 1995; BAO et al., 2009). Isto acontece, pois, a água do mar é rica em sulfatos, aumentando a concentração desse ânion no meio, favorecendo o crescimento desses micro-organismos. A teoria mais aceita, no entanto, é que eles sejam indígenas autóctones dos reservatórios. Esses ambientes apresentam grande quantidade de óleos parafínicos, oferecendo as cadeias simples de carbono necessárias para o crescimento microbiano (BAO et al., 2009).

O estudo da ecologia microbiana dos sistemas de distribuição óleo e água na indústria de petróleo, tradicionalmente foi baseado na cultura de organismos a partir

de amostras de água em massa. O desenvolvimento e aplicação de métodos moleculares forneceu novas ferramentas para examinar a diversidade microbiana e atividade de amostras ambientais, produzindo novos insights sobre a comunidade microbiana e sua diversidade dentro desses ecossistemas e criando uma nova área da ciência, a Ecologia Molecular. O advento das técnicas moleculares permitiu a caracterização de comunidades microbianas naturais sem a necessidade de cultivar micro-organismos e introduziu novas informações sobre ecologia microbiana de diferentes ambientes (KAHLISCH et al., 2012). Dentre essas técnicas a hibridização fluorescente *in situ* merece destaque quando se trata de uma microbiota onde as técnicas convencionais de cultivo não obtém êxito, como no caso das bactérias redutoras de sulfato (KAHLISCH et al., 2012).

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é constituída por diversos micro-organismos, destacando-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS) devido a sua relevância nos problemas associados à biocorrosão: constituição do biofilme promotor e a formação do nódulo de corrosão (NEUMANN, 2012). As BRS têm como importante característica a capacidade de degradação anaeróbia da matéria orgânica, através da redução do sulfato a sulfeto, tendo como uns dos produtos finais o  $H_2S$ , provocando a acidificação dos reservatórios (*souring*) e o desenvolvimento da biocorrosão. Esses micro-organismos são apontados como os principais responsáveis pela biocorrosão de materiais de ferro e aço na indústria de petróleo, gerando um custo elevado na manutenção de equipamentos e metais usados (BØDTKER et al., 2009; CORTEZ, 2009).

Os biocidas não-oxidantes tais como glutaraldeído, diaminas, e compostos quaternários de amônio, são utilizados para reduzir a atividade microbiana em instalações de produção de petróleo (GARDNER; STEWART, 2002; YANG et al., 2014). Os efeitos positivos destes tratamentos são normalmente dependentes de condições do reservatório, tais como: a temperatura; a permeabilidade e a composição química da água produzida. Casos de resistência a esses biocidas após uso prolongado também já foram descritos (GARDNER; STEWART, 2002). Além disso, estas substâncias podem trazer riscos para trabalhadores e ao meio ambiente, necessitando em alguns casos, medidas de controle alternativas.

Para evitar os problemas que resultam da utilização do glutaraldeído nos poços de petróleo, uma opção interessante seria a utilização de micro-organismos e/ ou seus bioprodutos para promover a inibição das BRS (seja por atividade antimicrobiana, seja

por inativação enzimática). Neste sentido, sabe-se que muitos micro-organismos produzem substâncias químicas como resultado do seu metabolismo primário e secundário (BANAT, 2000). No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor, mas são derivados dos seus precursores de energia, gerada através do metabolismo primário. Estes compostos naturais produzidos podem ser alcalóides, terpenóides, aromáticos e glicosídeos descobertos (BANAT, 2000; MELO; AZEVEDO, 1998; OLIVEIRA et al., 2011; GOMAA, 2012).

Outra alternativa é a utilização de substâncias que competem com o sulfato nos sítios de ligação da enzima *APS-redutase*, uma enzima chave na redução do sulfato a sulfeto. (MAGALHÃES, 2014). Alguns desses compostos podem ser obtidos por ensaio de dinâmica molecular (*docking*), que permite prever possíveis pontos de ligação da substância com a enzima alvo (SANTOS et al., 2013).

Neste escopo, a busca por métodos alternativos no controle da atividade das BRS e, conseqüentemente, da geração de H<sub>2</sub>S biogênico, de modo a prevenir a corrosão microbiologicamente induzida, em substituição aos de biocidas como glutaraldeído vem ganhando importância. Diante do exposto, se faz necessário pelos BRS em reservatórios de petróleo, através de novas tecnologias tais como: o uso de compostos quelantes; e/ou novos produtos como óleos essenciais, assim bioprodutos microbianos que tenham poder de agir no controle desses micro-organismos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- ✓ Avaliar o potencial de substâncias antimicrobianas não convencionais no controle da produção biológica de sulfeto em poços maduros.

### **2.2. Específicos**

- ✓ Detectar e quantificar e os micro-organismos sulfetogênicos presentes nas amostras de água produzida que foram coletadas dos campos de petróleo pré-selecionados;
- ✓ Identificar e caracterizar o perfil ecofisiológico de bactérias redutoras de sulfato isoladas da água produzida
- ✓ Isolar e identificar microrganismos com potencial biotecnológico isolados de amostra de água produzida
- ✓ Testar o potencial de agentes antimicrobianos não convencionais para a indústria do petróleo como os óleos essenciais, evidenciando seu potencial de ação e de interação (sinergia) com solvente de diluição alcoólicos (etanol)
- ✓ Testar o potencial de agentes antimicrobianos como o ácido oxálico e HEDTA, demonstrando seu potencial de ação e de interação (sinergia)

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O poço de petróleo e a água produzida

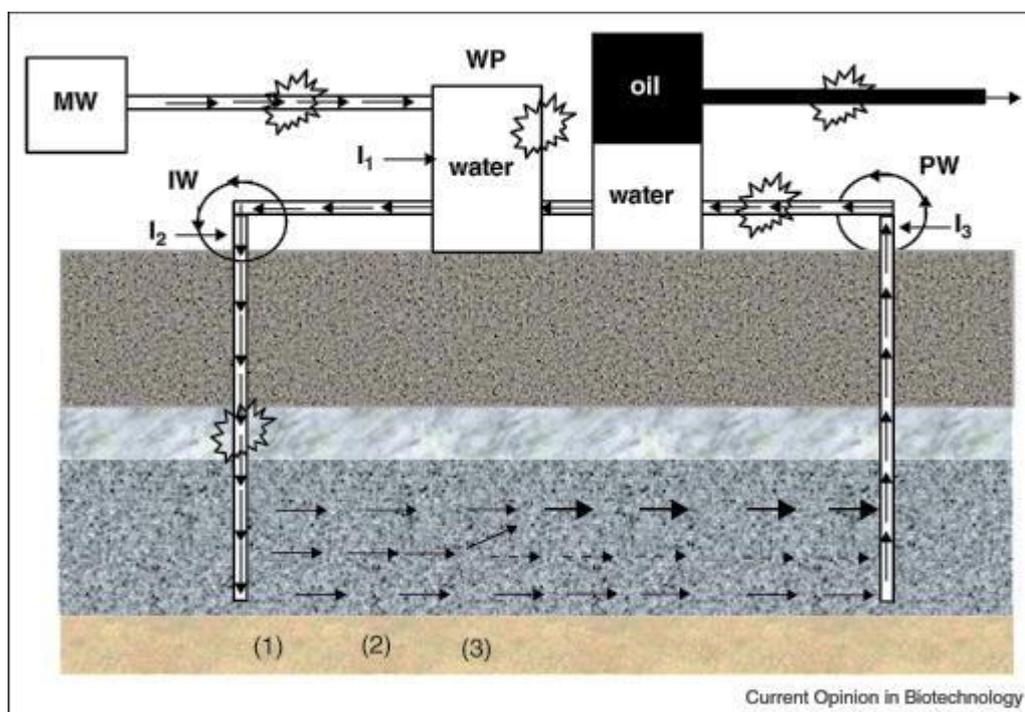
Originado da transformação de grandes deposições fósseis, o petróleo é uma mistura com composição variável de compostos orgânicos, predominantemente hidrocarbonetos. Esta composição varia amplamente em função das características geoquímicas, tipo e qualidade da matéria orgânica original, grau de evolução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

Na exploração e produção de petróleo, a água está presente na rocha juntamente com o petróleo e o gás natural. Estes fluidos estão separados em camadas. O mais denso, a água, fica usualmente na parte inferior da rocha, sobre ela o petróleo e acima deste, o gás. É comum a injeção de água no reservatório para manter a pressão e auxiliar o fluxo do petróleo para a superfície. A água a ser injetada na rocha pode ser doce, salgada ou aquela produzida juntamente com o óleo depois de separada.

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

produzida é a injeção no próprio poço, sendo a injeção simplesmente um processo de disposição ou parte de um projeto de recuperação secundária (Figura 1) (EKINS et al., 2007).

**Figura 1.** Esquema do processo de recuperação secundária do petróleo.



Fonte: Voordouw, p. 403 (2011).

Amostras de água produzida são geralmente usadas para cultivo microbiano e posteriores estudos. Culturas obtidas dessas amostras são verdadeiros enigmas, pois a certeza da comunidade microbiana nativa não pode ser confirmada devido a alguns problemas na obtenção das amostras: são introduzidos micro-organismos no reservatório durante o processo de perfuração; amostras são frequentemente obtidas de reservatórios inundados e a injeção de água contendo nutrientes, favorece o crescimento de micro-organismos não indígenas, conduzindo mudanças dentro da comunidade microbiana do poço (MAGOT, 2005; HUSSAIN, 2016).

### 3.2. Ecologia microbiana de poços de petróleo

O campo petrolífero consiste em um ecossistema rico em compostos orgânicos, que favorecem o crescimento microbiano, porém com condições adversas. Múltiplos grupos de micro-organismos com diversas habilidades fisiológicas e metabólicas e ligações filogenéticas têm sido recuperados de reservatórios de petróleo. A presença de comunidades microbianas indígenas em reservatórios é atualmente um fato científico bem estabelecido e tem mostrado a ocorrência de diversas comunidades de bactérias e arqueas (YOUSSEF et al., 2007). Dessa forma, é óbvio que muitos micro-organismos se adaptaram às essas condições ambientais desses ecossistemas, especificamente temperatura, disponibilidade de oxigênio e pressão (VARJANI; GNANSOUNOUB, 2017).

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são relatados como indígenas de ecossistemas petrolíferos. As primeiras BRS foram isoladas da água de produção (BASTIN, 1926). As bactérias redutoras de sulfatos foram reconhecidas como contribuintes para a corrosão em sistemas de distribuição de água, campos e sistemas de petróleo e gás, bem como a acidificação do reservatório (LI et al., 2010; DAVIDOVA et al., 2012; ZHAO et al., 2005). Principais processos microbianos prevalecendo em ecossistemas de campos de petróleo e hidrocarbonetos de petróleo impactados ambientes são redução de sulfato, fermentação, acetogênese e metanogênese, redução de nitrato, redução de ferro e manganês (LV et al., 2016; ZHAO et al., 2005).

Madigan et al. (2010), relataram *Desulfotomaculum* spp. como gêneros bacterianos gram-positivos, porém a maioria de gêneros BRS são relatados como Gram negativos, sendo as BRS mesófilas mais frequentemente isolado de reservatórios de produção de petróleo e de água produzida, merecendo destaque o gênero *Desulfovibrio* spp. (MAGOT, 2005; HUSSAIN et al., 2016).

O reservatório de petróleo assim como a água produzida contida nele, nos reserva uma grande diversidade microbiana, porém, apesar do grande número de micro-organismos já isolados e caracterizados, o cultivo de representantes dessa microbiota nativa consiste em um desafio significativo (MAGOT, 2005; BEERSTECHEER, 2013). Os métodos comumente utilizados (métodos microbiológicos baseados em cultivo), acessam somente uma pequena parte das comunidades presentes no reservatório. Alguns dos parâmetros de seletividade para isolamento de

culturas representativas do reservatório de petróleo são: pH, salinidade, pressão, condições redox e temperatura (ORPHAN et al., 2000; BEERSTECHEER, 2013).

O conhecimento dos micro-organismos presentes nos ecossistemas dos reservatórios de petróleo; suas propriedades fisiológicas e biológicas ajudam na elucidação de várias demandas com relação à produção e qualidade do óleo produzido e de uma estratégia de exploração bem-sucedida. A compreensão da microbiologia do campo petrolífero de petróleo pode ser usada para melhorar a recuperação de petróleo, na solução de problemas com *souring* e corrosão já que os micro-organismos reservatórios de óleo produzem vários metabólitos como: gases, ácidos, solventes, biopolímeros e biossurfactantes (VARJANI; GNANSOUNOUB, 2017).

As estratégias de isolamento devem levar em consideração os parâmetros ambientais supracitados e devem refletir as condições *In Situ* do reservatório de petróleo, coisa muito difícil de manter ou então muito dispendiosa. Entretanto, os estudos em ecologia microbiana avançaram rapidamente com a introdução das técnicas moleculares de rDNA baseadas no ribossomo 16S, tornando possível a detecção e caracterização de muitas comunidades microbianas (ORPHAN et al., 2000)

A hibridização *In Situ* fluorescente (FISH) é uma das muitas técnicas moleculares utilizadas no estudo de diversidade e estrutura de comunidades microbianas não-cultiváveis (AMANN, 1992; SANTOS et al., 2010; BATISTA, 2013). Utilizando-se das técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), associada à técnica de FISH, foi possível desenhar sequências para vários grupos microbianos de importância ecológica relacionados aos reservatórios de petróleo (AMANN et al., 1992; MANZ et al., 1992).

Em um estudo conduzido por Orphan e colaboradores (2000), foi elaborada uma biblioteca de sequências de 16S, que continha uma diversidade enorme de micro-organismos oriundos de amostras de água de produção de reservatórios de petróleo com temperatura entre 70-75°C. Nesse estudo foram encontrados 83 clones únicos dos 480 clones triados, sendo que apenas 8,8% era pertencente ao domínio *Archaea* e 0% de representantes do domínio *Eukarya*. Do domínio *Bacteria*, foram encontrados: alfa, gama e delta proteobacterias, além de bactérias Gram positivas com baixo teor de G+C. Hoje sabemos que esses micro-organismos do reservatório, apresentam uma série de interações ecológicas com relação à degradação da matéria

orgânica existente no reservatório (FOWLER et al., 2012; BEERSTECHEER, 2013; BIAN et al., 2015; FARIAS, 2016; LIANG et al., 2016).

Em um ambiente muito competitivo, os micro-organismos desenvolveram estratégias para sobreviver, as chamadas estratégias r e K. Os micro-organismos que seguem a estratégia r se reproduzem depressa enquanto o ambiente está rico em substrato, apresentando altas taxas de crescimento específico e altas constantes de saturação do substrato. Já os micro-organismos que seguem a estratégia K, apresentam baixo crescimento específico e baixas constantes de saturação do substrato, sendo esses micro-organismos os mais estáveis dentro da comunidade microbiana, e os predominantes no reservatório de petróleo (MAGOT, 2005; FOWLER et al., 2012; BEERSTECHEER, 2013; BIAN et al., 2015).

### **3.3. As bactérias redutoras de sulfato - BRS**

O metabolismo anaeróbio é uma conquista das bactérias e representa um grande salto evolutivo no que diz respeito a exploração de novos nichos. O metabolismo anaeróbio apresenta uma diversidade muito grande de vias que possibilitam a vida em ausência de oxigênio, tais como redução de radicais oxidados (nitrato e sulfato), assim como a oxidação de metais como ferro e manganês (ZARASVAND; RAVISHANKAR 2014; ENNING et al., 2012; HUSSAIN et al., 2016; OKORO et al., 2017). A redução desassimilatória de sulfato realizada por micro-organismos é uma importante atividade metabólica em muitos ambientes com potencial redox baixo (reduzido) como sedimento marinho, aquíferos contaminados, terrenos alagados, etc. Esta atividade é mediada por diversos grupos de bactérias redutoras de sulfato.

As Bactérias redutoras de sulfato (BRS) foram os primeiros micro-organismos recuperados de ecossistemas de reservatórios de petróleo (Bastin, 1926). Hussain et al. (2016), relataram que até agora mais de 220 espécies de 60 gêneros de BRS em óleo de petróleo foram descritas. As BRS são parcialmente classificadas em quatro diferentes filos bacterianos e dois Archaea. Os filos bacterianos são os seguintes: Proteobactérias; Firmicutes; Nitrospira; Termodesulfobacterium (HUSSAIN et al., 2016; MADIGAN et al., 2010; OKORO et al., 2017).

Outros são classificados em filos dentro do domínio Archaea, Euryarchaeota gênero *Archaeoglobus* e Crenarchaeota gêneros *Thermocodium* spp. e *Calditerrivita* spp. (HUSSAIN et al., 2016; MADIGAN et al., 2010;). Dentro desse grupo merecem destaque alguns gêneros de bactérias tais como: *Desulfobacter* spp., *Desulfobulbus* spp., *Desulfonema* spp., *Desulfovibrio* spp., *Desulfobaculum* spp. e *Desulfosporosinus* spp. (CASTRO et al., 2000; TANG et al., 2009; VARJANI; GNANSOUNOUB, 2017).

Estes micro-organismos usam como fonte de carbono, compostos diversos: hidrocarbonetos aromáticos, n-alcanos, ácidos graxos e produtos orgânicos polares formados de bactérias aeróbias a partir de carboidratos, além de ácidos graxos voláteis e compostos orgânicos de cadeia curta como lactato e acetato, achados naturalmente em poços de gás natural e petróleo (MAGOT, 2005; TANG et al., 2009; OYEKOLA et al., 2012).

O metabolismo energético das bactérias redutoras de sulfato é conduzido em ambientes cujo potencial de oxirredução se encontre na faixa de -150 a -200 mV, uma vez que esses micro-organismos não necessitam de cofatores da cadeia transportadora de elétrons cujas formas estáveis só são encontradas em valores de potencial redox positivos. Sendo assim, um dos pré-requisitos para o cultivo e crescimento de bactérias redutoras de sulfato é o baixo potencial de oxirredução do ambiente, em torno de -100mV (inicialmente) (VOORDOUW, 2001; DAVIDOVA, 2012).

De modo mais frequente a presença dos BRS está associada a uma ampla disponibilidade de sulfato, geralmente presente em ambientes naturais e na indústria, a exemplo de ambientes como: solo de mangue, sedimentos marinhos, águas em estações de tratamento, lagos permanentemente congelados, em campos e reservatórios de petróleo, dentre outros (GIEG et al., 2011; MUYZER; STAMS, 2008; RAJASEKAR et al., 2010; VARJANI; GNANSOUNOUB, 2017).

Dentre os gêneros de BRS, o mais estudado é o gênero *Desulfovibrio*, comum em habitats aquáticos ou solos encharcados, contendo matéria orgânica em abundância e concentrações suficientes de sulfato. Esse gênero possui grande importância na indústria do petróleo, pois está associada a corrosão microbiologicamente influenciada de tubulações metálicas de campos de petróleo (MADIGAN et al., 2010; MAGOT, 2005; TORTORA et al., 2012; ENNING et al., 2012).

### 3.4. A redução biológica do enxofre e a *APS-redutase* - A biossulfetogênese

Na natureza, os compostos nitrogenados e sulfurados são continuamente sintetizados, degradados e convertidos em outras formas. O metabolismo destes compostos tem muito em comum, pois ambos os elementos podem ser utilizados pelos micro-organismos em vários estados de valência, desde estados mais reduzidos (amônia/sulfeto de hidrogênio) a estados mais oxidados (nitrato/sulfato). As formas reduzidas ( $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  e  $\text{S}$ ) podem ser utilizadas como doadores eletrônicos na formação aeróbia de energia e na fixação de dióxido de carbono no escuro. As formas oxidadas ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2^-/\text{SO}_4^-$ ,  $\text{S}_0$ ) servem como aceptores de elétrons na respiração anaeróbia.

A redução biológica do enxofre está associada à respiração anaeróbia do sulfato, havendo armazenamento de energia celular a partir da oxidação de um substrato orgânico (MADIGAN et al., 2010). Na respiração anaeróbia, compostos orgânicos ou hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) são oxidados, havendo transferência de elétrons através de um complexo enzimático celular, conhecido como cadeia respiratória, até um acceptor inorgânico, que não o oxigênio (MUYZER; STAMS, 2008; WIDDEL, 1988). No metabolismo biológico, o sulfato é transportado para o interior da célula através da membrana citoplasmática. O complexo enzimático responsável pela transferência de elétrons na respiração está localizado no citoplasma celular e na membrana interna da célula (CYPIONKA, 1995). O processo biológico de produção de sulfeto a partir da redução do sulfato é chamado de “redução desassimilatória do sulfato”.

O transporte do sulfato transmembrana, ocorre comumente a partir de um gradiente iônico, havendo evidências para um sistema de troca iônica com  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ , a partir de um gradiente de sódio ao longo da membrana celular dos BRS (CYPIONKA & KONSTANZ, 1989). Neste processo não há gasto energético, contudo, quando em baixas concentrações de sulfato no meio, moléculas de ATP podem ser consumidas para produzir um gradiente iônico favorável para o transporte de sulfato (CYPIONKA, 1995). A ativação do sulfato citoplasmático ocorre a partir da sua fosforilação pela enzima *ATP sulfurilase* (uma fosforilação ao nível do substrato), havendo produção de adenosina 5'-fosfosulfato (APS), também conhecida como adenilsulfatase (KRAMER; CYPIONKA, 1989). Neste processo, há consumo de um mol de ATP por mol de sulfato ativado, e produção de pirofosfato. O caráter anaeróbio dos BRS pode



introduzidas por operações de perfuração e pela recuperação secundária do petróleo (ALMEIDA et al., 2006).

### 3.5. Biocorrosão

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

A biocorrosão é um processo complexo de deterioração de materiais geralmente metálicos, promovido pela atividade de diversos micro-organismos, em consequência do seu crescimento e metabolismo, resultado da ação dos processos biológicos que ocorrem no interior do biofilme e eletroquímicos que ocorrem na interface deste com o metal, tendo por consequência a sua degradação (BEECH, 2004; VIDELA, 2002; VIGNERON et al., 2016).

Os micro-organismos e os produtos resultantes da sua atividade influenciam as reações catódicas e anódicas na superfície do metal, criando condições de corrosão (BEECH, 2004). No caso dos BRS a corrosão pode ser atribuída sobretudo a três fatores: formação de biofilmes e produção de substâncias poliméricas extracelulares; produção de metabólitos corrosivos como o sulfeto de hidrogênio; e despolarização catódica (ENNING et al., 2012).

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, 2004; SOUSA et al., 2010; VIGNERON et al., 2016).

As observações supracitadas 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. Para prevenir os problemas causados à indústria de petróleo, em função do processo corrosivo, métodos de controle e inibição das BRS são utilizados a fim de reduzir os gastos com efeitos deletérios de problema (BEECH, 2004; YANG et al., 2014; TSESMETZIS et al., 2016).

### 3.5.1. Biofilmes

Os biofilmes são ecossistemas microbianos extremamente complexos, podendo ser constituídos por bactérias, fungos, algas e protozoários. Estes micro-organismos produzem substâncias insolúveis denominados de exopolissacarídeos (EPS), que aderem à superfície metálica sob a forma de incrustações, permitindo o estabelecimento e manutenção do biofilme. Com a produção de EPS, o crescimento de novas células e adesão de outras, presentes na fase líquida, passa a envolver e a aglutinar novos micro-organismos, resultando na colonização da superfície sólida. Deste modo, são estabelecidas condições adequadas para o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios, como os BRS. Os ambientes anaeróbios são criados através do metabolismo microbiano, quer pelo consumo de oxigênio, quer pela secreção de EPS, limitando a difusão do oxigênio até a base do biofilme (PERES, 2006).

### 3.5.2. Metabólitos corrosivos

Metabólitos de natureza química diversa, tais como, ácidos, bases, sulfetos, entre outros, formados por micro-organismos podem ser corrosivos, uma vez que transformam o meio originalmente inerte em quimicamente ativo (BEECH, 2004;

YANG et al., 2014). No caso dos BRS, o sulfeto de hidrogênio resultante da redução de sulfato é um produto metabólico bastante agressivo que quando dissolvido na água, ataca o ferro formando depósitos de sulfeto de ferro (FeS), de coloração escura (PERES, 2006).

### 3.5.3. Despolarização catódica

A corrosão mediada por BRS pode ainda ser explicada pela despolarização catódica, devido ao consumo de hidrogênio no cátodo, causado pela atividade de enzimas do grupo das hidrogenases, presente nesses micro-organismos. Na presença de oxigênio dissolvido as reações químicas tendem a remover o hidrogênio da área catódica, promovendo a corrosão. As hidrogenases dos BRS permanecem ativas dentro da matriz do biofilme, mesmo na forma extracelular tendo um papel significativo na biocorrosão do ferro e das ligas ferrosas (BEECH, 2004).

## 3.6. Biocidas convencionais

### 3.6.1. Glutaraldeído

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

### 3.7. Bioprocessos e bioprodutos

O uso de micro-organismos e seus bioprodutos: polímeros (como a xantana), biossurfactantes (ramnolipídeo, surfactina e soforolipídeos), e substâncias antimicrobianas vem se tornando uma alternativa promissora para a indústria de petróleo, seja para utilização na Recuperação Avançada de Petróleo por Ação Microbiana (MEOR), seja como agentes de inibição da biossulfetogênese (ALMEIDA et al., 2004; GANA et al., 2011).

Bioprocessos conduzidos por micro-organismos, tradicionalmente conhecidos como processos fermentativos, são importantes fontes de produtos biológicos usados nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia. Além disso, exercem importante papel nos processos vitais dos ciclos geoquímicos, como também são fundamentais no equilíbrio de populações, na remediação ambiental e na manutenção de ecossistemas (PEREIRA JR.; 2008).

Os micro-organismos produzem substâncias químicas como resultado do metabolismo primário e secundário. No metabolismo secundário estão envolvidas vias metabólicas para a síntese de produtos naturais que não são essenciais para o crescimento do organismo produtor, mas são derivados dos seus precursores de energia, gerada através do metabolismo primário. Estes compostos naturais produzidos podem ser alcalóides, terpenóides, aromáticos e glicosídeos descobertos (MELO; AZEVEDO, 1998).

Os micro-organismos que sintetizam estes compostos podem ser utilizados na produção de antibióticos e/ou nas aplicações biotecnológicas. A produção de biossurfactantes por micro-organismos vem merecendo destaque nas últimas décadas, exercendo um papel importante na inibição bacteriana, segundo alguns autores (GOMAA, 2012; MAGALHÃES; NITSCHKE, 2012).

Os surfactantes são compostos anfipáticos que apresentam propriedades de redução das tensões superficiais e interfaciais, aumentando a solubilidade e a biodegradabilidade de substâncias hidrofóbicas. Os biossurfactantes (de origem microbiológica) são mais eficientes e mais efetivos que os surfactantes convencionais (de origem industrial), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Muitos biossurfactantes não são afetados por fatores ambientais como temperatura, pH e tolerâncias iônicas. Por exemplo, a liquenisina produzida pela cepa *Bacillus licheniformis* não foi afetada em Intervalos de temperatura de até 50°C, uma faixa de pH de 4,5-9,0, concentração de NaCl de 50g/L e concentração de Ca 25g/L (MUTHUSAMY et al., 2008).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é sintetizada por micro-organismos cultivados em hidrocarbonetos imiscíveis em água, mas alguns são produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol (TABATABAEE et al., 2005). Eles podem se encontrar como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas ou ficarem aderidos à sua superfície (CAMEOTRA; SINGH 2009; MARIANO et al., 2007; SEO et al., 2009).

A presença de biossurfactantes no ambiente desempenha um papel natural, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos, uma vez que, aumentam a área superficial das micelas, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando a produção de biomassa bacteriana, permitindo assim, uma melhor ocupação e exploração do meio, além de promover a inibição de grupos microbianos competidores (GOMAA, 2012).

Esses biocompostos podem ser classificados de acordo com a massa molecular. Sendo assim, são divididos em dois grupos: biossurfactantes de baixa massa molecular, como exemplo os glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos corinomicólicos e fosfolipídeos; e biossurfactantes de alta massa molecular como emulsan, liposan polissacarídeos e proteínas complexas (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013). Os biossurfactantes apresentam diversas propriedades, tais como redução da tensão superficial e interfacial (que aumenta a área de contato e a biodisponibilidade de compostos insolúveis em água), quelação de metais pesados, patogênese bacteriana, atividade antimicrobiana e formação de biofilme (CAMEOTRA; SINGH, 2009; GOMAA, 2012; MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013).

A atribuição da atividade antimicrobiana de alguns biossurfactantes vem ganhando força à medida que surgem novos estudos que corroboram essa afirmação. Gana e colaboradores (2011) estudando o potencial antagonista de uma espécie não patogênica de *Bacillus* ssp., obtido a partir de um campo de petróleo argelino contra um consórcio de BRS, observaram que o inibidor biológico produzido pela cepa apresentou melhor desempenho e eficácia na inibição da produção de sulfeto pelas BRS, quando comparado com o biocida químico THPS. Em trabalhos recentes já são

demonstrados a ação comprovada de alguns biossurfactantes com agentes antimicrobianos em especial bactérias Gram positivas (GOMAA, 2012; MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013).

Os SLs são compostos de um dissacarídeo softhorose que é  $\beta$ -glicosidicamente ligado a uma longa cadeia de ácidos graxos. SLs podem ocorrer na forma de ácido livre com uma cauda de ácido graxo livre ou na forma lactônica com uma esterificação interna entre a extremidade carboxílica do ácido graxo e o grupo hidroxila 4' da cabeça softhorose. Além disso, pequenas diferenças nos ácidos graxos hidroxil ocorrem com 16 ou 18 átomos de carbono e uma ou mais ligações insaturadas. A diferença estrutural em SLs pode causar grande variação em suas propriedades físico-químicas (van BOGAERT et al., 2011). Demonstrou-se que SLs possuem várias atividades antimicrobianas particularmente contra bactérias Gram-positivas (DELBEKE et al., 2016). São glicolípídeos produzidos pelo processo de fermentação de leveduras do gênero *Candida*, tais como *Candida bombicola*, *Candida apícola*, entre outras. Shah; Badia (2007) relataram primeiro que os SLs naturais e seus derivados químicos de primeira geração são espermicidas e microbicidas eficientes. Delbeke e colaboradores (2016), mostraram que SLs apresentam uma efetiva atividade antimicrobiana além disso, os SLs demonstraram ser agentes anticancerígenos eficazes contra linhas celulares cancerosas. Uma das principais desvantagens dos SLs até agora tem sido suas atividades citotóxicas.

A Surfactina é um lipopeptídeo surfactante produzido por bactéria do gênero *Bacillus* em especial. É dos mais poderosos biossurfactantes conhecidos, tendo a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m mesmo em baixas concentrações. Possui uma das menores concentração micelar crítica (CMC) dentre os biossurfactantes. Devido à sua elevada atividade superficial aliada à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade, é um dos mais estudados biossurfactantes sendo, portanto, apontado com potencial insumo para diversos setores industriais, ambientais, agrícolas e saúde.

Os biossurfactantes lipoproteicos são talvez os mais conhecidos pelas suas atividades antimicrobianas (MAIER, 2003). A atividade antimicrobiana demonstrada por vários biossurfactantes principalmente os da classe lipopeptídico (surfactina) e glicolípídico (ramnolípídeo), se deve a solubilização de vários componentes da membrana plasmática. Através da excreção dessas substâncias no meio, os micro-

organismos adquirem maiores chances de sobrevivência frente a competição ecológica (LIN, 1994).

### 3.8. Óleos essenciais

Óleos essenciais são líquidos naturais aromáticos e voláteis que podem ser derivados de diferentes partes das plantas, incluindo flores, raízes, cascas, folhas, sementes, casca, frutos, madeira e plantas inteiras (HYLDGAARD et al., 2012).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais se devem ao fato de conseguir transitar com facilidade através da membrana plasmática, interferindo assim em diversos sistemas de transporte celular (GOÑI et al., 2009). Óleos essenciais comumente exibem maiores propriedades inibitórias contra bactérias Gram-positivas do que com bactérias Gram-negativas devido à barreira lipopolissacarídica na membrana externa das Gram-negativas (TECHATHUVANAN, et al., 2014; TEHRANI; SADEGHI, 2015). Como citado em diversos estudos e artigos, os óleos essenciais possuem atividades antibacterianas e antifúngicas contra diferentes micro-organismos.

#### 3.8.1. óleo essencial de melaleuca

Plantas conhecidas como “*tea tree*”, pertencem a um grupo de espécies plantas não relacionadas, algumas das quais incluem *Camellia sinensis*, *Kunzea ericoides*, *Leptospermum scoparium*, *Leptospermum petersonii* e *Melaleuca alternifolia*. Algumas dessas espécies aromáticas têm sido usadas historicamente pelos aborígenes australianos, bem como pelos primeiros colonos europeus para uma variedade de condições infecciosas, incluindo o trato urinário, sendo a espécie de árvores de chá mais bem estudada a *Melaleuca. alternifolia*, sendo os estudos de composição química e sua atividade antimicrobiana mais realizados (VAN VUUREN et al., 2014). Nesse contexto, o uso de compostos naturais como óleos essenciais, com propriedades antimicrobianas parece ser uma opção interessante. A atividades antibacterianas e antifúngicas dos óleos essenciais (OEs) há muito tempo vem sendo reconhecido, mas é a indústria de alimentos que vem obtendo os resultados mais

eficazes com a sua aplicação como antimicrobianos natural (DU PLOOY et al., 2009). A principal vantagem OE é a sua aplicação como agente antimicrobiano, devido a sua maior atividade em comparação a antimicrobianos convencionais provavelmente devido à sinergia e a baixa ocorrência de efeitos colaterais (BAKKALI et al., 2008). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também chamado de árvore do chá, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos terpênicos e álcoois terciários para os quais uma norma internacional estabelece níveis de 14 componentes (HAMMER et al., 2006).

Os principais compostos responsáveis para a atividade antimicrobiana são terpinen-4-ol e 1,8-cineole. Atualmente, o regulamento padrão internacional para OEs estabelece um conteúdo de 30% de terpinen-4-ol e um teor máximo de 15% 1,8-cineole para atender aos requisitos da Farmacopéia Européia (ISO 4730). Os mecanismos de ação do OE de melaleuca não foram claramente identificados, mas eles parecem estar relacionados com a natureza hidrofóbica dos terpenos (VAN VUUREN et al., 2014), que possivelmente pode interagir com as membranas plasmáticas provocando sua lise.

Os benefícios potenciais dos usos do OE de melaleuca vem surgindo como uma boa alternativa antimicrobiana, sendo amplamente utilizado, uma vez que vem representando uma boa alternativa como drogas antifúngicas, uma vez que as leveduras frequentemente apresentam resistência a produtos convencionais (JULIANO et al., 2008).

### 3.8.2. óleo essencial de alecrim

Os metabólitos secundários que ocorrem nas plantas aromáticas têm sido reconhecidos por seu efeito antifúngico, antibacteriano (ADRAR et al., 2016), sendo amplamente utilizados na medicina (BAJALAN et al., 2017; BENDIF et al., 2017). Com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, há um interesse notável em avaliar os efeitos antimicrobianos de metabólitos secundários de plantas. contra uma variedade de patógenos, a fim de descobrir novas classes de antimicrobianos seguros e eficazes para o combate a infecções.

Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L., *Lamiaceae*) é uma planta aromática nativa da região do Mediterrâneo e utilizada mundialmente pela sua atividade microbiana e

antioxidante. Esta planta também tem muitos outros efeitos benéficos dados por sua atividade anti-inflamatória (RAHBARDAR et al., 2017). *R. officinalis* é considerado uma das mais importantes fontes de compostos bioativos voláteis e não voláteis (OJEDA-SANA et al., 2013).

As atividades biológicas do óleo essencial de Alecrim são principalmente dadas por seus principais componentes sendo cetonas e hidrocarbonetos monoterpênicos principais constituintes químicos (BAJALAN et al., 2017). Esses componentes atuam desorganizando a membrana citoplasmática microbiana, o que causa uma perda na permeabilidade da membrana para prótons e íons maiores. alguns dos principais compostos que podem ser indicados como responsáveis pela atividade antimicrobiana do OE de alecrim são: borneol, cânfora, verbenona (um composto orgânico natural classificado como um terpeno que é encontrado naturalmente em uma variedade de plantas) e 1,8-cineole (CELIKTAS et al., 2007. BAJALAN et al., 2017).

### **3.9. Biocidas não convencionais - análogos de sulfato**

Através da docagem, uma técnica de dinâmica molecular que avalia os encaixes entre as moléculas para que ocorra uma reação química, algumas moléculas foram eleitas como prováveis inibidores da redução de sulfato através da enzima APS-redutase. Por essa técnica foram analisados diversos tipos de moléculas, tais como: ácidos orgânicos de cadeia curta e ou aromáticas (compostos fenólicos), e substâncias quelantes.

A capacidade desta enzima (APSR) em transportar elétrons pode ser modificada intervindo nas reações de oxirredução. Tentando evitar a ligação da enzima ao substrato nos locais de ligação com a utilização de compostos quelantes ou antioxidantes simplesmente modificando as propriedades de cofatores responsáveis pelo transporte de elétrons. Podemos causar uma desaceleração do transporte desses elétrons e, portanto, uma redução na velocidade das reações de oxirredução (SCHIFFER et al., 2006; SANTOS et al., 2013). O procedimento de acoplamento de moléculas com capacidade quelante é uma técnica que pode auxiliar na predição de interações proteína-ligando embora os estudos de acoplamento sejam importantes como um procedimento de rastreio para a pesquisa de inibidores, a avaliação

experimental de sua ação inibitória contra os micro-organismos é um processo complementar e muito importante.

### 3.9.1. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos ou ácidos carboxílicos são um grupo de moléculas orgânicas que resultam muitas vezes do metabolismo de animais e plantas. Alguns desses ácidos apresentam propriedades de interesse clínico e industrial como atividade antioxidante e antimicrobiana (GUTIERREZ-FERNANDEZ et al., 2014). Em alguns ensaios de dinâmica molecular (*docking*) algumas dessas moléculas tiveram resultados satisfatórios com relação ao encaixe com a enzima APS-redutase em substituição ao sulfato (KITCHEN et al, 2004; LENGAUER; RAREY, 1996; SANTOS et al., 2013), além de apresentarem propriedades acima citadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores da docagem para a enzima APS-redutase.

Ligantes	Método 1V47			Poses
	Ki(M)/Kcal/mol	$\Delta G$ (KCal/Mol)	$\Delta G$ (KJ/Mol)	
Ác. gálico*	2,53E-07	-8,9	-37,2	1
Ác. oxálico*	0,000196651	-5	-20,9	2
Ác. salicílico	7,06E-05	-5,6	-23,41	1

#### 3.9.1.1. Ácido gálico

O ácido gálico é uma substância orgânica que deriva da via do ácido chiquimíco, um intermediário do metabolismo secundário de plantas, e é um componente de taninos hidrolisáveis em vegetais. É o precursor para a produção comercial do antimicrobiano trimetoprim, um propil-galato com conservantes e alguns corantes (GRUNDHOFER et al., 2001).

Esse metabólito e seus derivados apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antimutagênicas (SOARES, 2002). Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos alimentos e

consequentemente ao organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON; HARRIS, 1999).

Por apresentar várias propriedades interessantes e aplicações comerciais, esse composto é de grande interesse para as indústrias farmacêutica e química (YOSHIOKA et al., 2000). O ácido gálico convencional é produzido por hidrólise ácida do ácido tânico, mas tem alto custo, baixo rendimento e pureza. Alternativamente, o ácido gálico pode ser produzido pela hidrólise microbiana do ácido tânico por tanase, uma enzima induzível, secretada por micro-organismos.

#### 3.9.1.2. Ácido salicílico

O ácido salicílico é um Beta-Hidroxiácido ( $\beta$ -Hidroxiácido) com propriedades queratolíticas (esfoliantes) e antimicrobianas, o que significa que afina a camada espessada da pele e age evitando a contaminação por bactérias e fungos oportunistas.

#### 3.9.1.3. Ácido oxálico

O ácido oxálico é um ácido orgânico saturado, de cadeia normal e relativamente forte, sendo 10.000 vezes mais forte que o ácido acético. Em solução aquosa libera  $2H^+$ , por molécula, apresentando grau de ionização de 60%, é fortemente ácido e muito venenoso. Ocorre naturalmente em inúmeras plantas e animais, principalmente sob a forma de sal. É uma substância incolor, que cristaliza a partir de soluções aquosas com duas moléculas de água de cristalização. Neste estado de diidrato, apresenta ponto de fusão em torno de  $189^{\circ}C$  e elevada hidrossolubilidade, também se dissolve com facilidade em álcool comum. Em presença de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ), decompõe-se, formando monóxido e dióxido de carbono ( $CO$  e  $CO_2$ , respectivamente) em água.

É um composto orgânico usado como mordente em tingimentos e como agente antioxidante, possui a propriedade de se ligar a metais em especial a das famílias 1A e 2A. O ânion oxalato, resultado da perda dos átomos de hidrogênio do ácido oxálico,

apresenta forte interação com todos os metais bivalentes, como é o caso do cálcio e do magnésio (presente na *APSr*), dando origem a complexos de baixíssima solubilidade (MELO et al., 2008). O oxalato pode atuar diretamente na parede celular de micro-organismos sequestrando cálcio, o que poderia provocar desestruturação entre as microfibrilas e um eventual aumento de porosidade (AGUIAR; FERRAZ, 2008). A presença de cristais de oxalato de cálcio em micro-organismos tem sido amplamente descrita.

Em estudos de dinâmica molecular o ácido oxálico apresentou características que se mostraram promissoras como uma molécula análoga de sulfato, sendo possível prever alguns encaixes com a enzima *APS-redutase*.

### 3.9.2. Quelantes análogos de sulfato

Um quelante ou sequestrante de metais, é uma substância que forma complexo com íons de metais, estes complexos são conhecidos como quelatos, termo que vem da palavra grega *chele*, que significa garra.

#### 3.9.2.1. HEDTA

Os agentes quelantes são uma certa classe de compostos orgânicos e inorgânicos, que podem formar complexos com íons metálicos. Um exemplo de agentes quelantes são o ácido etileno-diamina-tetracético (EDTA) ou a sua forma n-hidroxilada (HEDTA) que são eficientes na remoção de óxidos de ferro ou cobre.

Com base no sucesso da utilização de EDTA como antimicrobiano para erradicar biofilmes em cateteres, Raad; Sherertz (2001) patentearam a ideia de tratar biofilmes de BRS usando esse quelante em combinação com biocidas. Os resultados experimentais iniciais mostraram que o EDTA aumentou a inibição do crescimento planctônico de BRS pelo glutaraldeído e THPS (WEN; GU, 2007; ZHAO et al., 2005). A lenta biodegradabilidade do EDTA suscitou um apelo à sua substituição por um quelante mais solúvel em água, surgindo como forte candidato o HEDTA (VIDELA, 2002).

Em alguns estudos de docagem o HEDTA se mostrou um promissor análogo a molécula de sulfato com relação a encaixes junto a enzima *APS-redutase* (SANTOS et al., 2013).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

A proposta dessa pesquisa foi testar o potencial de substâncias não convencionais no controle da produção de sulfeto ou atividade de bactérias redutoras de sulfato (BRS). As substâncias testadas foram:

- ✓ Caldo de cultura de cepa bacteriana isolada do poço de petróleo (BCGP-01);
- ✓ Caldo de cultura de cepa de levedura isolada do poço de petróleo (LV-01);
- ✓ Óleo essencial da planta do chá (OEM);
- ✓ Óleo essencial de alecrim (OEA);
- ✓ A interação entre os óleos essenciais e um solvente alcoólico (EtOH);
- ✓ Ácido gálico, ácido oxálico e ácido salicílico;
- ✓ HEDTA;
- ✓ A interação entre os ácidos orgânicos e HEDTA.

Após coleta da água de produção, foi realizado o trabalho de isolamento de cepas bacterianas e de leveduras. Para realização dos testes de produção de bioprodutos (biossurfactante) e de antagonismo contra a cepa de *D. vulgaris*, que é uma BRS, foram escolhidas duas cepas microbianas denominadas de BCGP-01 e LV-01. A primeira cepa foi tentativamente identificada pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA como sendo do gênero *Bacillus pumilus*. A segunda foi tentativamente identificada através de análises metabólicas. O caldo de cultivo sem a presença de células foi utilizado em testes de toxicidade aguda sobre a enzima desidrogenase. O método de toxicidade aguda com a desidrogenase também foi utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de melaleuca e alecrim e das substâncias como os ácido orgânicos (gálico, oxálico e salicílico) e HEDTA. Para avaliar o potencial de interação entre essas substâncias (sinergia) foram montados vários experimentos utilizando o método estatístico de superfície de resposta (combinação entre a probabilidade de resposta a partir de experimentos fatoriais). Os procedimentos são descritos a seguir.

#### 4.1. Local do estudo

Os poços de extração de petróleo, onde foram realizadas as coletas das amostras de efluentes, são campos maduros, pertencentes à região da Bacia do Recôncavo Baiano que apresentam problemas de biocorrosão.

As amostras de água produzida foram coletadas em poços de petróleo em estação de produção localizada no Agreste de Alagoinhas, região de Taquipe em dois momentos: T1 - 11 de março de 2015; e T2 - 29 de junho de 2015. Os poços dessa região apresentam uma grande quantidade de água produzida devido à idade do poço e ao uso de água de injeção como método de recuperação secundária de óleo.

A água produzida coletada foi transportada em frasco de borossilicato âmbar até a unidade laboratorial. E todo experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos - LABEM, ICS, UFBA.

#### 4.2. Detecção e quantificação micro-organismos sulfetogênicos

##### 4.2.1. Contagem direta de células - DAPI/FISH

Para detectar e determinar a população microbiana da água produzida utilizada foi realizada a contagem total de células (DAPI) e contagem diferencial de BRS (FISH). Foram centrifugados 150mL de água produzida para a formação dos *pellets*. Esses *pellets* foram ressuspensos em 200 $\mu$ L de PBS (1X) e 600 $\mu$ L de tampão de fixação com paraformaldeído a 4% em PBS (1X), e então, 5 $\mu$ L da amostra foram colocadas em lâminas previamente tratadas para a fixação das células (ZARDA et al., 1997).

A metodologia adotada para a hibridização segue como descrito por Sarti (2007): foi utilizado 5 $\mu$ L da amostra para a hibridização com tampão contendo 0.9M de NaCl, 20mM Tris/HCl, 10mM de EDTA, 0,01% de SDS e formamida. As sondas utilizadas para a hibridização foram EUB-338 para Eubactérias e BRS-335 para bactérias redutoras de sulfato (Tabela 2). As lâminas foram mergulhadas em um tampão (20mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS e 80mM NaCl), por 20 minutos e em seguida coradas com 10 $\mu$ L de DAPI (4',6-diamidino-2-fenil indol), durante 20 minutos, na ausência de luz. Após este período as lâminas foram lavadas com água Milli-Q e secas em temperatura ambiente. Depois de secas, cada poço da lâmina

recebeu 4µL de solução *anti-fading* e foram cobertas com uma *Hybridization Coverslip* (tratamento necessário para evitar o branqueamento das células após o tempo de exposição ao microscópio).

As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência modelo *Olympus BX51*, com câmera para captura de imagens *Olympus Q-Color* e o software *Image Pro-Plus* versão 5.1.

**Tabela 2.** Sequência das sondas para RNAr 16s utilizadas.

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

#### 4.3. Determinação de parâmetros físico-químicos (Eh/pH)

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: potencial redox (Eh) e o potencial hidrogeniônico (pH). Esses parâmetros indicam as condições eletrolíticas do meio, permitindo a inferência sobre qual via metabólica ativa durante os testes. Para realizar as análises foram aliqüotadas 7mL da amostra em tubos polietileno tipo Falcon de 50mL. A leitura do potencial redox foi feita em eagemetro da *Thermo Electron Corporation*, modelo *Orion 3 Star* com eletrodo de platina e calamelano saturado e calibrado em solução para -100 mV e 100 mV, os valores foram expressos em miliVolt (mV). O pH foi medido em eagemetro *Thermo Electron Corporation*, modelo *Orion 3 Star*, calibrado em solução padrão para pH 4,0; 7,0 e 10,0.

#### 4.4. Perfil ecofisiológico da água produzida de Taquipe

O perfil ecofisiológico de uma amostra nos permite avaliar quais fontes de carbono são utilizadas e por quais via o micro-organismo produz energia. Para a realização desse teste foi utilizado o meio Postgate E modificado sem fontes de carbono. As fontes de carbono foram adicionadas posteriormente: acetato de sódio

0,1M; lactato de Sódio 0,1M; piruvato de sódio 0,1M; benzoato de sódio 0,1M; e butirato de sódio 0,1M. Após o cultivo das amostras foram realizados testes complementares como: coloração de Gram para avaliar as morfologias, teste de motilidade para avaliar a presença de flagelo e teste para redução de nitrato (crescimento anaeróbio em caldo nitrato).

#### **4.5. Identificação dos micro-organismos**

Foram aliqüotados 1 mL da amostra de água produzida e adicionados em tubos com 9 mL de meio de cultura específicos: TSB (aeróbios), CSB (mesofilos oxidantes de enxofre), GYM (actinomicetos). As amostras foram colocadas em estufa a 38°C até os tubos apresentarem crescimento evidente. Após crescimento satisfatório os tubos passaram por diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), e foram repicados em placa nos meios; TSA (aeróbios), CSB (mesofilos oxidantes de enxofre), ACA (ágar amino-caseína). O meio TSA apresentou os melhores resultados para crescimento microbiano. As colônias isoladas em TSA, foram selecionadas e avaliadas quanto a morfologia pela coloração de Gram. Foram testados com relação à produção de EPS (exopolissacarídeos) meio YMA (SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999), produção de tensoativos (biossurfactantes) meio TSB. Foram isolados: 03 leveduras, 02 bacilos Gram positivos e 04 bacilos Gram negativos.

##### **4.5.1. Cepa LV-01**

Para a identificação da cepa LV-01 foi realizado testes de perfil metabólico. Os testes realizados foram: assimilação de carbono e nitrogênio, teste da urease e zimograma (teste de fermentação).

Para a realização do auxanograma, foi inoculado 2mL da suspensão de levedura diluída em solução salina (0,9%), com turbidez equivalente a 0,5 McFarland, em placas de Petri contendo 30 mL dos meios: YCB (para assimilação de nitrogênio) e YNB (para a assimilação de carbono), cada placa. Para a assimilação de carbono foram testados os seguintes carboidratos: dextrose, maltose, lactose, sacarose, galactose, xilose, melibiose, trealose, inositol, ducitol, celobiose e rafinose. Para testar

a assimilação de nitrogênio foram usados peptona e nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>). Como prova adicional foi realizado o teste da urease (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Para fechar a identificação do micro-organismo foi realizado o zimograma. Foram usados tubos contendo 5mL de meio base para zimograma (extrato concentrado de levedura 4,5g; peptona 0,5g; azul de bromotimol 0,04g), e testados as fontes de carbono: glicose, maltose, sacarose, galactose, lactose e trealose. Cada tubo continha um tubo de *Durhan* invertido para evidenciar a formação de gás durante a utilização da fonte de carbono.

#### 4.5.2. Cepa BCGP-01

Devido à ausência de provas bioquímicas conclusivas, para a identificação da estirpe BCGP-01, foi realizado o sequenciamento da cepa, utilizando *primers* universais para Eubactérias.

##### 4.5.2.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de extração para células de crescimento em suspensão, pelo método do Brazol (LGC Biotecnologia). Para a realização deste protocolo a cultura foi preparada no dia anterior (crescimento 18\24 horas).

Alíquota de 1 mL da amostra foi transferida para tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL. A amostra foi centrifugada a 5.000xg por 5 min, para formar o *pellet*. Em seguida, as células foram lisadas através de repetidas pipetagens pela adição de 1 mL do Brazol. O tubo foi agitado com agitador, tipo Vórtex, por 2 min e adicionou-se 250µL de clorofórmio gelado. A amostra foi agitada novamente.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000xg, a 4<sup>o</sup> C, 20 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 500µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi agitado por inversão por 2 min, seguido de centrifugação a 12.000xg por 15 min.

O sobrenadante foi desprezado por cuidadosa decantação, e o *pellet* foi lavado em 500µL de etanol 70%. A amostra foi homogeneizada por inversão e centrifugada

a 12.000xg, 4° C, 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi dissolvido em 40µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril. A amostra foi armazenada em geladeira a -20° C, até a sua utilização.

#### 4.5.2.2. Reação de PCR

O *mix* para a reação de PCR foi realizado em um microtubo com capacidade para 200µL. Foi utilizado a Taq PCR *Master Mix 2X* da Promega e os *primers*, conforme descrito abaixo:

*Primer* RNA ribossomal 16S de Eubactéria

fD1 - 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

rP2 - 5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'

Os reagentes utilizados na reação de PCR, para um volume final igual a 25µL, são os que seguem: H<sub>2</sub>O Milli-Q esterilizada, até 25µL; enzima *Master Mix* 12,5µL; *forward primer* (10µM) e *reverse primer* (10 µM) 0,8 µL; DNA molde 2µL.

As reações foram incubadas em um termociclador Veriti® 96 (*Applied Biosystems*), a 95° C, durante 3 minutos, para desnaturação do DNA e ativação da Taq DNA polimerase (*Master Mix 2X*). Após a desnaturação, a reação de amplificação foi composta por 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação, a 95° C durante 45 segundos, uma temperatura de anelamento a 59° C por 45 segundos e uma etapa de extensão a 72° C, durante 1 minuto. Ao final dos ciclos, a reação foi mantida a 72° C, durante 20 minutos.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando a enzima *illustra ExoPro Star 1-Step* (GE) seguindo as recomendações do fabricante.

#### 4.5.2.3. Reação de sequenciamento

O resultado do PCR gerou um segmento de DNA de aproximadamente 1500 pb e o produto foi sequenciado pela plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A sequência foi checada para presença de *chimera* e a

árvore filogenética foi construída usando sequências “tipo” do gene rRNA 16S bacteriano depositados em “Silva” - *High Quality Ribosomal RNA Databases*. As sequências foram alinhadas e analisadas pelo programa MEGA 5 usando o teste de *bootstrap* para 1000 repetições com a técnica *Neighbour-Joining* gerado pelo algoritmo Kimura 2-parâmetros.

#### 4.6. Produção de bioprodutos com atividade antimicrobiana

Para a produção dos biossurfactantes foram utilizados os micro-organismos isolados das amostras de água produzida. Os micro-organismos inicialmente foram inoculados em tubos de ensaio contendo 9mL de caldo nutriente e incubados por 24h a 38°C. Após a incubação, as suspensões de células de cada tubo foram submetidas a leituras de densidade óptica a 650nm para padronização celular a 0,05 da escala MacFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  cel/mL) e foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 150mL contendo 45mL de meio de produção. A seguir foram incubados a 38°C e 180 rpm por 5 dias (120h). O caldo de fermentação foi centrifugado a 9000 rpm por 20 min a 4°C para separação das células (BANAT et al., 2000; FOX; BALA, 2000). Os caldos fermentados isentos de células foram submetidos à análise de índice de emulsificação, atividade antimicrobiana e composição do bioproduto.

##### 4.6.1. Índice de emulsificação (E24)

O índice de emulsificação foi determinado em tubos de ensaio com tampa de rosca pela adição de 2,0mL de óleo mineral e 2,0mL do sobrenadante, agitado em Vortex por 2 min. e deixado em repouso por 24 horas. O índice de emulsificação (E24) foi calculado como segue:  $E24 = [\text{altura da camada emulsionada (mm)} / \text{altura total do líquido na coluna (mm)}] \times 100$ .

#### 4.6.2. Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada no meio de cultura livre de células utilizando o Tensiômetro KSV (modelo Sigma) a 25° C. Como controle, utilizaram-se os meios de cultura sem inóculo. As análises foram feitas pelo método do anel de distanciamento usando o tensiômetro de Du Nouy (JOSHI et al., 2013). Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido vai se romper, sendo então determinada a tensão superficial (DAMIÃO, 2012).

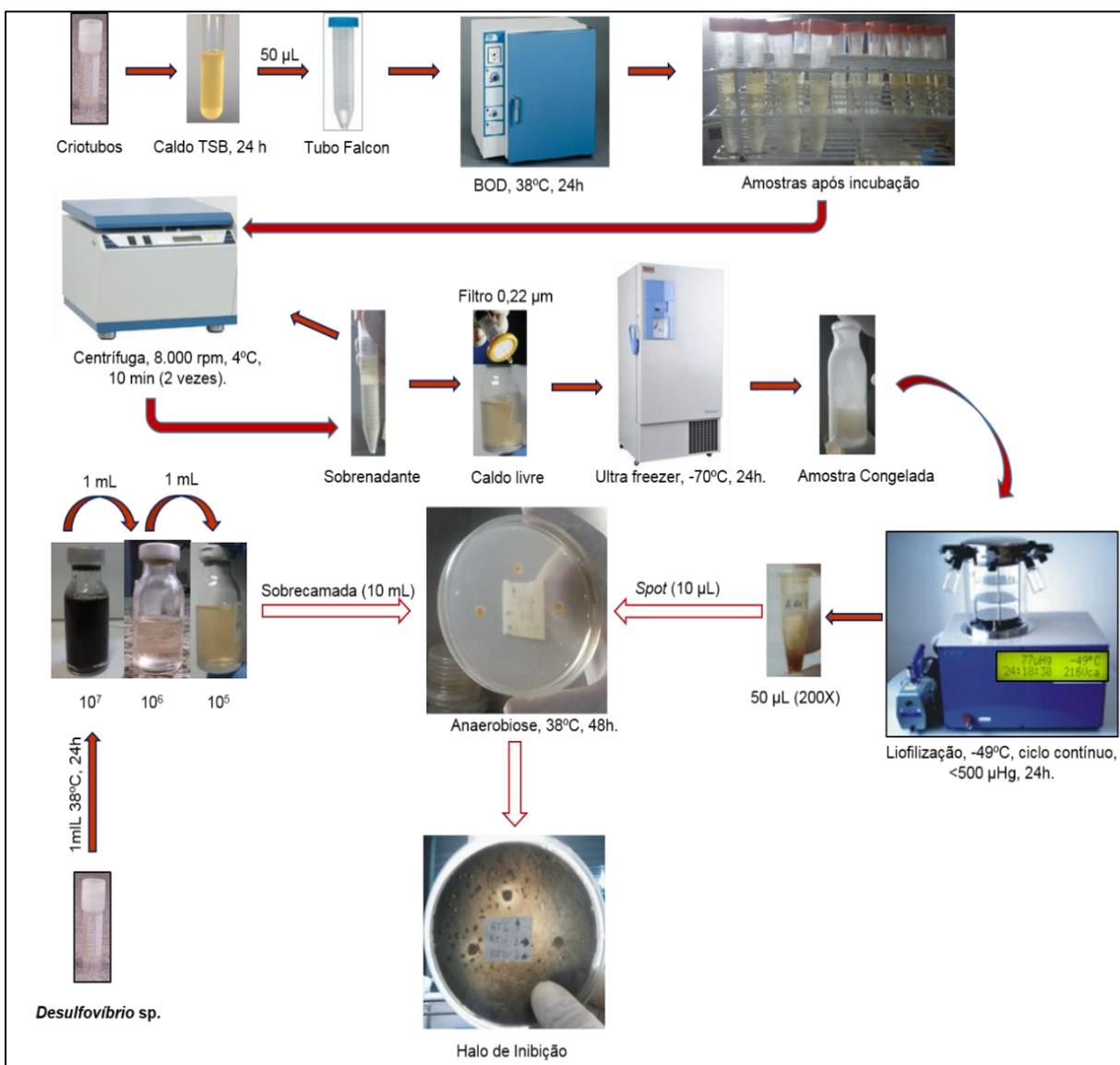
#### 4.6.3. Atividade antimicrobiana

##### 4.6.3.1. teste de inibição em placa

Com o objetivo de realizar o teste de efetividade contra a produção biogênica de sulfeto, foi feito o teste de antagonismo em placas por sobrecamada como descrito por Farias (2016) (Figura 4). Uma alíquota de 100µl das culturas a serem testadas quanto a capacidade inibitória, foram transferidas para tubos tipo Falcon contendo 10mL de caldo TSB, incubados a 30°C, 24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon estéril e foi centrifugado novamente (MAGALHÃES, 2014). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado com membrana de 0,22µm para a remoção de todas as células microbianas.

Os sobrenadantes livres de células foram transferidos para frascos “tipo penicilina”, cobertos com parafilme e armazenados em ultra freezer a -70°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram concentradas por liofilização em liofilizador Liotop, modelo L101, -49°C, pressão abaixo de 500 µHg, ciclo contínuo, 24h. O material liofilizado foi ressuspenso em 50µL de água mili-Q estéril (amostras 200x concentradas), armazenado em geladeira, a 4°C, até a realização do teste de inibição.

**Figura 4.** Fluxograma do teste de inibição em placas por sobrecamada.



Fonte: Farias, p. 50 (2016).

A cepa de BRS utilizada para os testes de antagonismo foi a *Desulfovibrio vulgaris*, pertencente a coleção de culturas do LABEM (Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos). A *Desulfovibrio vulgaris* (inóculo de 1mL) foi ativada em frascos de penicilina contendo o meio Postgate E modificado (CARVALHO, 2010), e incubada a 38°C, 24h. Posteriormente, foi feito a contagem das bactérias pelo método do DAPI/FISH para determinar a concentração do inóculo. A concentração do inóculo foi ajustada para  $1 \times 10^6$  cel/mL. A partir dessa diluição, 1mL do inóculo foi transferido para tubos de penicilina com meio Postgate modificado semissólido 1%

(armazenados em banho maria a 45°C), resultando na diluição  $10^{-5}$ , utilizado para fazer a sobrecamada.

Para os testes de inibição por sobrecamada, 10µL do caldo livre de células liofilizado (200x concentrado) foi inoculado em discos de papel filtro (5 mm) na superfície de placas contendo o meio Postgate modificado, seguido de secagem por 30 min. Após esse período, foi realizado o inóculo da cepa *Desulfovibrio vulgaris* ( $10^5$ ) na forma de sobrecamada. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose, à 38°C, 48h. Para cada um dos isolados, o experimento foi realizado em triplicata. A formação de um halo claro ao redor das culturas indicou a inibição do crescimento (ROSA et al., 2013).

#### 4.6.3.2. Teste de inibição em caldo

Para os testes de inibição em caldo, foram inoculados uma alíquota de 100µL das culturas a serem testadas como antagonistas de BRS, foram transferidas para tubos tipo Falcon contendo 10mL de caldo TSB, incubados a 30°C, 24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon estéril e foi centrifugado novamente (MAGALHÃES, 2014). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado com membrana de 0,22µm para a remoção de todas as células microbianas. Os sobrenadantes livres de células foram transferidos para frascos “tipo penicilina”, cobertos com parafilme e armazenados em ultra freezer a -70°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram concentradas por liofilização em liofilizador Liotop, modelo L101, -49°C, pressão abaixo de 500 µHg, ciclo contínuo, 24h. O material liofilizado pesado e feito soluções estoques para as concentrações de 10µg/ml; 50µg/ml; 100µg/ml e 200µg/ml. O volume de 100µL de cada solução foi inoculado nos frascos de penicilina contendo meio Postgate E líquido. A inibição foi avaliada utilizando um sal de tetrazolio (INT).

## 4.7. Ensaio com os inibidores

### 4.7.1. Padronização do inóculo

Para os ensaios com as substâncias inibidoras, os inóculos foram padronizados, a partir do *mix* de BRS obtidos das amostras de água produzida, em  $10^7$  cel/mL e  $10^4$  cel/mL. Foi inoculado 10mL de água produzida em 4 frascos do tipo penicilina com volume de 100mL (10mL inóculo + 90mL de meio Postgate E), e incubado à 38°C, por 16-24h. O frasco que apresentou crescimento nas primeiras 24 horas, foi utilizado para o teste com os inibidores (caldo de cultura enegrecido evidenciando a precipitação de sulfeto) (Figura 05).

**Figura 5.** Crescimento de BRS, água produzida, campo Taquipe.



Fonte: Próprio autor.

Desse frasco foi feito um repique (1% de inóculo), em meio Postgate E. O inóculo foi monitorado até apresentar precipitação de sulfeto de ferro (16h de incubação), e realizado teste para determinar a população através do número mais provável (NMP). Após esse período, foi feito um segundo repique (1% de inóculo), monitoramento (16h), e NMP para confronto dos resultados.

A estimativa do NMP da população estava em torno de  $10^9$  cel/mL. Foram realizadas diluições a partir deste frasco de crescimento ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$ ), sendo os frascos com concentrações  $10^8$  e  $10^5$ , utilizados para a realização dos testes com os inibidores ácido oxálico, ácido gálico e ácido salicílico, para alcançar as populações  $10^7$  e  $10^4$ , respectivamente. Os frascos primários  $10^7$  e  $10^4$  ainda foram submetidos a

um novo NMP, antes da realização dos testes, para a quantificação de micro-organismos (Figura 06).

**Figura 6.** NMP do inóculo para a realização dos testes com inibidores.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.7.2. Teste qualitativo com os inibidores

Os inibidores utilizados neste experimento foram ácido oxálico, ácido gálico, ácido salicílico e HEDTA que foram utilizados isoladamente e combinados, totalizando 16 combinações ( $2^n$ , sendo “n” o número de substâncias usadas), mas, sempre perfazendo a concentração final de  $500\mu\text{g/ml}$ . Em todos os grupos as análises foram realizadas em triplicata, em frascos tipo penicilina, utilizando 9mL de meio Postgate E modificado e 1mL de inóculo com populações bacterianas de  $10^7$  e  $10^4$  cel/mL, acrescida dos inibidores.

Cada inibidor foi preparado pela adição de 0,125g da substância em 10mL de meio Postgate E, obtendo-se uma solução estoque de  $12500\mu\text{g/mL}$  ( $12,5\text{g/L}$ ), dessa solução foi utilizada volumes conforme tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tabela de combinação concentração/volume dos inibidores.

Nº - inibidores	Con. ( $\mu\text{g/mL}$ ) - cada	Vol. ( $\mu\text{L}$ ) - cada	Con. final ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	500	400	500
2	250	200	
3	166	130	
4	125	100	

Nº - número; Con. - concentração; Vol. - volume.

#### 4.7.3. Teste de toxicidade aguda contra a atividade da desidrogenase

Dos inibidores testados foram selecionados os que se mostraram mais promissores com agente de inibição para BRS.

O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando um consorcio de BRS isolados de poços maduros de petróleo. O efeito adverso das substancias testadas foi avaliando através de mudanças na atividade da enzima desidrogenase que promovem a redução do iodo-nitrofenil-tetrazolium (INT) para formazan. A redução *in vitro* de sais de tetrazólio pela desidrogenase de BRS acontece porque esse composto substitui o sulfato durante o processo de respiração anaeróbia. O meio passa assim de uma cor purpura-amarela para cor vermelha. A quantidade de formazan acumulado no meio de cultivo é diretamente proporcional a atividade da enzima desidrogenase e, portanto, associado ao metabolismo e crescimento de BRS no meio (CHINALIA et al., 2008). Os sais de tetrazólio funcionam, portanto, como indicadores fisiológicos (STOCKERT et al., 2018). A aplicação desta técnica é usada em reações metabólicas redox para estimar a atividade metabólica de bactérias, nesse caso, de bactérias redutoras de sulfato (FUKUI; TAKII, 1989).

As concentrações utilizadas para realização do teste de toxicidade aguda foram: 0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ( $\mu\text{g/mL}$ ). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm, tem como controle a reação sem inibidor como sendo 100% da atividade da desidrogenase (CHINALIA et al., 2008).

#### 4.8. Prospecção tecnológica

A prospecção tecnológica foi realizada a partir do Banco Europeu de Patentes (Espacenet®) entre junho e agosto de 2017. Inicialmente as buscas foram realizadas utilizando palavras-chave com objetivo de encontrar os principais grupos de classificação relacionados com o tema. As palavras-chave utilizadas foram: *control*, *process*, *sulfide*, *sulfate-reducing bacteria* e *biocide*. As palavras-chaves foram combinadas usando os operadores booleanos OR e AND. Em decorrência da característica da prospecção, que objetivou o levantamento dos processos envolvendo as BRS e os mecanismos de controle existentes, não foi possível utilizar

um único código necessitando buscar informações em outros grupos da classificação. A tabela 4 mostra os grupos selecionados e suas descrições e a tabela 5 a quantidade de patentes por grupo.

**Tabela 4.** Grupos para classificação de patentes utilizados na prospecção.

Código CPC/IPC	Descrição dos códigos
<b>C23F11</b>	Aplicação não-mecânica de material metálico a partir da superfície; inibição à corrosão de material metálico ou incrustação em geral; processos multipositivos para o tratamento de superfície de material metálico que importa pelo menos um processo fornecido na classe c23 e no menos um processo coberto por subclasses c21d ou c22f ou classe c25.
<b>C23F11/00</b>	Inibir a corrosão do material metálico aplicando inibidores na superfície em perigo de corrosão ou adicionando-os ao agente corrosivo (adicionando inibidores a óleo mineral, combustíveis ou lubrificantes C10, adicionando inibidores às soluções de decapagem C23G).
<b>C23F11/10</b>	Utilização de substâncias e/ou compostos orgânico para inibir o processo corrosivo.
<b>C23F15/00</b>	Outros métodos de prevenção de corrosão ou incrustação.
<b>E21B43</b>	Métodos ou aparelhos para a obtenção de óleo, gás, água, materiais solúveis ou fusíveis ou uma pasta de minerais de poços (aplicável apenas à água E03B; obtenção de depósitos de óleo ou materiais solúveis ou fusíveis por técnicas de mineração E21C41 / 00; bombas F04).
<b>E21B43/22</b>	Emprego de produtos químicos ou de atividade bacteriana ( <u>E21B 43/27</u> tem prioridade; composições químicas ou de atividade bacteriana <u>C09K 8/58</u> ; características químicas da extração de petróleo de areias petrolíferas ou de xistos betuminosos <u>C10G</u> ) C12S3.
<b>E21B43/27</b>	Por meio de produtos químicos erosivos, p. ex. ácidos.
<b>C12R1</b>	Processos em geral utilizando micro-organismos.

**Tabela 5.** Quantidade patentes por grupo de classificação.

C23F11	C23F11/00	C23F15/00	E21B43/22	E21B43/27	C12S3	C12S3/08	C12R1	BIOCID	SRB	EPO
X										9879
	X									9156
		X								8790
			X							1000 0
				X						3438
					X					4456
						X				1436
							X			2000 0
								X		1777 9
X									X	22
	X								X	4
		X							X	4
			X						X	28
				X					X	1
					X				X	0
						X			X	0
							X		X	27
								X	X	12

#### **4.9. Análise estatística**

Os testes com as substâncias inibidoras foram avaliados utilizando testes estatísticos como superfície de resposta, gráficos de contorno e determinação do coeficiente de regressão, através de programas estatísticos como o STATISTICA e o MINITAB.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

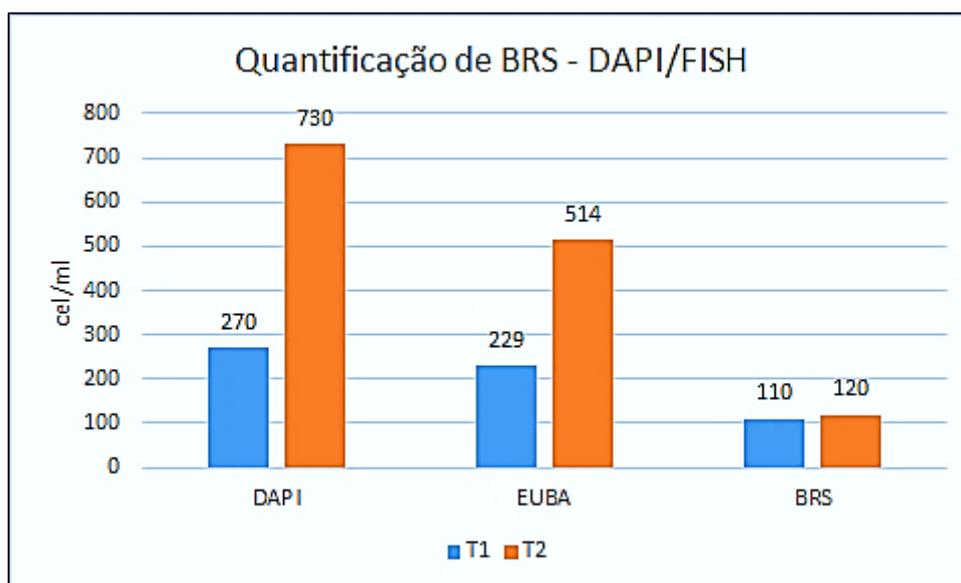
### 5.1. Detecção e quantificação micro-organismos sulfetogênicos

#### 5.1.1. Contagem direta de células - DAPI/FISH

A quantificação dos membros do domínio Eubacteria foi realizada com a sonda EUB-338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'). Já as bactérias redutoras de sulfato foram detectadas com as sondas específicas para células pertencentes à família e gênero do grupo BRS-385 (5'-CGGCGTTCGCTGCGTCAGG-3'), que se ligam na fita de DNA na região que codifica o gene 16S do RNAr (AMANN, 1995; HESHAM; ALAMRI, 2012; BATISTA, 2013).

O resultado da contagem direta de células das amostras de água produzida aparece resumido na Figura 7.

**Figura 7.** Contagem direta de células obtidas com a análise das amostras A e B de água produzida. O método utilizado foi o DAPI/FISH.



Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados encontrados foi observado que a amostra A apresentou uma densidade populacional total de 270 cel/mL. Desses 229 cel/mL

(85%) mostraram compatibilidade com o grupo Eubacteria. Com relação a sonda para BRS a densidade populacional da amostra foi de 110 cel/mL (41%).

Já a amostra B apresentou uma densidade populacional total de 730 cel/mL. Desses 71% (514 cel/mL) mostraram compatibilidade com o grupo Eubacteria. Com relação a sonda para BRS as médias percentuais das amostras foram de 16% (120 cel/mL).

Ainda com base na análise do gráfico podemos observar que há um percentual significativo de eubactéria (71-85%) que não pertence ao grupo dos BRS (16-41%), sugerindo a presença de outros grupos microbianos.

A técnica de FISH (Hibridização Fluorescente *In Situ*) é uma eficiente ferramenta para o estudo e quantificação da comunidade microbiana complexa, podendo fornecer informações específicas e rápidas sobre esta comunidade (AMANN et al., 1995; BATISTA, 2013; BRYUKHANOV, et al., 2011). Em relação à análise quantitativa dos micro-organismos foi possível observar que as amostras de água produzida dos poços maduros da região do Agreste de Alagoinhas vêm decrescendo em número de BRS, ao mesmo tempo em que novas populações de micro-organismos não redutores vêm surgindo. Farias (2016) trabalhando no isolamento, seleção e identificação de bactérias produtoras de bioativos com potencial para aplicação na indústria do petróleo, isolou espécies microbianas não pertencentes ao grupo dos BRS a partir de amostras de água produzida.

A partir dessas informações e de estudos anteriores (SANTOS et al., 2010; BATISTA, 2013), podemos observar uma queda no número total de BRS devido ao uso sistemático de biocidas como o glutaraldeído e quaternário de amônio, que vem provocando uma pressão seletiva e posterior aquisição de resistência.

## **5.2. Determinação de parâmetros físico-químicos (Eh/pH)**

Os resultados da caracterização das amostras de água produzida oriundas do poço Taquipe são apresentados na Tabela 6.

A partir da análise da figura, pode-se observar que o pH da água, de ambas amostras, permaneceu em torno da neutralidade. O potencial hidrogeniônico encontrado no poço foi 7,2 para a amostra A e 7,5 na amostra B. Valores semelhantes foram observados por Kaster et al., (2007) estudando o efeito do nitrato e nitrito na

sulfetogênese por BRS termófilas utilizando amostras de água produzida do Mar do Norte. Segundo Postgate (1984), valores de pH entre 7,2 e 8,0 fornecem condições adequadas à atividade dos BRS.

**Tabela 6.** Valores de Eh/pH encontrados nas amostras de água produzida.

Amostras	Parâmetros físico-químicos	
	pH	Eh (mV)
T1	7,2	-186
T2	7,5	-123

Já o potencial redox (Eh) foi de -186 mV para amostra A e -123mV para amostra B, evidenciando que os locais onde foram coletadas as amostras de água produzida ainda apresentavam caráter redutor, ou seja, ausência de oxigênio. Segundo Postgate (1984) BRS requerem um Eh negativo para o seu crescimento inicial. Sendo assim, o potencial redox encontrado para as amostras T1 e T2 são favoráveis para o crescimento desse grupo de bactérias.

### 5.3. Perfil ecofisiológico - água produzida Taquipe

Segundo Hussain e colaboradores (2016), o poço de petróleo assim com a água de produção são ecossistemas com uma grande diversidade microbiana. No caso das BRS não é diferente, apresentando diversos grupos ecofisiológico que são denominados pela sua predileção por determinados substrato (POSTGATE, 1984; CASTRO et al., 2000; VARJANI; GNANSOUNOUB, 2017). com base nessas informações foi montado uma estratégia para traçar um perfil ecofisiológico das amostras de água de Taquipe T1 e T2, utilizando ácidos carboxílicos de cadeia curta como descrito em Postgate (1984) (Tabela 7).

Em ambas as amostras os resultados para os substratos: acetato e lactato foram positivos. Sendo que os resultados do Gram e dos testes complementares (motilidade e redução de NO<sub>3</sub>), permitiram inferir sobre os prováveis gêneros de BRS presente na água produzida de Taquipe, corroborando com Muyzer; Stams (2008), que também detectaram a presença desses dois gêneros (*Desulfovibrio* e *Desulfobacter*) em amostras de água produzida.

**Tabela 7.** Perfil ecofisiológico das amostras de água.

Fonte de carbono	Crescimento (38°C)	Redução de NO <sub>3</sub>	Motilidade	Gram	Gênero
Acetato	+	-	-	-	<b><i>Desulfobacter</i></b>
Piruvato	-	-	-	.	Ausência
Lactato	+	+	+	-	<b><i>Desulfovibrio</i></b>
Benzoato	-	-	-	-	Ausência
Butirato	-	-	-	-	Ausência

#### 5.4. Prospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico

Os resultados da detecção e quantificação de BRS indicaram alta concentração de Eubactérias nas amostras de água produzida. Com base nessa observação foi realizado em um trabalho de prospecção de micro-organismos aeróbios com potencial aplicação na indústria do petróleo utilizando diferentes meios de cultura (FARIAS, 2016). A partir das amostras de água produzida, foram isoladas 26 cepas de bacilos, coco-bacilos, estafilococos e leveduras. Esses micro-organismos foram testados quanto ao seu potencial biotecnológico para a produção de biossurfactante. Os resultados preliminares indicaram que a cepas BCGP-01 (bacilo Gram positivo) e a LV-01 (levedura) seriam as melhores para a produção de biossurfactantes.

#### 5.5. Identificação dos micro-organismos

##### 5.5.1. Cepa LV-01

A cepa LV-01 foi identificada como *Candida parapslosis* conforme resultado do auxanograma (Tabela 8) (SIDRIM, 2004). A fermentação de açúcares simples (zimograma) (tabela 9) assim como o auxanograma para nitrogênio completam as provas utilizadas para a identificação da LV-01 (Tabela 10).

**Tabela 8.** Resultado do auxanograma para a cepa LV-01.

Carboidratos	Cepas		
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	LV-01
Glicose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Galactose	+	-	+
Lactose	+	-	+
Trealose	+	+	+
Rafinose	-	+	-
Xilose	+	+	+
Melibiose	+	-	+
Celobiose	-	-	-
Inositol	-	-	-
Ducitol	+	-	+

**Tabela 9.** Resultado do zimograma para a cepa LV-01.

Zimograma	Cepas		
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	LV-01
Glicose	+	+	+
Maltose	-	+	-
Sacarose	-	-	-
Galactose	-	-	-
Lactose	-	-	-
Trealose	-	+	-

**Tabela 10.** Resultado do auxanograma para o nitrogênio da estirpe LV-01.

Auxanograma (Nit)	Cepas	
	<i>C. parapsilosis</i>	LV-01
Peptona	+	+
KNO <sub>3</sub>	-	-
Urease	-	-

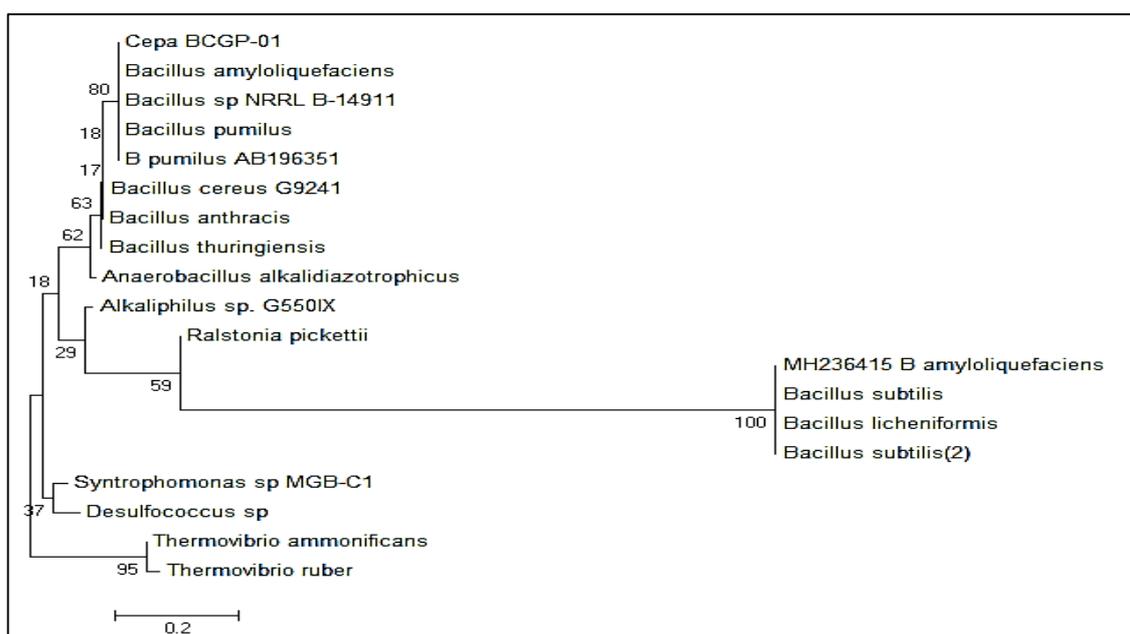
Nit - nitrogênio.

A fermentação dos açúcares simples (zimograma) é utilizado rotineiramente em laboratórios de micologia clínica e ambiental para a identificação de leveduras conforme preconizado pela ANVISA (2013). Já a capacidade de o micro-organismo utilizar diferentes fontes de nitrogênio (auxanograma para o nitrogênio) é determinante para a diferenciação de grupos de leveduras (SIDRIM, 2004).

### 5.5.2. Cepa BCGP-01

O DNA da cepa BCGP-01 foi extraído e sequenciado utilizando os primers universais que deveriam gerar uma sequência maior que 1000 pares de bases. No entanto, os resultados do sequenciamento geraram uma sequência útil do 16S de aproximadamente de 669 pb. A Figura 8 sugere que a sequência da BCGP-01 analisada está associada às espécies de *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*. A identificação da cepa feita pela referida avaliação filogenética, no entanto, é imprecisa por causa do tamanho do segmento analisado que não foi suficiente para detectar diferenças entre as duas espécies citadas. Dentro desse grupo de bactérias, no entanto, encontram-se as cepas MF176945 e LC065162 (entre outras) que foram depositadas no “NCBI Database” e reportadas em comunidades biodegradadoras de diesel e de ambientes anaeróbios, respectivamente. Nota-se na árvore (Figura 8) a presença de MH236415 supostamente identificada como *B. amyloliquefaciens*, no entanto, essa sequência foi obtida através de consulta no NCBI *database* que não possui o compromisso de exatamente identificar qualquer sequência nela depositada. Essa característica é o que distingue o site NCBI do Silva DATABASE.

**Figura 8.** Árvore filogenética de distância (*Neighbour Joining*) comparando um segmento de 669 pb do 16S rRNA da Cepa BCGP-01 com as sequências “tipo” obtidas no site “Silva RNA Database”. O alinhamento e análise de distância foi executado utilizando o programa MEGA IV, Kimura 2-parametros e *bootstrap* de 1000 repetições (valores, em percentagens, que são mostrados nas junções). A árvore foi enraizada utilizando as sequências de *T. ammonificans* e *T. ruber*.



A prevalência do gênero *Bacillus* spp. em amostras de água produzida é corroborado pelos dados na literatura (OLIVEIRA et al., 2011; SETTE et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2009).

Sette et al. (2007) analisando a composição das comunidades microbianas em reservatórios de petróleo, utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo, identificaram 9 diferentes grupos taxonômicos. Estes micro-organismos mostram-se relacionados à *Acidithiobacillus* spp, *Arcobacter* spp, *Alicyclobacillus* spp, *Bacillus* spp, *Acinetobacter* spp, *Halanaerobium* spp, *Leuconostoc* spp, *Marinobacter* spp, *Rhodococcus* spp, *Streptomyces* spp, *Propionibacterium* spp e *Streptococcus* spp.

Bactérias aeróbias também foram relatadas por Lopes (2010) estudando a diversidade taxonômica de bactérias isoladas da água de formação de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos. Os principais gêneros isolados foram: *Marinobacter* spp, *Halomonas* spp, várias espécies de *Bacillus* spp, *Citricella* spp, *Stenotrophomonas* spp, *Achromotobacter* spp, *Micrococcus* spp, *Kocuria* spp, algumas espécies de *Streptomyces* spp, e *Staphylococcus* spp

Silva et al. (2013) estudando a diversidade de comunidades microbianas em amostras de petróleo da Bacia do Potiguar isolaram vinte e três cepas bacterianas aeróbias por meio de cultivo que pertenciam a diversos gêneros entre eles: *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp e o *Streptomyces* spp.

## 5.6. Produção de bioprodutos

### 5.6.1. Índice de emulsificação (E24)

Os critérios utilizados para selecionar bactérias produtoras de biossurfactantes são: habilidade de produzir emulsificado utilizando o caldo de cultura, reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m, além de manter pelo menos 50% do volume da emulsão original por 24h após sua formação (DAMIÃO, 2012).

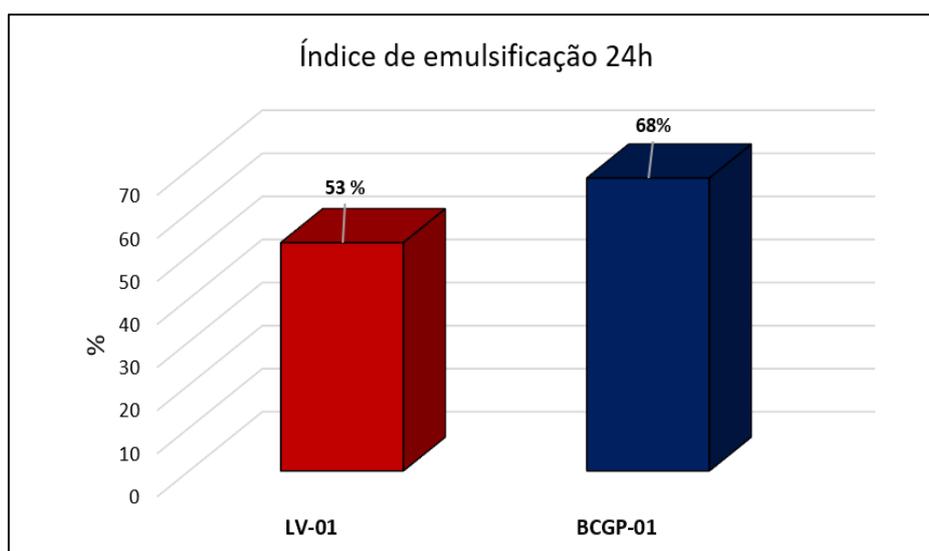
A Figura 9 mostra a quantificação em porcentagem da produção de biossurfactante através do método de índice de emulsificação. Comparando as linhagens entre si observou-se que as cepas LV-01 e BCGP-01, apresentaram índice de emulsificação acima de 50% após 24 horas. A produção de biossurfactante para

essas cepas variou entre 53 e 68%, sendo a maior produção observada para a cepa BCGP-01 (68%).

Esses valores são semelhantes aos encontrados por Farias (2016), que estudando a produção de bioativos por bactérias aeróbias isoladas de água de produção, obteve índice de emulsificação maior que 60% com uma cepa de *Bacillus* spp.

O caldo livre da levedura LV-01 não foi capaz de sustentar a emulsão produzida, por outro lado, a estirpe BCGP-01 manteve emulsão estável por mais de 90 dias de produção. A produção de emulsões estáveis permite ao micro-organismo se aderir a superfícies hidrofóbicas muito fortemente, com implicações na capacidade de biodegradação (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

**Figura 9.** Índice de emulsificação das cepas LV-01 e BCGP-01.



Fonte: Próprio autor.

#### 5.6.2. Análise da tensão superficial

Foram efetuadas medidas da tensão superficial para avaliar a eficiência do biossurfactante produzido pelas cepas isoladas da água produzida. A tensão superficial do controle (meio de cultura sem inóculo) foi de 53,2 mN/m. Bons produtores de biossurfactante reduzem a tensão superficial a 40mN/m ou menos (HABA et al., 2000). O caldo de cultivo da cepa BCGP-01 mostrou uma redução de 41% na tensão superficial do meio (29,6 mN/m). Gouveia et al. (2003), estudaram

bactérias produtoras de biossurfactante que foram isoladas de poços de petróleo. Os autores relatam que *Pseudomonas* spp. produtoras de ramnolipídeos que foram isoladas desse ambiente são capazes de produzir um caldo de cultivo com uma tensão superficial entre os valores de 28,2 e 34,05 mN/m, portanto, a BCGP-01 se assemelha ao rendimento produtivo dessas bactérias.

Joshi et al. (2013) estudaram a produção de biossurfactante por cepas do gênero *Bacillus* spp isoladas de habitats diversos (águas termais, oceano, poços de petróleo, bomba de gasolina, etc.). Os autores relatam que das 24 cepas estudadas a em todas a tensão superficial variou entre os valores de 28 e 35 mN/m. Nesse grupo encontra-se também bactérias presentes em ambiente com alta salinidade e/ou temperatura. *B. licheniformis* TT42 foi a que apresentou a maior redução na tensão superficial do caldo livre de células (28 mN/m). Segundo os autores, esses resultados sugerem que as bactérias desse gênero possuem um potencial biotecnológico claro para ser aplicado nos processos de recuperação de petróleo em poços maduros.

Os biossurfactantes apresentam várias propriedades úteis para as indústrias de processamento tais como a atividade superficial, emulsificação, baixa toxicidade e biodegradabilidade (NITSCHKE; COSTA, 2007). Além disso, alguns biossurfactante vêm demonstrando atividade antimicrobiana contra vários micro-organismos tais como as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*; Bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*; e os fungos: *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* e *Mucor* spp.

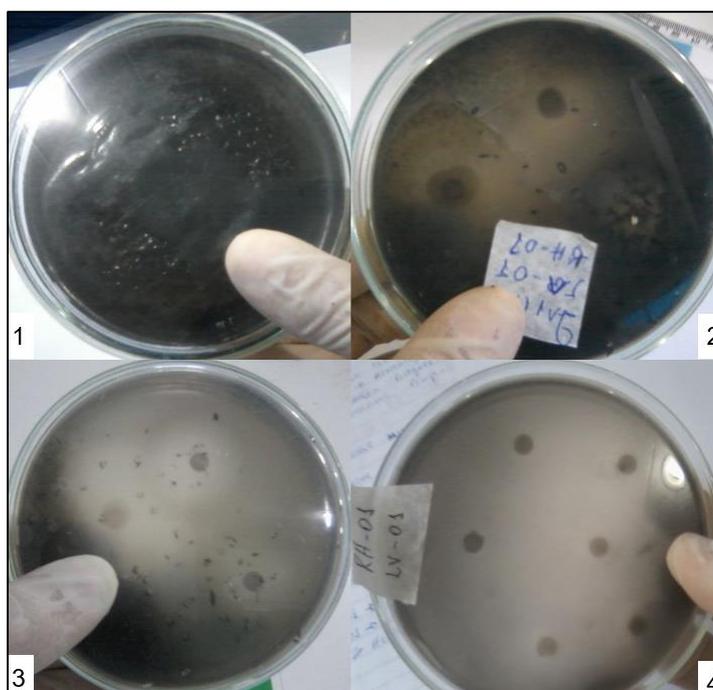
O mecanismo da atividade antimicrobiana dos surfactantes não é completamente compreendido, porém Ortiz et al. (2006), sugerem que o local de ação seria a membrana celular. Esses compostos possuem um carácter anfipático que permite a sua interação com fosfolipídeos aumentando assim a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, causam danos a integridade da célula (SÁNCHEZ et al., 2006; SOTIROVA et al., 2008).

### 5.6.3. Atividade antimicrobiana

#### 5.6.3.1 Teste em placa

O resultado dos testes laboratoriais de antagonismo em placas é ilustrado na Figura 10. Os resultados mostram que as duas cepas isoladas possuem potencial inibidor contra a bactéria *Desulfovibrio* spp.. Foram observados halos de até 10 mm de diâmetro produzidos pela presença da cepa BCGP-01 e de 20mm pela presença da levedura LV-01.

**Figura 10.** Teste de antagonismo em placas por sobrecamada das cepas contra a cepa *Desulfovibrio* spp..



**1** - Controle positivo; **2** - Inibição caldo livre (10µL) 50x; **3**- Inibição caldo livre concentrado (100x); **4**-Inibição caldo livre concentrado (200x).

Os valores de halos de inibição encontrados no presente trabalho para a cepa BCGP-01 são superiores aos observados por Magalhães (2014), que trabalhou com bactérias que apresentavam atividade antagonista às BRS. A referida autora também trabalhou com cepas isoladas de água produzida de poços de petróleo. No trabalho citado, foi observado que as bactérias *Halomonas aquamarina* e *Marinobacter*

*hydrocarbonoclasticus* produziram um halo de inibição que variou de 7 a 9 mm de diâmetro.

Em seu artigo Korenblum e colaboradores (2005) descreveram testes com as cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. firmus*, que também foram isoladas de reservatório de petróleo. Os autores observaram que os extrato concentrados microbianos produziram halos de inibição de 3mm.

A inibição mais expressiva encontrada no presente trabalho, 20mm para a levedura LV-01, foi superior ao relatado por Rosa et al. (2013). Os autores estudaram a ação antagonista de bactérias do gênero *Streptomyces* spp. contra bactérias envolvidas em processos biocorrosão. Neste trabalho foi relatado que o maior halo de inibição foi de 12 mm de diâmetro. Embora essa comparação seja uma indicação do potencial antimicrobiano das substâncias produzidas pelos micro-organismos, deve-se, no entanto, destacar que o diâmetro de inibição não está apenas associado a potência da substância inibidora. O tamanho do halo inibidor pode também estar relacionado à concentração produzida do inibidor, que pode variar dependendo das condições de meio e cultivo.

Kim e colaboradores (2002) descrevem substâncias produzidas por leveduras do gênero *Candida*, como sendo um agente antimicrobiano eficiente contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus mutans*, e *Propionibacterium acne*, em concentrações que variaram de 0,5µg/mL à 4µg/mL. Em outro trabalho, os soforolipídeos derivados de *C. bombicola* inibiram o crescimento das cepas *Escherichia coli* (ATCC 8739); *P. aeruginosa* (ATCC 9027); *S. aureus* (ATCC 6358) e *B. subtilis* (ATCC 6633) (JOSHI-NAVARE, 2013).

#### 5.6.3.2. Teste de toxicidade aguda por desidrogenase utilizando caldo livre de células (BCGP-01 e LV-01)

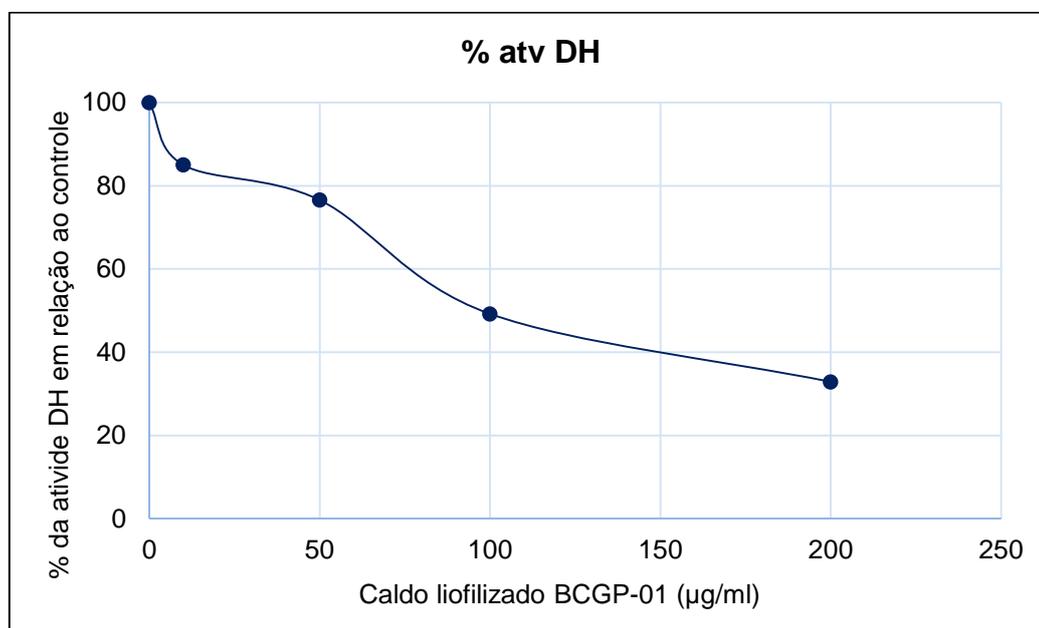
Os caldos liofilizados das cepas BCGP-01 e LV-01 apresentaram atividade inibitória contra as BRS, com base na atividade da desidrogenase (DH) durante a incubação de 6 horas nas concentrações de 100µg/mL e 200µg/mL, respectivamente. O resultado é analisado de acordo com a formação e acúmulo de formazan no meio que é gerada pela oxidação do INT (Tabela 11) (FUKUI; TAKII, 1989).

**Tabela 11.** Redução da Atividade desidrogenase pelas cepas BCGP-01 e LV-01.

Concentração liofilizado	Atividade Desidrogenase (DH)	
	BCGP-01	LV-01
0 µg/mL	100%	100%
10 µg/mL	85%	92%
50 µg/mL	76,5%	77,4%
100 µg/mL	49,2%	69,3%
200 µg/mL	32,8%	49%

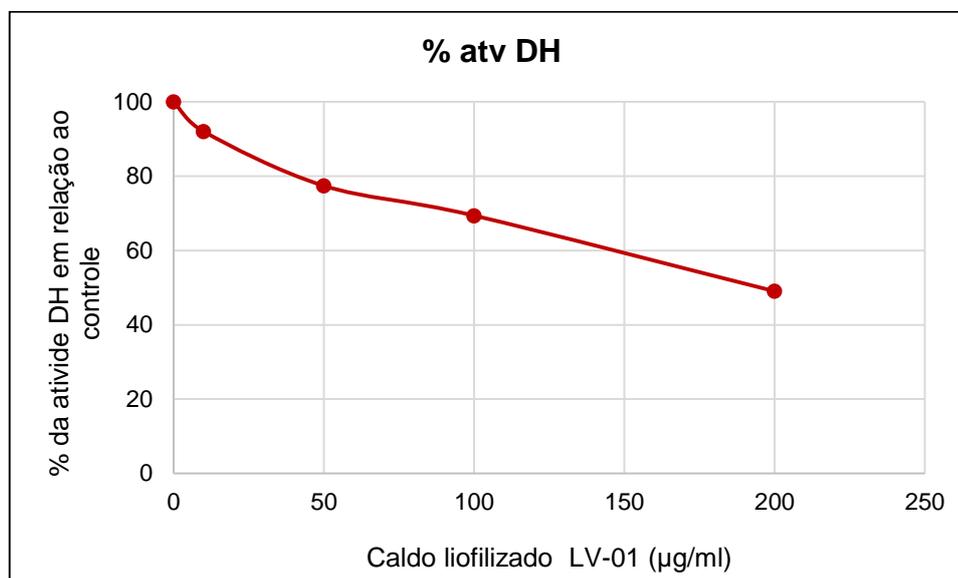
O decréscimo da atividade desidrogenase foi linear, com um coeficiente de determinação de 92% ( $r^2 = 0,92$ ), comprovando o efeito inibidor do caldo liofilizado da cepa BCGP-01. Esse resultado corrobora com os reportados nos trabalhos ROSA, 2013; JOSHI-NAVARE, 2013; ZHANG et al., 2017 (Figura 11). Os ensaios com a cepa LV-01 indicaram que a concentração de 200µg/mL foi capaz de reduzir em 50% ( $EC_{50}$ ) a atividade da desidrogenase da cultura de BRS (Figura 12).

**Figura 11.** Efeito da ação inibitória do caldo livre de células do cultivo de BCGP-01 na atividade da desidrogenase de uma cultura mista de BRS que também foram isoladas de poço maduro de petróleo.



Fonte: Próprio autor

**Figura 12.** Efeito da ação inibitória do caldo livre de células do cultivo da cepa LV-01 na atividade da desidrogenase de uma cultura mista de BRS que também foram isoladas de poço maduro de petróleo.



Fonte: Próprio autor

## 5.7. Teste de toxicidade aguda contra a atividade da desidrogenase utilizando óleos essenciais

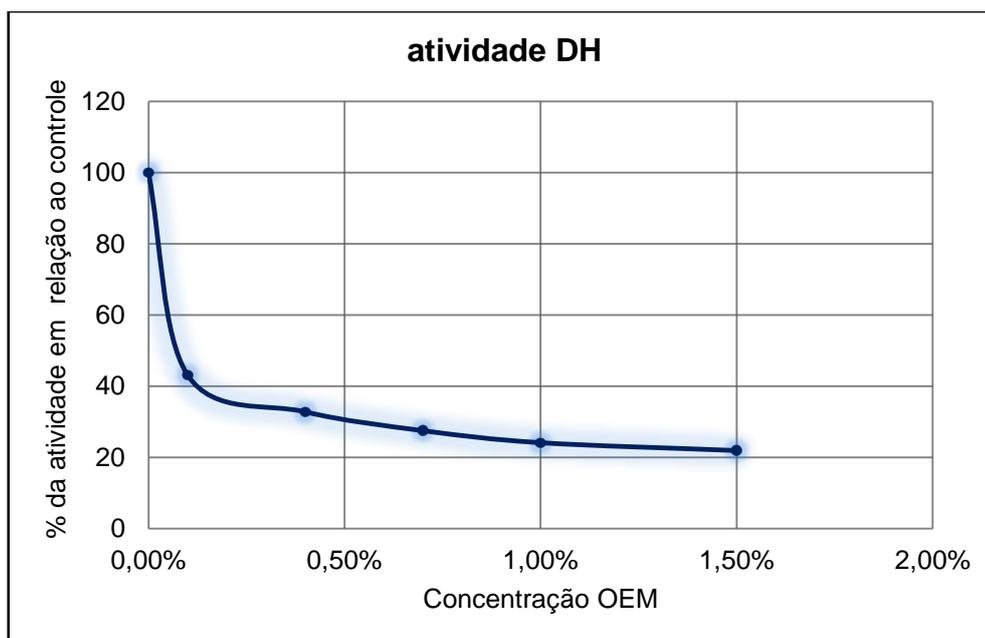
### 5.7.1. Testes de toxicidade da desidrogenase com óleo essencial de melaleuca (OEM)

O óleo da árvore do chá é um óleo essencial que é obtido a partir da planta *Melaleuca alternifolia* por destilação a vapor, contém vários compostos voláteis, como terpinen-4,  $\alpha$ -terpineol e 1,8 cineole, que confere a esse óleo essencial propriedades antimicrobianas (LI et al., 2017). Li e colaboradores (2017) demonstraram a ação do óleo essencial de melaleuca (OEM) contra enzimas mitocondriais de fungos, alterando, assim, além da morfologia da mitocôndria, sua fisiologia.

A inibição de BRS pelo OEM foi demonstrada pelo teste de toxicidade aguda utilizando um sal de tetrazolium (INT) (Figura 13). As concentrações usadas foram de: 0,1%; 0,4%; 0,7%, 1,0%, 1,2% e 1,5%. Sendo o tempo de exposição ao agente inibidor de 6h (CHINALIA et al., 2008). Pela análise do gráfico é possível observar que na concentração de 0,1%, o óleo essencial de melaleuca reduziu em 50% a atividade da desidrogenase do consorcio de bactérias redutoras de sulfato que foram isoladas de poços de petróleo.

Shi et al. (2016) utilizaram o OEM contra cepas de *Staphylococcus aureus* em concentrações de 1g/L à 2g/L, sendo considerado um resultado satisfatório. Ouyang e colaboradores (2016) utilizaram OEM e constataram uma redução na biossíntese de ergosterol, reforçando a teoria dos mecanismos de ação do OEM sobre a membrana plasmática e seus componentes.

**Figura 13.** Redução exponencial da atividade DH do OEM.

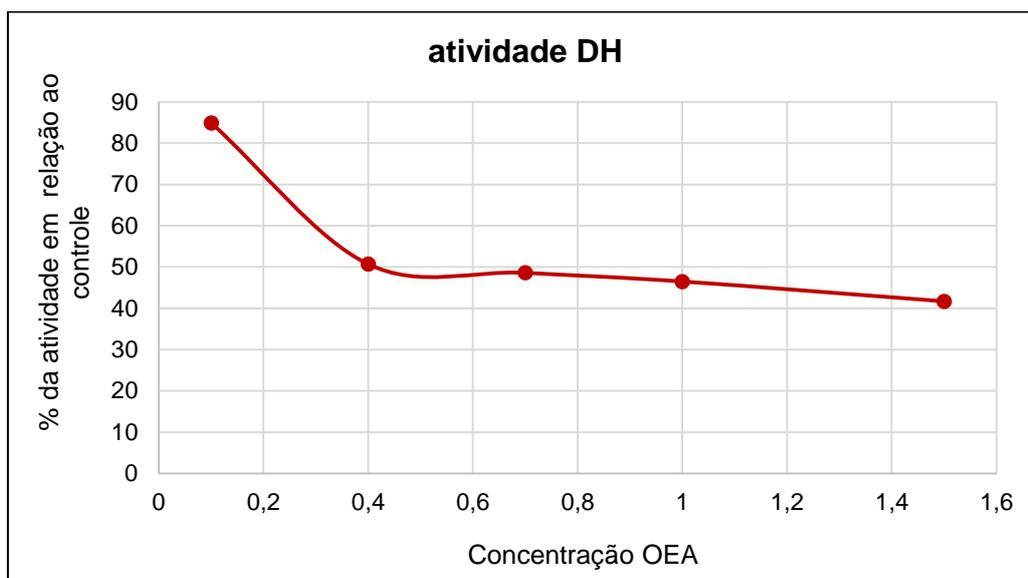


Fonte: Próprio autor

#### 5.7.2. Teste de toxicidade da desidrogenase com óleo essencial de alecrim (OEA)

A inibição de BRS pelo OEA foi demonstrada pelo teste de toxicidade aguda utilizando o INT, mostrando uma redução na atividade da desidrogenase, conforme observado na Figura 14.

**Figura 14.** Redução exponencial da atividade DH do OEA.



Fonte: Próprio autor

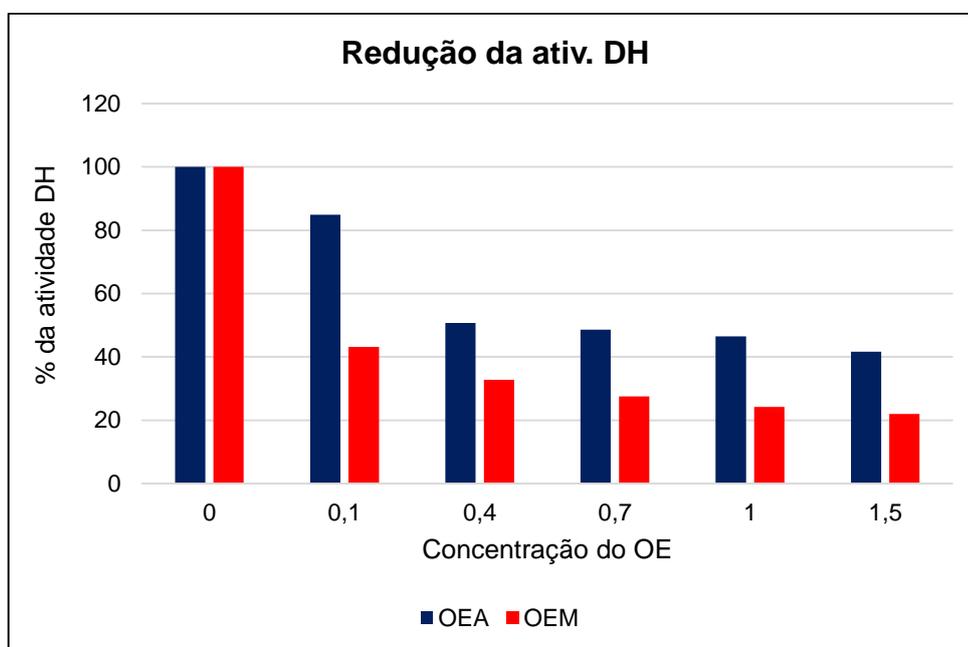
As concentrações usadas foram de: 0,1%; 0,4%; 0,7%, 1,0%, 1,2% e 1,5%. Sendo o tempo de exposição ao agente inibidor de 6h (CHINALIA et al., 2008). Pela análise da figura observa-se que a concentração efetiva do óleo essencial de alecrim que reduziu a atividade da desidrogenase em 50% foi de 0,4%.

Bajpai et al. (2009) utilizando compostos naturais para o controle de patógenos alimentares, conseguiram inibir o crescimento desses micro-organismos, obtendo halos de inibição de 10-18mm, utilizando concentrações entre 125 a 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Nesse trabalho, a concentração que atingiu a concentração efetiva que afetou 50% da atividade de desidrogenase quando exposta ao OEA foi de 3200  $\mu\text{g/mL}$ . Em outro trabalho, Jordan et al. (2013) Avaliaram as propriedades dos compostos fenólicos do óleo essencial de alecrim (OEA) e concluíram que a atividade antimicrobiana desse composto, se deve a altas concentrações de compostos polifenólicos como: ácido rosmarínico, hesperidina e carnosol, além de 1,8-cineole, cânfora e  $\alpha$ -pinene. Bajalan e colaboradores (2017) estudando a atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais obtidos de *Rosmarinus officinalis*, obtiveram resultados de inibição em bactérias Gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), e em bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), com zona de inibição de 18,5mm contra *E. coli*. Segundo os autores, os óleos essenciais de alecrim têm notável atividade como agente antimicrobiano. O óleo essencial de alecrim é eficaz para a inibição ou controle de bactérias, especialmente *E. coli*, e pode ser usado

como agente antimicrobiano natural. No entanto, não foi encontrado nenhum relato científico que relacionasse a concentração desse óleo com a redução da atividade de desidrogenase. A Figura 15 faz uma comparação da atividade desidrogenase do OEA x OEM.

É possível observar que ambos óleos essenciais demonstraram atividade inibitória frente as BRS com baixas concentrações dos biocompostos. Pode-se observar ainda, que a adição de 0,1% do OEM foi capaz de reduzir em 50% a atividade desidrogenase das BRS. Dessa forma, o óleo essencial de melaleuca foi selecionado para teste de interação com etanol.

**Figura 15.** Comparação da atividade desidrogenase OEA x OEM.



Fonte: Próprio autor

É possível observar que ambos óleos essenciais demonstraram atividade inibitória frente as BRS com baixas concentrações dos biocompostos. Pode-se observar ainda, que a adição de 0,1% do OEM foi capaz de reduzir em 50% a atividade desidrogenase das BRS. Dessa forma, o óleo essencial de melaleuca foi selecionado para teste de interação com etanol.

### 5.7.3. Teste de toxicidade aguda da desidrogenase para avaliar a interação OEM e etanol

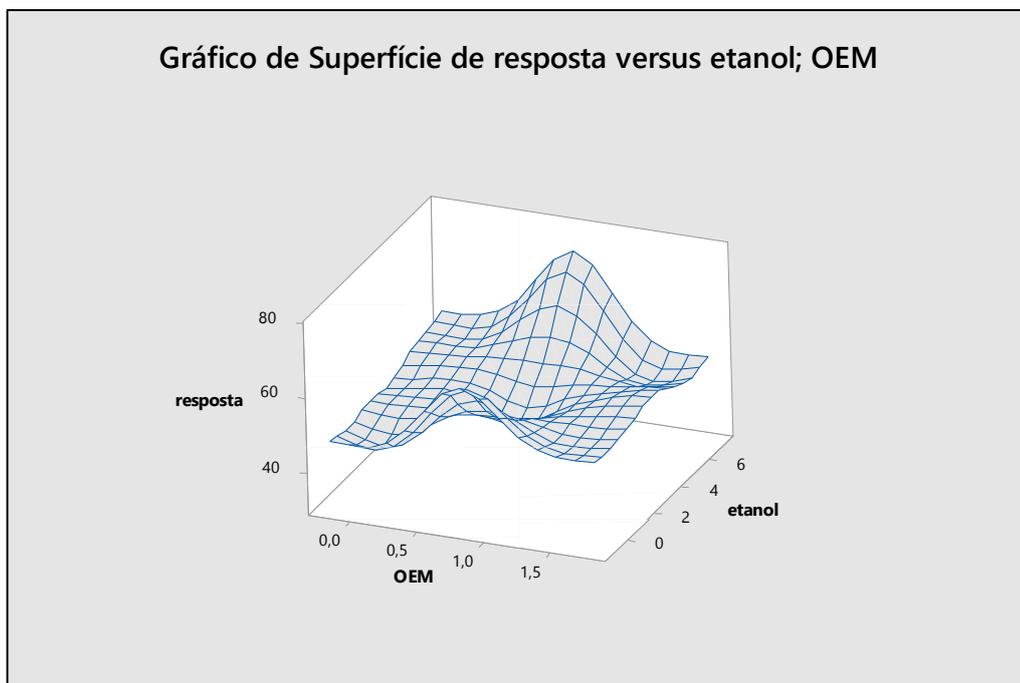
Para o teste de interação OEM/etanol, foi montado um experimento fatorial 2K, onde K=2 como demonstrado na Tabela 12. Para elucidar uma real interação entre os compostos testados, foram adicionados pontos axiais e repetições no ponto central, a fim de estimar o erro padrão do experimento.

**Tabela 12.** Planejamento fatorial 2x2 dos ensaios com OEM/etanol.

Ensaio	Ponto	Etanol	OEM	Resposta %
1	0	3,05	0,80	45,0
2	1	6,00	1,50	47,5
3	1	6,00	0,10	50,8
4	0	3,05	0,80	31,5
5	1	0,10	0,10	43,4
6	0	3,05	0,80	49,2
7	1	0,10	1,50	51,2
8	-1,4	3,05	0,00	46,9
9	-1,4	0,00	0,80	67,3
10	1,4	3,05	1,79	55,6
11	0	3,05	0,80	44,6
12	0	3,05	0,80	45,3
13	1,4	7,22	0,80	74,1
14	0	3,05	0,80	43,3

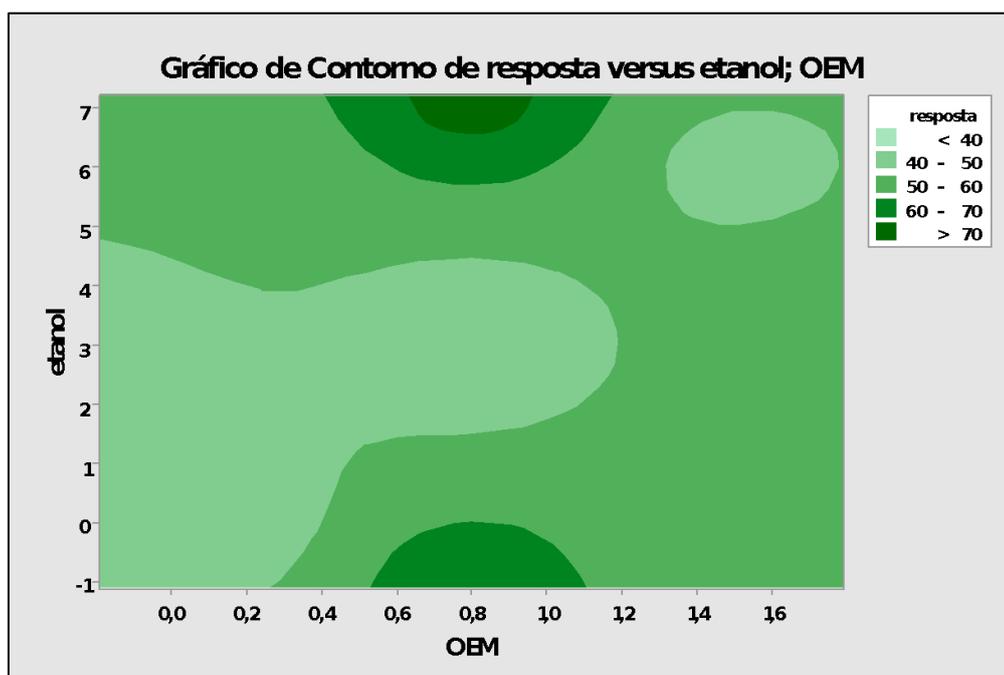
Os resultados da interação OEM/etanol, são apresentados nas Figuras 16, 17 e 18.

**Figura 16.** Resultado do teste de superfície de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de óleo (%OEM, v/v) e a concentração de etanol (% v/v).



Fonte: Próprio autor

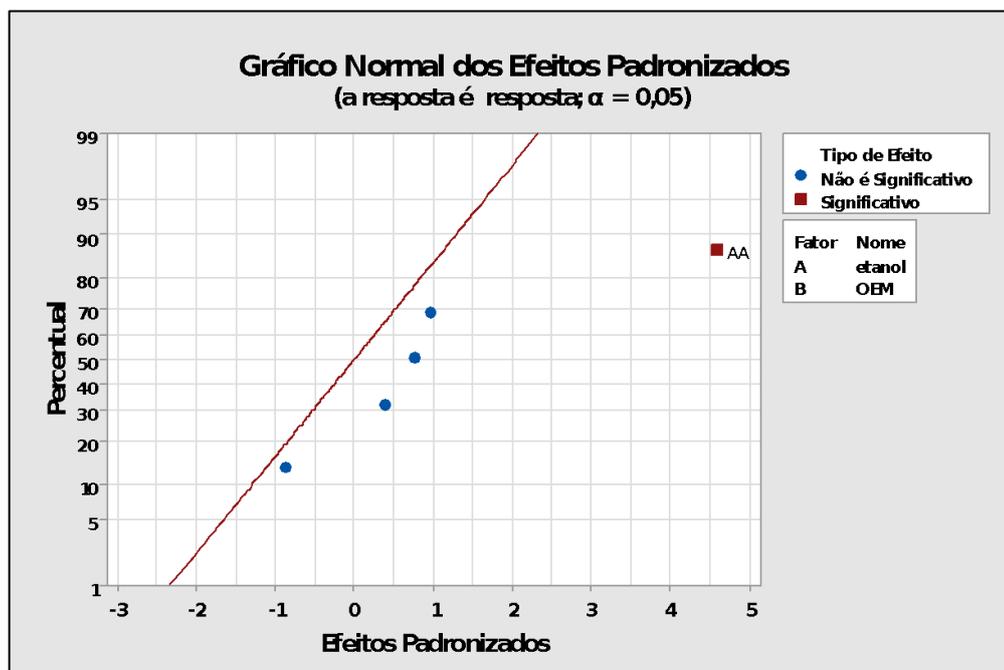
**Figura 17.** Gráfico de contorno de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de óleo (%OEM, v/v) e a concentração de etanol (% v/v).



Fonte: Próprio autor

Pela análise das figuras, pode-se observar que os compostos óleo essencial de melaleuca e etanol, não apresentaram interação significativa na redução da atividade desidrogenase, com consequente inibição de BRS. Na verdade, é possível notar um efeito sinérgico positivo da interação entre o solvente e o óleo na atividade da enzima desidrogenase. Por outro lado, o etanol tem sido demonstrado como um adjuvante na ação antimicrobiana de vários compostos descritos na literatura (CHINALIA et al., 2018). Chinalia et al. (2018) estudando o impacto potencial da utilização do surfactante lauril glicosídeo e um co-surfactante alcoólico na atividade das BRS, na recuperação avançada de petróleo, observaram que valores superiores a 6,5% de etanol demonstrou capacidade de controlar o consumo de sulfato pelas BRS. Esses resultados diferem dos encontrados no presente trabalho. Sendo um solvente que interagem bem com compostos polares, é provável que o álcool etílico tenha solubilizado componentes do OEM alterando assim as propriedades antimicrobianas de determinados compostos presentes no óleo essencial de melaleuca.

**Figura 18.** Gráfico normal dos efeitos padronizados mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de óleo (%OEM, v/v) e a concentração de etanol (% v/v).



Fonte: Próprio autor

## 5.8. Testes de toxicidade aguda para desidrogenase com inibidores análogos de sulfato

Os compostos fenólicos, tais como o ácido gálico, ácido salicílico, há muito vem sendo estudados pelas suas atividades antimicrobianas, assim como ácido oxálico que apresenta uma grande afinidade pelo cálcio (oxalato de cálcio), bem como a outros metais da família 2A como é o caso do magnésio (importante metal presente na enzima *APSr*), funcionando assim, como quelante (MELO et al., 2008; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, 2014).

Os inibidores testados foram: ácido oxálico, ácido gálico e ácido salicílico, selecionados a partir de análise de sua estrutura 3D em ensaios de dinâmica moléculas apresentaram resultados que parecia permitir um encaixe com a enzima *APS-reductase*, servindo como substância análoga de sulfato e de propriedades quelantes, sendo assim a hipótese proposta: essas substâncias são capazes de inibir a atividade da desidrogenase de BRS. Foram 16 testes no total, e quando em mistura, a soma total das substâncias no teste não deveria passar de 500µg/mL, ou seja, esse valor deveria ser distribuído entre as substâncias utilizadas, conforme descrito na metodologia (Tópico 4.4.).

As associações entre os ácidos orgânicos, ácido gálico e ácido salicílico não se mostraram eficientes. Já as associações contendo o ácido oxálico sinalizaram para uma provável inibição dos BRS. Sendo assim, o ácido oxálico foi escolhido para testes em associação com o BHA e HEDTA que mostraram resultados satisfatórios em relação a inibição de BRS (Tabela 13).

**Tabela 13.** Ação do ácido oxálico isolado e, em combinação, frente às BRS.

Concentração (µg /mL)	Pop. BRS (cel/mL)	Ácido oxálico			
		Individualmente	Com BHA	Com HEDTA	MIX
500	10 <sup>4</sup>	+	-	+	-
500	10 <sup>7</sup>	-	-	+	-
1000	10 <sup>4</sup>	+	+	+	+
1000	10 <sup>7</sup>	+	-	+	+

**Pop.:** população; **+**: inibição positiva; **-**: inibição negativa.

Com base na análise da tabela podemos observar que o ácido oxálico apresentou atividade antagonista aos BRS quando testado individualmente e em associações, sendo que quando associado com o BHA a inibição ocorreu em populações de  $10^4$  cel/mL e com altas concentrações de inibidor. Os melhores resultados foram observados quando esse ácido orgânico foi testado em associação com o HEDTA, tendo ação bactericida contra populações de até  $10^7$  cel/mL de BRS em ambas as concentrações.

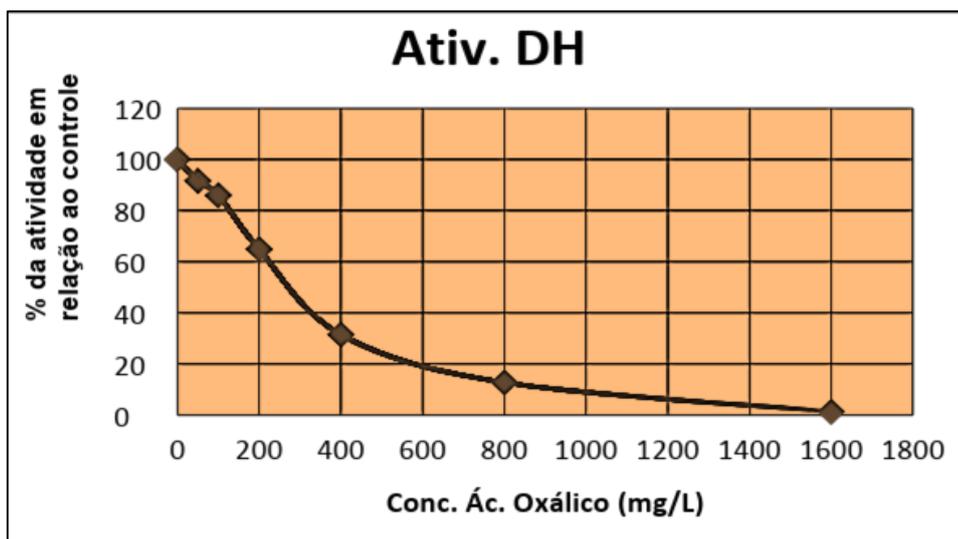
Ainda analisando a tabela, pode-se observar que o teste de inibição ácido oxálico mais *MIX* (BHA/HEDTA), só apresentou atividade antimicrobiana em altas concentrações. O HEDTA se mostrou um bom potencializador da atividade antimicrobiana de compostos naturais. Esse quelante apresentou atividade sinérgica tanto com o BHA quanto com o ácido oxálico.

#### 5.8.1. Ácido oxálico e HEDTA

Diante dos resultados obtidos com os agentes inibidores, o ácido oxálico e HEDTA, foram selecionados como os mais promissores para a realização de testes de toxicidade aguda para determinar as concentrações efetivas para 50% de microorganismos ( $EC_{50}$ ).

O teste de toxicidade aguda da atividade desidrogenase para o ácido oxálico é apresentado na Figura 19.

**Figura 19.** Redução exponencial da atividade DH do ácido oxálico.

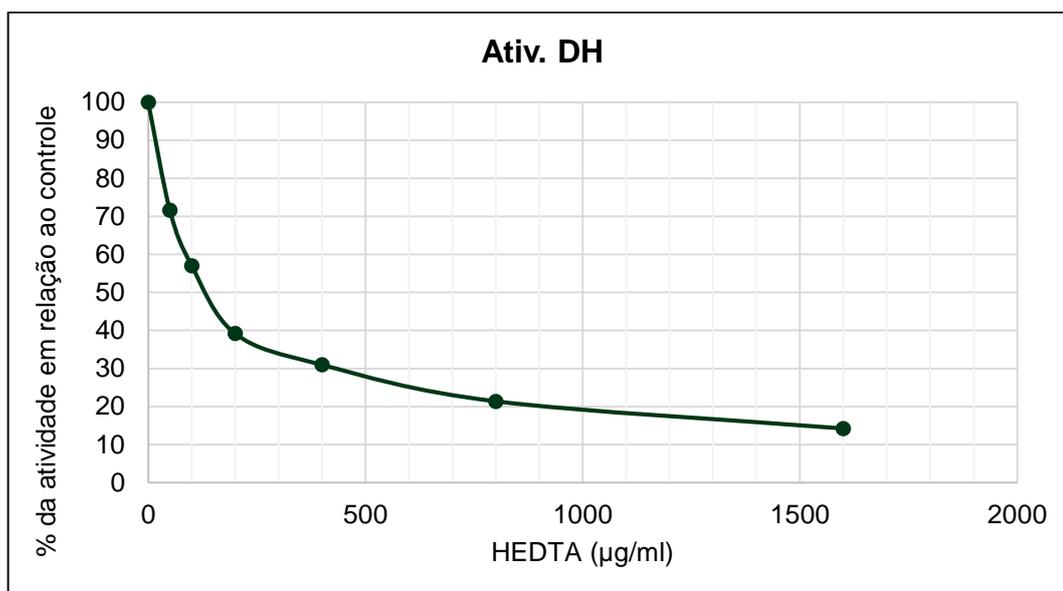


Fonte: Próprio autor

A concentração que afeta negativamente em 50% a atividade da desidrogenase da população de BRS ( $EC_{50}$ ) do ácido oxálico foi de  $265\mu\text{g/mL}$ . Esse composto apresentou uma redução exponencial da atividade da desidrogenase, com um coeficiente de relação de 0,98 ( $r^2$ ), demonstrando uma relação direta entre concentração do inibidor e diminuição da atividade DH.

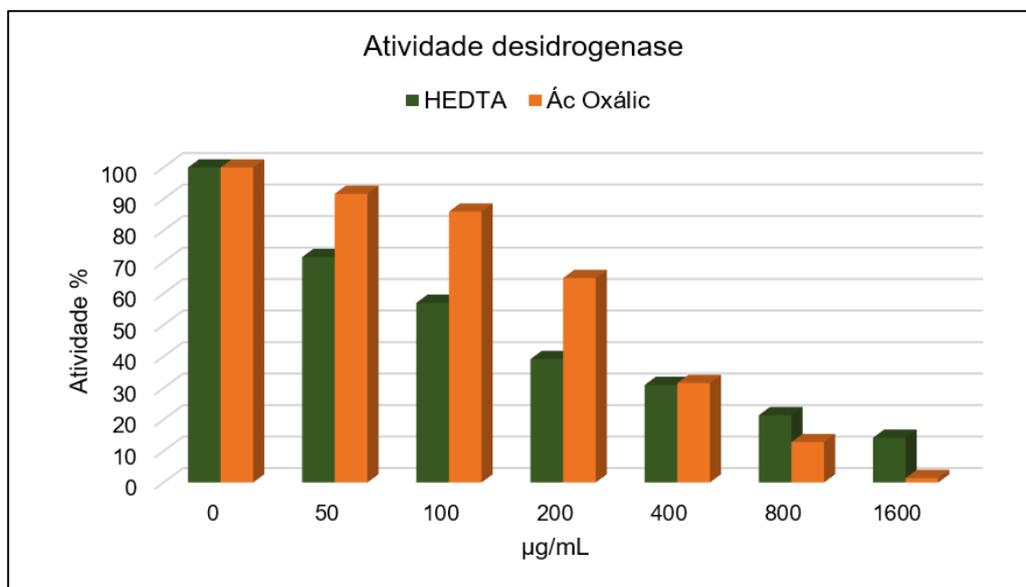
O resultado do teste de toxicidade aguda da atividade da desidrogenase para o HEDTA é apresentado na Figura 20. O HEDTA também apresentou uma redução da atividade DH de forma exponencial, mostrando um coeficiente de linearidade na fase logarítmica ( $R^2$ ) de 0,97. A concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) do HEDTA para a inibição da desidrogenase foi de  $125\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 20.** Redução exponencial da atividade DH do HEDTA.



Fonte: Próprio autor

A figura 21 relaciona a redução da atividade desidrogenase obtida pelo ác. oxálico e HEDTA. Os resultados obtidos para os compostos HEDTA ( $125\mu\text{g/mL}$ ) e ácido oxálico ( $265\mu\text{g/mL}$ ), reforçam a hipótese de que essas substâncias possuem um bom efeito inibitório frente às BRS. Ambos os inibidores, demonstraram uma queda exponencial da atividade da desidrogenase das BRS, resultando na diminuição da atividade celular.

**Figura 21.** Avaliação da atividade desidrogenase.

Fonte: Próprio autor

Ainda analisando a figura 21, é possível observar que o HEDTA foi mais eficaz que o ácido oxálico, mostrando uma menor concentração de  $EC_{50}$ , ou seja, foi necessária uma concentração menor de HEDTA para inibir 50% a atividade da enzima desidrogenase. No entanto, o resultado do teste estatístico (ANOVA) não identificou diferença significativa entre a variância das medias de ambos os tratamentos, acarretando, portanto, que os dois inibidores possuem a mesma efetividade (O F calculado foi de 0,15 e o F tabelado foi de 5,32, aceita-se a hipótese de que não há diferença entre os tratamentos).

5.8.2. Teste de toxicidade aguda da desidrogenase para avaliar a interação entre HEDTA e Ác. oxálico.

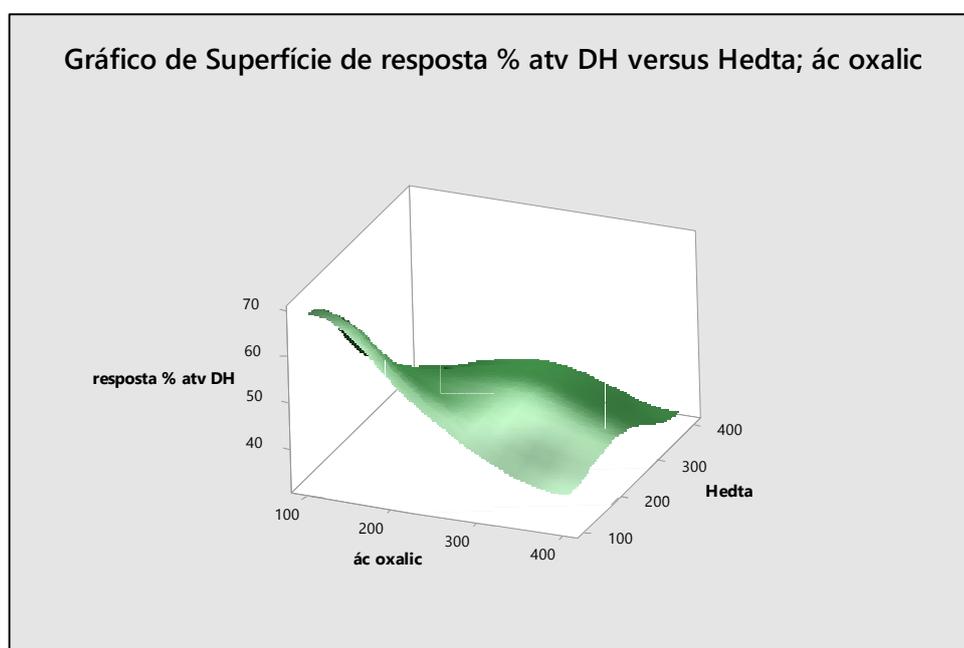
Para o teste de interação HEDTA/Ác. oxálico, foi montado um experimento fatorial 2K, onde  $K=2$  como demonstrado na Tabela 14. Para evidenciar a interação entre os compostos, foram adicionadas repetições no ponto central, a fim de calcular os erros e resíduos padronizados no experimento.

**Tabela 14.** Planejamento fatorial 2x2 dos ensaios com HEDTA/Ác. oxálico.

Ensaio	Ponto	HEDTA	Ác. oxálico	Resposta %
1	1	400	400	36,3
2	0	250	250	49,3
3	0	250	250	48,8
4	0	250	250	49,4
5	1	100	400	52,3
6	1	100	100	68,5
7	1	400	100	49,6
8	0	250	250	51,1

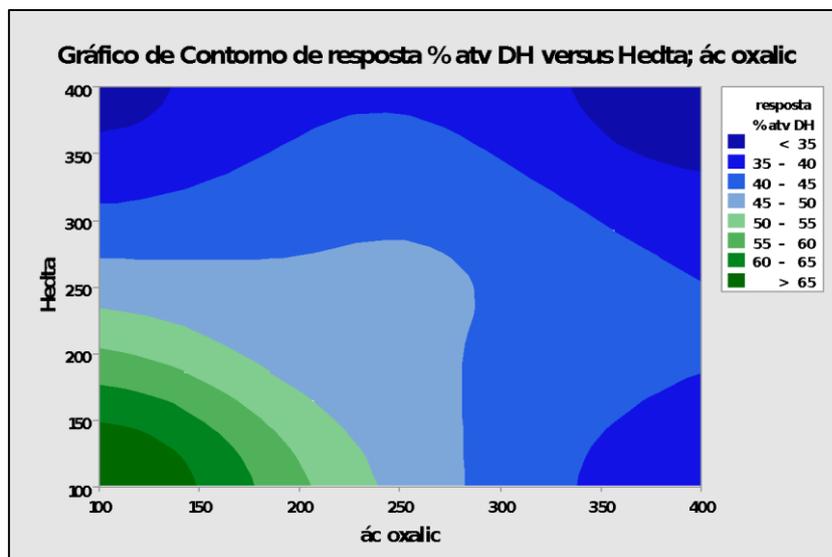
Os resultados da interação Ác. oxálico/HEDTA, são apresentados nas Figuras 22 e 23.

**Figura 22.** Resultado do teste de superfície de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de Ácido Oxálico (w/v) e a concentração de HEDTA(w/v).



Fonte: Próprio autor

**Figura 23.** Gráfico de contorno de resposta mostrando a relação entre a percentagem da atividade em relação ao controle (resposta) e a concentração de Ácido Oxálico (w/v) e a concentração de HEDTA (w/v).



Fonte: Próprio autor

Pela análise das figuras pode-se observar que os compostos HEDTA e Ác. oxálico, apresentaram interação significativa na redução da atividade desidrogenase, com consequente inibição de BRS. O gráfico da superfície de resposta mostra haver uma interação entre o ácido oxálico e o HEDTA.

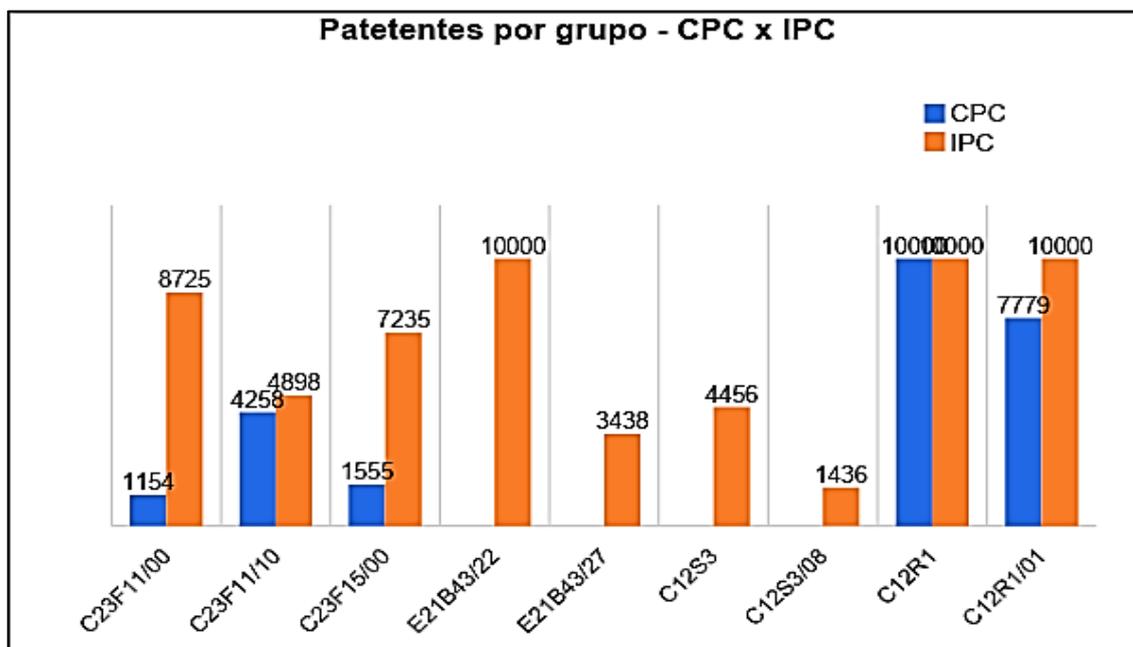
Segundo Aguiar; Ferraz (2008), o oxalato pode atuar diretamente na parede celular de micro-organismos, provocando perda da integridade celular. Estudos de dinâmica molecular mostram que o ácido oxálico apresenta-se como uma substância promissora para o controle de BRS por também competir com a molécula de sulfato para o encaixe no sítio ativo da enzima *APS-redutase* (SANTOS et al., 2013). O mesmo foi observado com a HEDTA. Em alguns estudos de modelagem molecular de docagem feitos entre o HEDTA e a enzima *APS-redutase* sugerem que esta substância é também competidora com o sulfato durante o processo de encaixe no sítio ativo dessa enzima (SANTOS et al., 2013). Com base nos resultados desse trabalho, portanto, observa-se que a ação combinada entre o ácido oxálico e o HEDTA possuem atividade sinérgica para a redução da atividade desidrogenase e consequentemente controlar o metabolismo de BRS.

## 5.9. Prospecção tecnológica

A quantidade de patentes depositada por grupos de classificação segundo o Banco Europeu de Patentes, nos mostra quantas patentes foram depositadas tanto pelo Corporate Patents Classification (CPC) quanto pelo International Patents Classification (IPC) (Figura 24).

A evolução por período do número de patentes depositadas a partir de 1990 até agosto de 2017. Os períodos de 1990-1995 e 2011-2015 apresentaram uma quantidade maior depósitos de patentes para a área envolvendo bioprocessos e medidas de controle das bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Figura 25).

**Figura 24.** Número de patentes sobre o tema do trabalho depositadas por banco de dados.

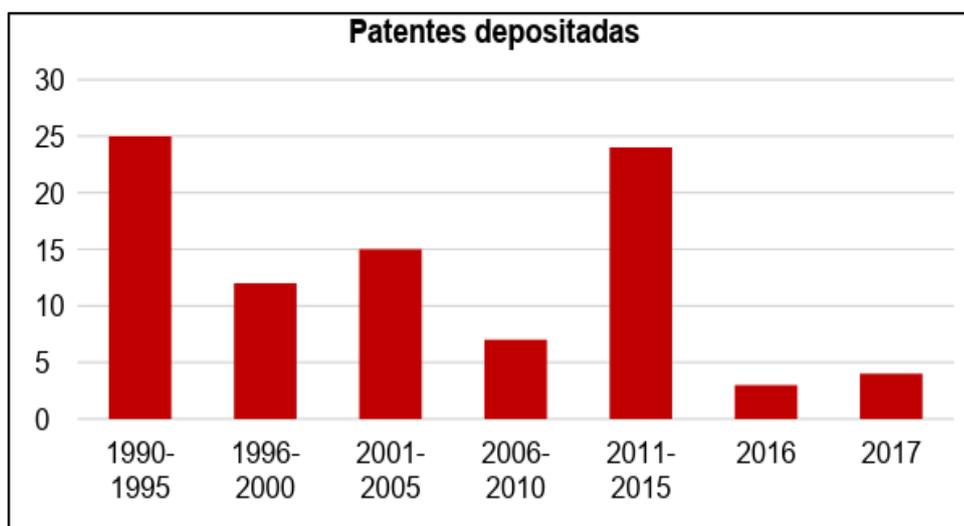


O processo de recuperação secundária, ocasionou um aumento muito grande da quantidade de água injetada nos poços, o que fez com que nas últimas décadas, uma busca por novas tecnologias e processos para o controle da produção biológica de sulfeto por BRS (biosulfetogênese).

Com base no gráfico 25 podemos observar que em dois momentos distintos tivemos um número superior de depósitos de patentes, um no início dos anos 90 onde ocorreu o agravamento do problema de corrosão (BENKA-COKER et al., 1995), e no período de 2011-2015 com o surgimento de novas tecnologias relacionadas aos processos envolvendo micro-organismos e/ou seus metabólitos (ALBUQUERQUE et

al., 2014; MORADI et al., 2015). As patentes depositadas tratam principalmente, de produtos e processos para o controle das BRS em sistemas de produção, armazenamentos e redes de transportes de óleo afim de inibir o processo de corrosão e acidificação do óleo devido a produção de ácido sulfídrico a partir da dissolução do sulfeto (BØDTKER et al., 2009).

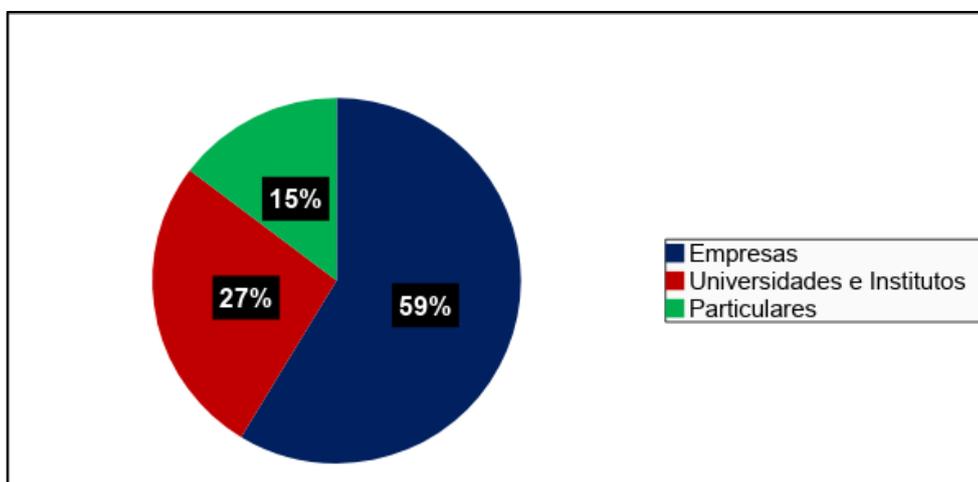
**Figura 25.** Número de patentes depositadas sobre o tema do trabalho por período.



Fonte: Próprio autor

Na Figura 26 o diagrama mostra a quantidade relativa dos detentores de patentes no período de 1990-2017.

**Figura 26.** Distribuição percentual dos detentores de patentes relacionadas à tecnologia pesquisada.



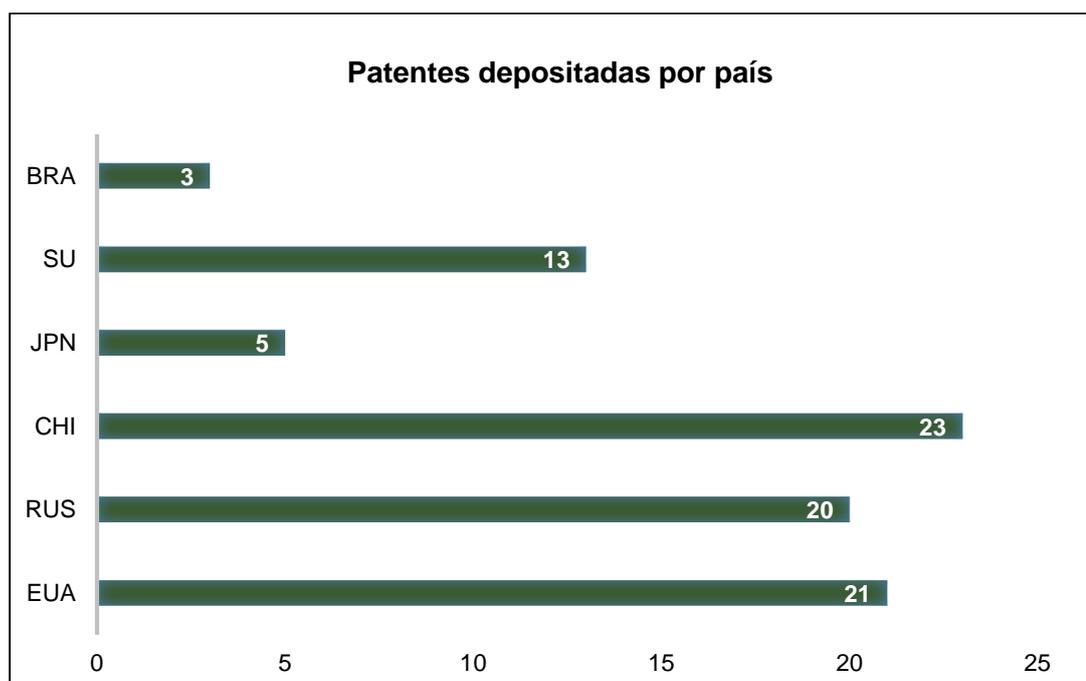
. Fonte: Próprio autor

Neste diagrama é verificado que 59% das patentes foram depositadas por empresas, 27% o depositante foram Universidades e Institutos de pesquisas; 15% foram depositadas por particulares, em geral, o próprio inventor.

O maior número de depósito é verificado em empresas do ramo de exploração de petróleo, embora na China a participação das Universidades é significativa. As pesquisas nas áreas biotecnológicas demandam grande quantidade de recursos financeiros e logísticos, de modo que as empresas privadas, com linha de atuação bem definida, se mantêm a frente nas pesquisas nessas áreas. Muitas vezes as empresas financiam projetos junto às universidades e institutos de pesquisas e recebem em contrapartida transferência de parte da tecnologia ou base tecnológica aplicável.

Na Figura 27 são apresentados os resultados que relacionam o número de patentes por país de origem do depositante. Nesta figura é identificada a predominante participação da China que no século XXI, surge como uma grande potência econômica e tecnológica, ultrapassando assim países tradicionais em desenvolvimento tecnológico como Estados Unidos e Rússia.

**Figura 27.** Distribuição do número de patentes sobre o tema do trabalho depositadas por país de 1990-2017.



Fonte: Próprio autor

Observamos que a China detém 23 patentes (27%) contra 21 patentes dos Estados Unidos (25%) e Rússia 20 patentes (21%), com base nessas informações podemos afirmar que apenas três países detêm mais de 75% do número de patentes depositadas. Outros países como o Japão (5 patentes) e o Brasil (3 patentes) seguem de longe no ranking de patentes depositadas relacionada a processos envolvendo bactérias redutoras de sulfato e mecanismos para seu controle. Embora a China e os Estados Unidos não sejam os maiores produtores de petróleo são, sem sombra de dúvida, os países com maior desenvolvimento tecnológico, o que justifica o maior número de patentes depositadas na área de controle de processos corrosivos e biosulfetogênese na indústria de petróleo. A Rússia vem em terceiro se utilizando de tecnologia remanescente da época da união Soviética.

A partir dos resultados encontrados para a prospecção tecnológica das patentes depositadas no Banco Europeu de Patentes foi verificada a grande força dos China no desenvolvimento e apropriação de tecnologias no tema investigado. De acordo com os dados levantados, China é o país com o maior número de patentes depositadas e maior número de depositantes. Os Estados Unidos e a Rússia são o segundo e terceiro países com maior número de patentes depositados, respectivamente.

Foram identificadas uma grande demanda por processos e tecnologias para controle de bactérias redutoras de sulfato em linhas de produção, armazenamento e transporte de óleo. Nas buscas foram identificadas patentes que tratam de técnicas para o controle da biosulfetogênese, responsável pela corrosão de materiais metálicos, geração de gás sulfídrico e perda da qualidade do óleo, baseado na eliminação das bactérias ou na inibição da atividade destas.

## 6. CONCLUSÃO

A existência de poços maduros de produção de petróleo com problema de biocorrosão é uma realidade na região do Agreste de Alagoinhas, e mostra a necessidade de desenvolvimento de alternativas menos nocivas para o controle e redução dos problemas causados pelas BRS.

O isolamento e a identificação de micro-organismos aeróbios possibilitaram avaliar a presença de uma microbiota com potencial biotecnológico, produtoras de biocompostos com atividades tensoativas e antimicrobiana. O uso de bioprodutos de origem microbiana mostraram ser bons candidatos na função de inibidores de BRS. Na literatura científica, alguns artigos já relatam a ação de alguns biossurfactantes com agentes antimicrobianos em especial contra bactérias Gram positivas.

Os óleos essenciais se mostraram uma boa alternativa no controle microbiano, podendo os mesmos serem utilizados na indústria de alimentos assim como em instalações industriais como inibidores de corrosão metálica causada por micro-organismos.

O Uso de HEDTA e do ácido Oxálico apresentaram resultados satisfatório se comparado com as concentrações de inibidores utilizados em trabalhos e patentes utilizados como referência.

Este trabalho serve como base para o desenvolvimento de diversos trabalhos com potencial aplicação na indústria do petróleo, tais como: (1) inibição de BRS por produção de substâncias microbianas com atividade antimicrobianas; (2) utilização de óleos essenciais em processos de controle microbiano; (3) e a elaboração de uma patente para o uso de substâncias para a inibição e controle da biossulfetogênese..

## REFERÊNCIAS

- ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112-119, 2016.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. **Int. Biodet. Biodegr**, v. 61, p. 182-195, 2008.
- ALBUQUERQUE, A. C.; ANDRADE, C.; NEVES, B. Biocorrosão - da integridade do biofilme à integridade do material. **Corros. Prot. Mater.**, v. 33, n. 1-2, 2014.
- ALMEIDA, P. F.; MOREIRA, R. S.; ALMEIDA, R. C. C.; GUIMARÃES, A. K.; CARVALHO, A. S.; QUINTELLA, C.; ESPERIDIÃ, M. C. A.; TAFT, C. A. Selection and application of micro-organisms to improve oil recovery. **Eng. Life Sci.**, v. 4, n. 4, p. 319-325, 2004.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; CARVALHO, E. B.; RAMOS-DE-SOUZA, E.; CARVALHO, A. S.; SILVA, C. H. T. P.; TAFT, C. A. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, p. 1-15, 2006.
- AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D. A. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing mixed Microbial Population. **Applied and Environmental Microbiology**, 1990.
- AMANN, R. I.; ZARDA, B.; STAHL, D. A.; SCHELEIFER, K. H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3007-3011, 1992.
- AMANN R. I. **In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes**. In Molecular Microbial Ecology Manual. Ed. Akkerman ADL, van Elsas DJ, de Bruijn FJ. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1-15. 1995.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada a Assistência a Saúde: Módulo 5: tecnologias em serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. Brasília: ANVISA, 2013. 95 p.
- BAJALAN, I.; ROUZBAHANIA, R.; PIRBALOUTIB, A.; MAGGI, F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 305-311, 2017.
- BAJPAI, V. K.; AL-REZA, S. M.; CHOI, U. K.; LEE, J. H.; KANG, S. C. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 8, p. 1876-1883, 2009.

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

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

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, I. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology** 46, 446–475. 2008.

BAO, M.; KONG, X.; JIANG, G.; WANG, X.; LI, X. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 66 p. 42-46, 2009.

BASTIN, E.; GREER, F.; MERRITT, C.; MOULTON, G. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. **Science** Vol nº 63, Issue 1618, , pages 21-24, 1926.

BAUMGARTNER, L.K.; REID, R.P.; DUPRAZ, C.; DECHO, A.W. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. **Sedimentary Geology** 185, 131–145, 2006.

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.

BEERSTECHEER, E. **Petroleum Microbiology**: An Introduction to Microbiological Petroleum Engineering. Literary Licensing, LLC, 390 pg, 2013.

BENDIF, H., BOUDJENIBA, M., MIARA, M.D., BIQIKU, L., BRAMUCCI, M., CAPRIOLI, G., LUPIDI, G., QUASSINTI, L., SAGRATINI, G., VITALI, L.A. Rosmarinus eriocalyx: an alternative to Rosmarinus officinalis as a source of antioxidant compounds. **Food Chem.** 218, 78–88. 2017.

BENKA-COKER, M.O.; METSEAGHARUN, W.; EKUNDAYO, J.A. Abundance of sulphate-reducing bacteria in Niger Delta Oilfield waters. **Bioresource Technology** v. 54 p. 151–154, 1995.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BIAN, X.; MBADINGA, S.; LIU, Y.; YANG, S.; LIU, J.; YE, R.; GU, J.; MU, B. Insights into the anaerobic biodegradation pathway of n-alkanes in oil reservoirs by detection of signature metabolites. **Scientific Reports** vol N °5, Article number: 9801, 2015.

BOGAERT, I.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 821-833, 2011.

BØDTKER, G. et al. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 439-450, 2009

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 317-333, 1998.

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

CARVALHO, A. S. **Desenvolvimento e Aplicação da Tecnologia de Exclusão Biocompetitiva no Controle da Biossulfetogênese na Indústria de Petróleo na Região da Bahia-Brasil**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

CASTRO, H. F.; WILLIAMS, N. H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 1-9, 2000.

CAMEOTRA, S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microb Cell Fact.** Mar 11; 8-16. 2009.

CELIK TAS, O.; KOCABAS, E.; BEDIR, E.; SUKAN, F.; OZEK, T.; BASER, K. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.

CHINALIA, F. A.; PATON, G. I.; KILLHAM, K. S. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. **Bioresource Technology**. Vol. 99, 714–721. 2008.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CORTEZ, M. T. S. C. **Abordagem molecular na resolução de problemas com biocorrosão**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.854, p.435-442, 1998.

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

CYPIONKA, H.; KONSTANZ, U. Characterization of sulfate transport in *Desulfovibrio desulfuricans*. **Arch Microbiol** 152: 237-243, 1989.

DAMIÃO, A. O. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

- DAVIDOVA, I.; DUNCAN, K.; PEREZ-IBARRA, M.; SUFLITA, J. Involvement of thermophilic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. **Microbe: Metal Interactions** vol 14, issue 7, pages: 1597-1803, 2012.
- DELBEKE, E.; MOVSISYAN, M.; VAN GEEMB, K.; STEVENS, C. Chemical and enzymatic modification of sphorolipids. **Journal Green Chemistry**, n 1, 2016.
- DU PLOOY, W., REGNIER, T., COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology** 53, 117–122. 2009.
- EKINS, P.; VANNER, R.; FIREBRACE, J. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications, **J. Clean. Prod.**, v. 15, p. 1302-1315, 2007.
- ENNING, D.; VENZLAFF, H.; GARRELF, J.; DINH, H. T.; MEYER, V.; MAYRHOFER, K. et al. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. **Meth Enzymol**, v. 14, p. 1772-1787, 2012.
- ENNING D, GARRELF J. Corrosion of iron by sulfate- reducing bacteria–new views of an old problem. **Appl Environ Microbiol** 80: 1226–1236, 2014
- FARIAS, A. P. F. **Isolamento, seleção e identificação de bactérias produtoras de bioativos com potencial para aplicação na indústria do petróleo**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade federal da Bahia, Salvador, 2016.
- FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.8, n.1, p.17-25, 1999.
- FOWLER, S.J., DONG, X., SENSEN, C.W., SUFLITA, J.M., GIEG, L.M. Methanogenic toluene metabolism: community structure and intermediates. **Environ. Microbiol.** 14, 754–764, 2012.
- FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresour. Technol.** 75, 235–240. 2000;
- FUKUI, M.; TAKII, S. Reduction of tetrazolium salts by sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 62, n. 1, p. 13-19, 1989.
- GANA, M.; KEBBOUCHE-GANA, S.; TOUZI, A.; ZORGANI, M.; PAUSS, A.; LOUNICI, H.; MAMERI, N. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oilindustry. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 391-404, 2011.
- GARDNER, L.; STEWART, P. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. **J. Indust. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 354-360, 2002.

GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 92, p. 263-282, 2011.

GOMAA, E. Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. **Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 20, p. 4396-4403, 2012.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 39-45, 2003.

GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, p. 915-927, 2001.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, J.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; ÁLVAREZ-ALONSO, R.; DEL VALLE, P.; DE ARRIAGA, D.; RÚA, J. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dairy Sciences**, v. 96, p. 4912-4920, 2014.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V., NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology** 44, 616–625. 2006.

HYLDGAARD, M., MYGIND, T., MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 1–12. 2012.

HUPERT, C.; VOORDOUW, G. Oil Field Souring Control by Nitrate-Reducing *Sulfurospirillum* spp. That Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria for Organic Electron Donors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2644-2652, 2007.

HUSSAIN, A., HASAN, A., JAVID, A., QAZI, J. I., 2016. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. **3 Biotech**, v. 6, n. 119, p. 1-10.

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

ITO, T.; OKABE, S.; SATOH, H.; WATANABLE, Y. Successional Development of Sulfate-Reducing Bacterial Populations and Their Activities in a Wastewater Biofilm

Growing under Microaerophilic Conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 1392-1402, 2002.

JORDÁN, M. J.; LAX, V.; ROTA, M. C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J. A. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* essential oil and its polyphenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 144-152, 2013.

JOSHI, S. J.; SUTHAR, H.; YADAV, A. K.; HINGURAO, K.; NERURKAR, A. Occurrence of Biosurfactant Producing *Bacillus* spp. in Diverse Habitats. **ISRN Biotechnology**, p. 1-6, 2013.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. A Biosurfactant-Sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. **BioMed Research International**

Volume 2013, Article ID 512495. 2013.

JULIANO, C., DEMURTAS, C., PIU, L. In vitro study on the anticandidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil combined with chitosan. **Flavour and Fragrance Journal** 23, 227–231. 2008.

KAHLISCH, L.; HENNE, K.; GROBE, L.; BRETTAR, I.; HOFLE, M. Assessing the viability of bacterial species in drinking water by combined cellular and molecular analyses. **Microb. Ecol.**, v. 63, p. 383-397, 2012.

KASTER, K. M.; GRIGORIYAN, A.; JENNNEMAN, G.; VOORDOUW, G. Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field in the North Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 195-203, may 2007.

KITCHEN, D.; DECORNEZ, H.; FURR, J.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

KJELLERUP, B.V.; VEEH, R.H.; SUMITHRARATNE, P.; THOMSEN BUCKINGHAM-MEYER, T.R.; FROLUND, K.B.; STURMAN, P. Monitoring of microbial souring in chemically treated produced water biofilm systems using molecular techniques. **Journal of Industrial Microbial Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 163-170, 2005.

KORENBLUM, E.; WEID, I.; SANTOS, A.; ROSADO, A.; SEBASTIÁN, G.; COUTINHO, C.; MAGALHÃES, F.; PAIVA, M.; SELDIN, L. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 667-675, 2005.

KRÄMER, M.; CYPIONKA, H. Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria. **Arch Microbiol** 151:232–237. 1989.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, n. 3, p. 402-406, 1996.

LI, Y.; SHAO, X.; XU, J.; WEI, Y.; XU, F.; WANG, H. Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria. **Food Chem.**, v. 234, p. 62–67, 2017.

LIANG, B.; WANG, L.; ZHOU, Z.; MBADINGA, S. High Frequency of *Thermodesulfovibrio* spp. and Anaerolineaceae in Association with *Methanoculleus* spp. in a Long-Term Incubation of n-Alkanes-Degrading Methanogenic Enrichment Culture. **Font. Microbiol.** 7 (1431), 1-12, 2016.

LOPES, P. F. **Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos (RJ)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 68p.

LV, L.; ZHOU, L.; WANG, L.; LIU, J.; GU, J.; MU, B.; YANG, S. Selective inhibition of methanogenesis by sulfate in enrichment culture with production water from low-temperature oil reservoir. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Vol nº 108, pages 133-141, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M.; Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, p. 138-142, 2012.

MAGALHÃES, R. **Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade federal da Bahia, Salvador, 2014.

MAGOT, M. Indigenous microbial communities in oil fields. In: \_\_\_\_\_, **Petroleum Microbiology**. Asm press, Washington, DC, 2005.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.** 5, 101–121. 2003.

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

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38: 346-353. 2007.

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

MELO, E.; NASCIMENTO, C.; ACCIOLY, A.; SANTOS, A. Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of naturachelants. **Sci. Agríc.**, v. 65, p. 61-68, 2008.

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

MORADI, M.; SONG, Z.; TAO, X. Introducing a novel bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp., with the highest corrosion inhibition efficiency. *Electrochemistry Communications*, v. 51, p. 64-68, 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**, v. 18, n. 1, p. 15-26, 2013.

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

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

NEUMANN, B. **Avaliação de nova metodologia para detecção de microrganismos redutores de sulfato (MRS) aplicada à indústria de petróleo e gás**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

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

OJEDA-SANAA, A.; VAN BAREN, C.; ELECHOSAC, M.; JUÁREZ, M.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main component. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 189-195. 2013.

OKORO, C.; EKUN, O.; NWUME, M. Microbial community structures of an offshore and near-shore oil production facilities after biocide treatment and the potential to induce souring and corrosion. **Afr. J. Microbiol. Res.** Vo. 11, Issue 5, Pages 171-184, 2017.

OLIVEIRA, V.; FLEMING, L.; FERREIRA, P.; NASCIMENTO, J. Substâncias antimicrobianas produzida por *Bacillus spp.* isolados de frutas. **B. CEPPA**, v. 29, n. 1, p. 57-62, 2011.

ORPHAN, V. J.; TAYLOR, L. T.; HAFENBRADL, D.; DELONG, E. F. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 700-711, 2000.

ORTIZ, A.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A.; ARANDA, F. J. Effects of di-rhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 325, 99 - 107, 2006.

OUYANG, Q.; TAO, N.; JING, G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC Genomics**, v. 17, n. 599, 2016 .

OYEKOLA, O.O.; HARRISON, S.T.L.; VAN HILLE, R.P. Effect of culture conditions on the competitive interaction between lactate oxidizers and fermenters in biological sulfate reduction system. **Bioresource Technology** v. 104 p. 616–621, 2012.

PENNA, M. O.; BAPTISTA, W.; BRITO, R. F.; SILVA, E. D.; NASCIMENTO, J. R.; COUTINHO, C. M. L. M. Sistema dinâmico para avaliação de técnicas de monitoração e controle da CIM. **Bol. téc. PETROBRAS**, v. 45, n. 1, p. 26-33, 2002.

PEREIRA Jr., N. Tecnologia de bioprocessos. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, Séries em Biotecnologia, v. 1, 436 p. 2008.

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

POSTGATE, J. **The sulphate-reducing bacteria**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, London. New York – Melbourne, Cambridge University Press, 1984.

RAAD, I.; SHERERTZ, R. Chelators in combination with biocides: treatment of microbial yinduced biofilm and corrosion. **US patent** 6,267,979, 2001.

RAHBARDAR, M.G.; BAHAREH, A.; MEHRI, S. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. **Biomedicine & Pharmacotherapy** Vol 86, Pages 441-449. 2017.

RAJASEKAR A, ANANDKUMAR B, MARUTHAMUTHU S. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. **Appl Microbiol Biotechnol.**;85:1175–1188, 2010.

ROSA, J. P.; KORENBLUM, E.; FRANCO-CIRIGLIANO, M. N.; ABREU, F.; LINS, U.; SOARES, R. M. A.; MACRAE, A.; SELDIN, L.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces lunalinharesii* Strain 235 Shows the Potential to Inhibit Bacteria Involved in Biocorrosion Processes. **BioMed Research International**, p. 1-10, jan. 2013.

SANTOS, A.; BATISTA, L.; LIMA, J.; ALMEIDA, R.; ROQUE, M.; RAMOS-DE-SOUZA, E.; ALMEIDA, P. Evaluation of the fluorescence in situ hybridization technique for detection of eubacteria and sulfate-reducing bacteria from samples of water in oil fields. **Chemical engineering transactions**, v. 20, p. 139-144, 2010.

SÁNCHEZ, M.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; ARANDA, F. J. Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 142, 118 – 127, 2006.

SANTOS, E.; DE SOUZA, L.; DE ASSIS, P.; ALMEIDA, P.; RAMOS-DE-SOUZA, E. Novel potential inhibitors for adenylylsulfatereductase to control souring of water in oil industries. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 31, p. 1-13, 2013.

SARTI, E. L. **Influência do oxigênio no crescimento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios em batelada.**

Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo–Hidráulica e Saneamento, 2007.

SCHIFFER, A., FRITZ, G., KRONECK, P. M. H., & ERMLER, U. Reaction mechanism of the iron-sulfur flavoenzyme adeno-sine-5-phosphosulfate reductase based on the structural characterization of different enzymatic states. **Biochemistry**, 45, 2960–2967. 2006.

SEBASTIÁN, G. **Avaliação da população bacteriana presente em um reservatório de petróleo situado em águas profundas brasileiras, com ênfase no isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SEO, J.; KEYN, Y.; LI, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health** . 6: 278-309. 2009.

SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C. M.; VASCONCELLOS, S. P.; DUSSAN, L. J.; SANTOS NETO, E. V.; OLIVEIRA, V. M. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, p. 253-266, 2007.

SHAH, V.; BADIA, D. Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., p. 397-400, 2007.

SILVA, T.; VERDE, L.; SANTOS NETO, E.; OLIVEIRA, V. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 57-70, 2013.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SOARES S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Nutr. Rev. Campinas**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

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**, v. 33, n. 2, p. 273-278, 2010.

SOUZA, A S.; VENDRUSCULO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. **Ciência e Engenharia**, Uberlândia, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.

SOTIROVA, A. V.; SPASOVA, D. I.; GALABOVA, D. N.; KARPENKO, E.; SHULGA, A. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, 56, 639-644. 2008.

STOCKERT, J.; HOROBIN, R.; COLOMBO, L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment,

fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159-167, 2018.

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

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009.

TECHATHUVANAN, C.; REYES, F.; DAVID, J.; DAVIDSON, P. Efficacy of Commercial Natural Antimicrobials Alone and in Combinations against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 269-275, 2014.

TEHRANI, F.; SADEGHI, E. Effect of Mint Essential Oil on Growth of *Listeria monocytogenes* during the Ripening and Storage of Iranian White Brined Cheese. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 5, p. 150-154, 2015.

THEBRATH, B.; DILLING, W.; CYPIONKA, H. Sulfate activation in *Desulfotomaculum*. **Arch. Microbiol.** vol 152, issue 3, pp 296–301. 1989.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSESMETZIS, N.; MAGUIRE, M. J.; HEAD, I. M.; LOMANS, B. P. Protocols for investigating the microbial communities of oil and gas reservoirs. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. **Springer-Verlag Berlin**, 2016.

VAN VUUREN, S.; DOCRAT, Y.; KAMATOU, G.; VILJOEN, A. Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 7-14, 2014.

VARJANI, S.; GNANSOUNOUB, E. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1258-1265, 2017.

VASCONCELLOS, S. P.; CRESPIM, E.; CRUZ, G. F.; SENATORE, D. B.; SIMIONI, K. C. M.; SANTOS NETO, E. V.; MARSALOLI, A. J.; OLIVEIRA, V. M. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. **Organic Geochemistry**, v. 40, p. 574-588, 2009.

VEIL, J. A.; PUDER, M. G.; ELCOCK, D.; REDWEIK JR. R. J. **Whitte Paper Describing Produced Water From Production Of Crude Oil, Natural Gas, And Coal Bed Methane**. National Energy Technology Laboratory, 2004. Disponível em: <<http://www.ipd.anl.gov/anlpubs/2004/02/49109.pdf>>. Acesso em: 15 de abril de 2017.

VIDELA, H. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, n. 4, p. 259-270, 2002.

VIGNERON, A; ALSOP, E.; CHAMBERS, B.; LOMANS, B.; HEAD, I.; TSESMETZIS, N. Complementary Microorganisms in Highly Corrosive Biofilms from an Offshore Oil Production Facility. **Appl Environ Microbiol** vol. 82 pages 2545-2554, 2016.

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. Molecular Microbiology of the Oil Field Sulfur Cycle. **The Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 250-253, 2001.

VOORDOUW, G. Production-related petroleum microbiology: progress and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 401-405, 2011.

YANG, D. Y.; ZHANG, Y.; SHI, R. J.; HAN, S. Q.; LI, G. Z.; LI, G. Q.; ZHAO, J. Y. Inhibition of the activity of sulfate-reducing bacteria in produced water from oil reservoir by nitrate. **Huan Jing Ke Xue**, p. 319-326, 2014.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.; DUNCAN, K.; MCINERNEY, M.; FOLMSBEE M. In-situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a lime to ne petroleum reservoir. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 1239-1247, 2007.

WAGNER, M.; ROGER, A.; FLAX, J.; BRUSSEAU, G.; STAHL, D. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. **J. Bacteriol.**v. 180, p. 2975-2982, 1998.

WEN, J.; GU, T. **Evaluations of a green biocide and a green biocide enhancer for the mitigation of biocorrosion using an electrochemical bioreactor**. In: AIChE (American Institute of Chemical Engineers) (Ed.), Annual Meeting Conference Proceedings. Salt Lake City, UT, USA 4-9 November 2007. AIChE, New York, 2007.

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

ZARASVAND, K.; RAVISHANKAR, V. Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**. vol. 87, Pages 66-74, 2014.

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

ZHANG, X. 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**, v. 110, n. 6, p. 716-719, 2010.

ZHANG, X.; ASHBY, R.; SOLAIMAN, D.; LIU, Y.; FAN, X. Antimicrobial activity and inactivation mechanism of lactonic and free acid sophorolipids against *Escherichia*

coli O157:H7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 176-182, 2017.

ZHAO, K.; WEN, J.; GU, T.; NESIC, S. **Effects of biocides and a biocide enhancer on SRB growth**. In: AIChE (American Institute of Chemical Engineers) (Ed.), Annual Meeting Conference Proceedings. Cincinnati, OH, USA, 30 October-4 November 2005. AIChE, New York, 2005.